

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-507232

(P2004-507232A)

(43) 公表日 平成16年3月11日(2004.3.11)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	4 B O 2 4
C 1 2 Q 1/26	C 1 2 Q 1/26	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/34	C 1 2 Q 1/34	
C 1 2 Q 1/42	C 1 2 Q 1/42	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 170 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2002-510718 (P2002-510718)	(71) 出願人	502450538
(86) (22) 出願日	平成13年6月13日 (2001.6.13)		ザ・ボード・オブ・トラステイズ・フオー・ザ・ユニバーシテイ・オブ・アーカンソー
(85) 翻訳文提出日	平成14年12月12日 (2002.12.12)		アメリカ合衆国、アーカンソー・72204、リトル・ロック、サウス・ユニバーシテイ・アベニュー・2801
(86) 国際出願番号	PCT/US2001/018950		
(87) 国際公開番号	W02001/096605	(74) 代理人	100062007
(87) 国際公開日	平成13年12月20日 (2001.12.20)		弁理士 川口 義雄
(31) 優先権主張番号	60/211, 287	(74) 代理人	100105131
(32) 優先日	平成12年6月13日 (2000.6.13)		弁理士 井上 満
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100113332
(31) 優先権主張番号	60/274, 373		弁理士 一入 章夫
(32) 優先日	平成13年3月8日 (2001.3.8)	(74) 代理人	100114188
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 小野 誠
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 ステロイド受容体の核内転写制御を介する活性から非核内制御媒介活性を分離する方法

(57) 【要約】

本発明は、ステロイド核内転写制御を介さない作用機構およびそのステロイド核内転写制御を介する効果との関連との理解における基本的発見に関する。(i) 核内転写制御を介さない効果および核内転写制御を介する効果を同一のステロイド受容体によって媒介することができること；(ii) 両効果がリガンドに誘導されること；(iii) 迅速且つ緩やかに適合することができるリガンド結合ドメインのリガンド誘導性活性化によって核内転写制御を介さない効果が発揮されること、(iv) 典型的にはより遅く且つ強力な相互作用の結果であるステロイド受容体のDNA結合ドメインのリガンド誘導性活性化によって核内転写制御を介する効果が発揮されること；(v) リガンド相互作用の核内転写制御を介さない効果が、選択的応答に影響を与えるような様式でリガンド相互作用の核内転写制御を介する効果に関連し得ることを発見した。本発明はまた、一定のステロイドが無関係のステロイド受容体への結合を介して核内転写制御を介さない効果を誘導することができることを初めて記載する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

受容体を実質的に核内転写制御を介する効果を誘導することなく非核内制御媒介効果を誘導する化合物と接触させる工程を含み、前記受容体が、プロゲステロン受容体、糖質コルチコイド受容体、電解質コルチコイド受容体、レチノイン酸受容体、ビタミンD受容体、PPAR受容体、プレグナンX受容体、胆汁酸受容体、甲状腺受容体、ファルネソイドX受容体、肝臓X受容体、エクジソン受容体、およびCOUP-TF受容体からなる群から選択される、受容体の選択効果を誘導する化合物の使用。

【請求項 2】

前記核内転写制御を介さない効果は、前記化合物と前記受容体のリガンド結合ドメインとの相互作用によって起こる、請求項 1 に記載の使用。 10

【請求項 3】

前記核内転写制御を介さない効果が、エストロゲン受容体のリガンド結合ドメインと機能が等価の受容体領域の化合物による活性化によって起こる、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 4】

核内転写制御を介する効果が前記受容体のDNA結合ドメインによって媒介される、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 5】

受容体を実質的に核内転写制御を介さない効果を誘導せずに核内転写制御を介する効果を誘導する化合物と接触させる工程を含む、受容体の選択効果を誘導する化合物の使用。 20

【請求項 6】

前記受容体が、プロゲステロン受容体、糖質コルチコイド受容体、電解質コルチコイド受容体、レチノイン酸受容体、ビタミンD受容体、PPAR受容体、プレグナンX受容体、胆汁酸受容体、甲状腺受容体、ファルネソイドX受容体、肝臓X受容体、エクジソン受容体、およびCOUP-TF受容体からなる群から選択される、請求項 5 に記載の使用。

【請求項 7】

前記核内転写制御を介する効果がタンパク質合成である、請求項 5 に記載の使用。

【請求項 8】

化合物の実質的にステロイド受容体のDNA結合ドメインを活性化することなくステロイド受容体のリガンド結合ドメインによって媒介される経路を活性化する能力またはステロイド受容体のリガンド結合ドメインによって媒介される機能を実質的に活性化することなくステロイド受容体のDNA結合ドメインを活性化する能力を評価する工程と、その後、試験化合物の生物活性を測定して、実質的に核内転写制御を介する効果を誘導することなく標的核内転写制御を介さない効果を誘導する能力または実質的に核内転写制御を介さない効果を誘導することなく標的核内転写制御を介する効果を誘導する能力を評価する工程とを含む、ステロイド受容体の選択的核内転写制御を介さない効果を誘導する化合物のスクリーニング法。 30

【請求項 9】

前記ステロイド受容体がエストロゲン受容体でもプロゲステロン受容体でもない、請求項 8 に記載の方法。 40

【請求項 10】

前記ステロイド受容体が、プロゲステロン受容体、糖質コルチコイド受容体、電解質コルチコイド受容体、レチノイン酸受容体、ビタミンD受容体、PPAR受容体、プレグナンX受容体、胆汁酸受容体、甲状腺受容体、ファルネソイドX受容体、肝臓X受容体、エクジソン受容体、およびCOUP-TF受容体からなる群から選択される、請求項 8 に記載の方法。

【請求項 11】

エストロゲン受容体を、実質的に核内転写制御を介する効果を誘導することなく細胞外調節キナーゼの活性によって媒介される効果以外の核内転写制御を介さない効果を誘導する化合物と接触させる工程を含む、エストロゲン受容体の選択効果を誘導する化合物の使用 50

。

【請求項 1 2】

エストロゲン受容体を、実質的に核内転写制御を介する効果を誘導することなく骨喪失治療または骨量増加治療以外の治療について核内転写制御を介さない効果を誘導する化合物と接触させる工程を含む、エストロゲン受容体の選択効果を誘導する化合物の使用。

【請求項 1 3】

アンドロゲン受容体を、実質的に核内転写制御を介する効果を誘導することなく細胞外調節キナーゼの活性化によって媒介される効果以外の核内転写制御を介さない効果を誘導する化合物と接触させる工程を含む、アンドロゲン受容体の選択効果を誘導する化合物の使用。

10

【請求項 1 4】

アンドロゲン受容体を、実質的に核内転写制御を介する効果を誘導することなく骨喪失治療もしくは骨量増加治療またはエストロゲン関連癌もしくは子宮内膜症治療以外の治療について核内転写制御を介さない効果を誘導する化合物と接触させる工程を含む、アンドロゲン受容体の選択効果を誘導する化合物の使用。

【請求項 1 5】

ステロイド受容体に結合して所望の核内転写制御を介さない効果を誘導する一方でステロイド誘導性核内転写制御を介する効果を誘導しないシクロペントノペルヒドロフェナントレン核を含むエストロゲンまたはアンドロゲン以外の化合物を投与する工程を含む、ステロイド受容体の核内転写制御を介さない効果を誘導する化合物の使用。

20

【請求項 1 6】

ステロイド受容体を試験化合物と接触させる工程と、
試験化合物が受容体の核内転写制御を介さない効果を活性化させるかどうかを同定する工程と、
前記受容体－試験化合物複合体の転写活性レベルを同定する工程と、
前記受容体の核内転写制御を介さない活性を活性化し、且つ 10 % 未満の内因性ステロイド受容体リガンドの受容体の転写活性を誘導する化合物を選択する工程とを含む、選択的ステロイド反応を誘導する化合物を選択するための化合物のスクリーニング法。

【請求項 1 7】

前記核内転写制御を介さない活性がアポトーシスを予防する、請求項 1 6 に記載の方法。 30

【請求項 1 8】

前記核内転写制御を介さない活性がシグナル伝達経路である、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記核内転写制御を介さない活性がセカンド・メッセンジャー系である、請求項 1 6 に記載の方法。

【請求項 2 0】

前記シグナル伝達経路がタンパク質キナーゼシグナル伝達経路である、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 1】

前記タンパク質キナーゼシグナル伝達経路が M A P キナーゼシグナル伝達経路である、請求項 2 0 に記載の方法。 40

【請求項 2 2】

前記 M A P キナーゼシグナル伝達経路が S r c / S h c / 細胞外調節キナーゼシグナル伝達経路である、請求項 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

組織培養細胞株を細胞が適切なコンフルエンスに達するまで増殖させる工程と、
前記組織培養物を特異的受容体の発現プラスミドおよび前記選択受容体に反応性を示す標的遺伝子のための発現プラスミドでトランスフェクトする工程と、
前記トランスフェクト細胞を試験化合物と接触させる工程と、
前記化合物が実質的に核内転写制御を介する効果を誘導することなく核内転写制御を介さ 50

ない効果を誘導するかを同定する工程とを含む、化合物の評価法。

【請求項 2 4】

前記受容体がエストロゲン受容体でもプロゲステロン受容体でもない、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記標的遺伝子が、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (CAT)、β-ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼ、ペプチドホルモン、成長因子、およびキメラタンパク質からなる群から選択される、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 6】

前記標的遺伝子の転写レベルを、熱量測定法、蛍光法；免疫化学的方法；化学的方法、または放射化学的方法からなる群から選択される方法を使用して同定する、請求項 2 3 に記載の方法。 10

【請求項 2 7】

天然または人工ステロイド受容体を発現する細胞を試験化合物と接触させる工程と、試験化合物がステロイド受容体の核内転写制御を介さない活性を活性化させるかどうかを評価する工程と、

前記試験化合物によって誘導された転写レベルを同定する工程と、
実質的に前記ステロイド受容体の核内転写制御を介する活性を活性化することなく前記ステロイド受容体の核内転写制御を介さない活性を活性化させる化合物を選択する工程とを含む、ステロイド受容体関連疾患または障害の治療用化合物のスクリーニング法。 20

【請求項 2 8】

天然または人工性ステロイド受容体を発現する細胞を試験化合物のみまたはプロアポトーシス薬との組み合わせと接触させる工程と、

試験化合物が前記ステロイド受容体の核内転写制御を介さない活性を活性化させるかどうかを評価する工程と、

前記試験化合物によって誘導された転写レベルを同定する工程と、
前記試験化合物が試験化合物のみまたはプロアポトーシス薬との組み合わせと接触させた細胞中でアポトーシスを阻害するかを同定する工程と、

実質的に前記ステロイド受容体の核内転写制御を介する活性を活性化することなく前記ステロイド受容体の核内転写制御を介さない活性を活性化させる化合物を選択する工程とを含む、ステロイド受容体関連疾患または障害の治療用化合物のスクリーニング法。 30

【請求項 2 9】

天然または人工ステロイド受容体を発現する細胞を試験化合物と接触させる工程と、

前記試験化合物と接触した細胞の細胞外調節キナーゼ活性化量を同定する工程と、

試験化合物と接触した細胞の転写量を同定する工程と、

細胞外調節キナーゼ活性化を示し、且つアンドロゲンまたはエストロゲンと接触した細胞の転写レベルと比較して最小の転写レベルを示す前記試験化合物と接触した細胞を選択する工程とを含む、ステロイド受容体の核内転写制御を介する活性を調整することなくステロイド受容体の核内転写制御を介さない活性を調整する化合物のスクリーニング法。

【請求項 3 0】

細胞を少なくとも 1 つの試験化合物に接触させる工程であって、前記細胞が、 40

(a) ステロイド受容体タンパク質、その機能操作形態もしくは改変形態を発現する非内因性 DNA と、

(b) 第 1 のレポーター遺伝子に連結した有効なホルモン応答エレメントをコードする DNA と、

(c) シグナル伝達経路反応性転写調節単位に作動可能に連結された第 2 のレポーター遺伝子をコードし、それにより前記第 2 のレポーター遺伝子がシグナル伝達経路に反応して活性化され、前記第 2 のレポーター遺伝子の転写がステロイドホルモンによって活性化されない DNA とを含み、

細胞中での前記レポーター遺伝子の転写の証拠をアッセイする工程と、 50

前記第2のレポーター遺伝子の転写を誘導し、且つ前記第1のレポーター遺伝子の転写を誘導しない化合物を選択する工程とを含む、ステロイド受容体の核内転写制御を介する活性を調整することなくステロイド受容体の核内転写制御を介さない活性を調整する化合物のスクリーニング法。

【請求項31】

細胞を少なくとも1つの試験化合物に接触させる工程であって、前記細胞が、

(a) ステロイド受容体タンパク質、その機能操作形態もしくは改変形態を発現する非内因性DNAと、

(b) シグナル伝達経路反応性転写調節単位に作動可能に連結されたレポーター遺伝子をコードし、それにより前記レポーター遺伝子がシグナル伝達経路に反応して活性化され、前記第2のレポーター遺伝子の転写がステロイドホルモンによって活性化されないDNAとを含み、

10

細胞中での前記レポーター遺伝子の転写の証拠をアッセイする工程と、

前記ステロイド受容体応答遺伝子の転写を定量する工程と、

前記レポーター遺伝子の転写を誘導し、且つステロイドレポーター反応遺伝子の転写を誘導しない化合物を選択する工程とを含む、ステロイド受容体の核内転写制御を介する活性を調整することなくステロイド受容体の核内転写制御を介さない活性を調整する化合物のスクリーニング法。

【請求項32】

前記シグナル伝達経路反応性転写調節単位が、血清応答因子、アクチベータタンパク質1、cAMP応答エレメント、EボックスDNA結合エレメント、E2F DNA結合エレメント、糖質コルチコイド応答エレメント、熱ショック応答エレメント、インターフェロン γ 活性化配列、インターフェロン刺激応答エレメント、活性化T細胞の核因子、 κ B細胞の核因子、p53応答エレメント、Rb応答エレメント、およびSTAT3応答エレメントからなる群から選択される、請求項30または請求項31に記載の方法。

20

【請求項33】

任意選択的に栄養素を補足した化学的に定義された培養培地中で組織培養スクリーニング系を増殖させる工程であって、前記組織培養スクリーニング系の細胞株が少なくとも1つの同定された核内転写制御を介さない活性を有するステロイド受容体を含み、

前記培地に試験化合物または化学的シグナルを添加する工程と、

30

転写量を測定する工程と、

核内転写制御を介さない活性を測定する工程と、

核内転写制御を介さない活性を誘導するが、転写を誘導しない化合物を選択する工程とを含む、実質的に核内転写制御を介する性受容体活性を活性化することなく核内転写制御を介さない性受容体を活性化させる試験試験化合物または化学的シグナルを同定するためのバイオアッセイ。

【請求項34】

前記細胞株がOB-6である、請求項33に記載の方法。

【請求項35】

細胞を試験化合物に接触させる工程であって、前記細胞は、

40

i) 機能的ステロイド受容体またはステロイド受容体の遺伝子変異体をコードするDNA配列と、

ii) 応答エレメント-受容体遺伝子構築物と、

iii) 血清応答エレメント-受容体構築物とでトランスフェクトされており、

前記応答エレメントレポーター遺伝子構築物の転写に対する前記試験化合物の効果を同定する工程と、

前記血清応答エレメント-レポーター遺伝子構築物の転写に対する前記試験化合物の効果を同定する工程と、

実質的に応答エレメントレポーター遺伝子構築物の転写に影響を与えることなく血清応答エレメント-受容体遺伝子構築物の転写を活性化する化合物を選択する工程とを含む、実

50

質的に核内転写制御を介する活性を誘導することなく核内転写制御を介さない活性を誘導するステロイド受容体のリガンドのスクリーニング法。

【請求項 36】

第1の細胞を試験化合物に接触させる工程であって、前記第1の細胞は、

i) 機能的ステロイド受容体またはステロイド受容体の遺伝子変異体をコードするDNA配列と、

ii) 応答エレメント-受容体遺伝子構築物とでトランスフェクトされており、

前記応答エレメントレポーター遺伝子構築物の転写に対する前記試験化合物の効果を同定する工程と、

第2の細胞を前記試験化合物に接触させる工程であって、前記第2の細胞はレポーター遺伝子に作動可能に連結されたシグナル伝達経路応答転写調節単位でトランスフェクトされており、

前記第2の細胞の転写に対する前記試験化合物の効果を同定する工程と、

実質的に前記第1の細胞の転写に影響を与えることなく前記第2の細胞の転写を活性化する化合物を選択する工程とを含む、実質的に核内転写制御を介する活性を誘導することなく核内転写制御を介さない活性を誘導するステロイド受容体のリガンドのスクリーニング法。

【請求項 37】

安定なトランスフェクト細胞株を有し、前記細胞株がステロイド応答レポーター遺伝子構築物を含むコンテナと、核内転写制御を介さない活性の活性化を評価するための手段と、ステロイド受容体とを含む、ステロイド受容体依存性核内転写制御を介さない活性を測定するためのキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

(政府援助)

本発明は、米国国立衛生研究所から一部助成金を受けている。したがって、合衆国連邦政府は、本発明に一定の権利を有する。

【0002】

本出願は、2000年6月13日提出の「骨量を増加させるための性非特異的方法および組成物 (Sex Non-Specific Methods and Compositions for Increasing Bone Mass)」というタイトルの米国特許出願番号60/211, 287号および2001年3月8日提出の「ステロイド受容体の転写活性からの核内転写制御を介さない性活性の分離 (Methods of Dissociating Nongenotropic from Transcriptional Activity of Steroid Receptors)」というタイトルの米国特許出願番号60/274, 373号の優先権を主張する。

【0003】

(発明の分野)

本出願はステロイドシグナル伝達分野であり、特に、ステロイド核内転写制御を介する効果 (genotropic 効果) からのステロイド核内転写制御を介さない効果 (nongenotropic 効果) の分離法、および実質的にステロイド核内転写制御を介する効果を誘導することなくステロイド核内転写制御を介さない効果を誘導することができるか、実質的にステロイド核内転写制御を介さない効果を誘導することなくステロイド核内転写制御を介する効果を誘導することができる化合物のスクリーニング法を記載する。本発明はまた、一定のステロイドが無関係のステロイド受容体への結合を介して核内転写制御を介さない効果を誘導することができることを初めて記載する。

【0004】

(発明の背景)

分子構造の類似性およびタンパク質配列の相同性により、多数のタンパク質がステロイド核受容体のスーパーファミリーに分類されている。ステロイドタンパク質受容体ファミリ

ーには、少なくとも64個の既知の受容体が含まれ（Cell、第97巻、161～163、1999年4月16日）、これらにはエストロゲン受容体の α および β 形態（ER α およびER β ）、エストロゲン受容体関連受容体1および受容体2（EER-1およびEER-2）、アンドロゲン受容体（AR）、プロゲステロン受容体（PR）、レチノイン酸受容体（および関連オーファン受容体ROR α 、ROR β 、およびROR γ ）、糖質コルチコイド受容体（GR）、電解質（ミネラル）コルチコイド受容体（MR）、ビタミンD受容体、神経刺激受容体、ファルネソイドX受容体（FXR）、肝臓X受容体（LXR α およびLXR β ）、甲状腺ホルモン受容体AおよびB（トリヨードチロニン（T3）およびチロキシシン（T4）に結合する）、COUP-TF受容体、エクジソン受容体、ペルオキシソーム増殖活性化タンパク質受容体（PPAR、PPAR α 、PPAR γ 、およびPPAR σ が含まれる）、プレグナンX（PXR）、胆汁酸結合ファミリー、ならびにキメラ受容体およびオーファン受容体が含まれる。

10

【0005】

ステロイドは細胞内受容体に結合し、典型的には遺伝子活性を誘導するステロイド／受容体複合体を介した転写およびタンパク質合成を調整することが伝統的に承認されている。ステロイド受容体が主にリガンド活性化転写因子として既に知られている場合でさえ、最近、核内転写制御を介する効果の速さとは一致しない多数の非常に急速な（例えば、数秒から約15分）ステロイド効果が同定されている。これらの認められたステロイドホルモンの核内転写制御を介さない効果は、最近、Falkensteinら、「急速な核内転写制御を介さない効果に注目したステロイドホルモンの複数の効果」、Pharmacol. Rev.、52、513～555、2000によって概説された。McEwen, B. S. and Alves, S. E.、Endocr. Rev.、20、279～307、1999もまた参照のこと。多数のこれらの急速な作用は、エストロゲンまたは他のステロイドの推定膜会合受容体との相互作用能力に帰している（Watsonら、Proc. Soc. Exp. Biol. Med.、220、9～19、1999）。しかし、これまでこれらの核内転写制御を介さない効果がステロイドの転写効果を媒介するタンパク質と同一のタンパク質或いは異なるタンパク質によって媒介されるかどうかは未知であった。さらに、ステロイドの核内転写制御を介さない効果と古典的な受容体の転写活性との関係は完全に未知であった。例えば、Falkensteinらは、2000年の概説に以下の所見を記載している。

20

30

【0006】

(i) ステロイドの核内転写制御を介さない効果および関連する個別の受容体は、ビタミンDおよび甲状腺ホルモンのような関連化合物を含む全てのステロイド群で証明される。これらの急速な効果についての生理学および臨床的関連は未だほとんど不明である。Falkensteinら、514、概要。

【0007】

(ii) 核内転写制御を介する性ステロイド作用と対照的に、ステロイドの核内転写制御を介さない性効果は、主に、転写およびタンパク質合成インヒビターに対して感受性がないことによって特徴付けられ急速な作用の発生（数秒から数分以内）を実証する実験により極めて明白に示されている。これらの急速な効果は、おそらく、細胞内ステロイド受容体の性質とは異なる薬理的性質を有する受容体によって媒介されるようである。・・・薬理的性質のみにおける矛盾では、異なる受容体タンパク質の核内転写制御を介さない作用についての仮説の支持には不十分であるが、この重要な論点については第III.B節で取り組まれており、核内転写制御を介さないシグナル伝達における古典的および非古典的受容体タンパク質両方の関連についての種々の証拠が得られている。Falkensteinら、p. 516。

40

【0008】

(iii) 多様なステロイドの核内転写制御を介さない効果は、古典的細胞内ステロイド受容体とは明らかに異なる薬理的性質を有する推定非古典的膜受容体を介して媒介されるようである。Falkensteinら、p. 520。

50

【0009】

(iv) まとめると、現在、少なくともいくつかの急速な $1\alpha, 25-(OH)_2D_3$ 誘導効果がステロイドおよびチロイドホルモンスーパーファミリーに属する細胞内受容体と異なる膜受容体によって伝達されることを示す多数の一連の証拠が存在する。Falkensteinら、p. 521。

【0010】

(v) ステロイドの核内転写制御を介さない作用の多数の局面にはさらに継続的且つ徹底的な研究が必要であり、その理解もいまだ不十分であることが自明である。これには、急速なステロイドシグナル伝達を開始する推定膜受容体の未だ達成されていないクローニングも含まれる。ステロイドに結合する膜タンパク質(mPR、アネクシンII)は予備的に認められているが、急速な作用を担うステロイド膜受容体は最終的に証明されていない。明らかに、このような受容体のクローニングは大きな進展につながるが、ステロイド作用の新規の局面の生理学的、病態生理学的、そして最後であるが重要な臨床的関連性は、別の最重要課題であることを忘れてはならない。クローン化された受容体を用いなくともこれを達成することができるにもかかわらず、後者は最終的には臨床に向けた研究も容易にするであろう。Falkensteinら、p. 546。

【0011】

特に、Falkensteinらは、ステロイドの核内転写制御を介さない作用を媒介する別の推定受容体の証拠として以下を含めている。

【0012】

(i) 各古典的受容体を欠く細胞または組織(例えば、MRおよびPRについてのノックアウト動物由来の細胞)におけるステロイドの核内転写制御を介さない効果の存在および急速なステロイド効果が古典的アンタゴニストに対して感受性を示さないこと; および
(ii) RU-28318が急速なシグナル伝達を遮断するという所見は、急速なアルドステロン効果が古典的受容体によって媒介されることを必ずしも意味せず、そのような推定はMRノックアウトマウスのアルドステロンが依然として核内転写制御を介さない活性を示すという事実のもとにおいてはあり得ない(Falkensteinら、p. 535)。

【0013】

非限定的な例として、性ステロイドを使用して骨量が治療されているが、その基礎をなす作用機構は不明である。性ステロイドの核内転写制御を介する効果は、核受容体タンパク質によって媒介され、これはエストロゲンとアンドロゲンシグナル伝達との間で非常に異なり、それぞれ雌標的生物と雄標的生物との間で性特異的なパターンで分布している。古典的エストロゲン受容体(ER α)に加えて、多数の組織はエストロゲン受容体の第2の形態(ER β)を発現する。ステロイドのその同族受容体への結合により、タンパク質の高次構造が変化し、転写機構と直接相互作用するか、他の転写因子とのタンパク質-タンパク質相互作用を介して間接的に相互作用する。この数年間で種々の細胞型においておそらく核内転写制御を介する性作用機構を示さないような急速な作用を示す多数のエストロゲン効果が報告されている(Lieberherr, M. B. ら、1993、J. Bone Miner. Res.、8、1365~1376; Aronica, S. M. ら、1994、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、91、8517~8521; Endoh, H. H. ら、1997、Biochem. Biophys. Res. Commun.、235-99-102; McEwen, B. S. and S. E. Alves.、1999、Endocr. Rev.、20、279~307; Chen, Z. ら、1999、J. Clin. Invest.、103、401~406; Castoria, G. ら、1999、EMBO J.、18、2500~2510; Toran-Allerand, C. D. ら、1999、Front. Neuroendocrinol.、20、97~121; Norfleet, A. M. ら、1999、Endocrinology、140、3805~3814)。多数のこれらの急速な作用は、エストロゲンのERの膜結合形態との相互作用能力に帰されている(Collins, P. and

10

20

30

40

50

C. Webb.、1999、Nat. Med.、5、1130～1131；Pietras, R. J. and C. M. Szego.、1999、Nat. Med.、5、1330；Razandi, M. ら、1999、Mol. Endocrinol.、13:307～319；Norfleet, A. M. ら、1999、Endocrinology、140、3805～3814；Watson, C. S. and B. Ganutchu、1999、Proc. Soc. Exp. Biol. Med.、220、9～19）。しかし、この受容体の正確な正体および細胞内局在（古典的受容体であるかどうかを含めて）、すなわち、二重膜構造中または小胞と呼ばれる膜構造（Okamoto, T. A. ら、1998、J. Biol. Chem.、273、5419～5422；Schlegel, A. ら、1999、J. Biol. Chem.、274、33551～33556）
10、またはサイトゾルに局在しているのかどうかは同定されていない。

【0014】

成体骨恒常性におけるERおよびARの役割

ER α およびER β またはAR（アンドロゲン受容体）の受容体の存在が、増殖軟骨細胞、骨芽細胞、骨髄間質細胞（Eriksen, E. F. ら、1988、Science、241-84-86；Komm, B. S. ら、1988、Science、241-81-84；Ernst, M. ら、1991、Mol. Endocrinol.、5、1597～1606；Benz, D. J. ら、1991、J. Bone Miner. Res.、6、531～541；Benz, D. J. ら、1991、Endocrinology、128、2723～2730；Monaghan, B. A. ら、1992、Clin. Orthop.、277～280；Bellido, T. G. ら、1993、Endocrinology、133、553～562；Ben-Hur, H. G. ら、1993、Calcif. Tissue Int.、53、91～96；Kusec, V. ら、1998、J. Clin. Endocrinol. Metab.、83、2421～2428；Kennedy, J. ら、1999、Bone、24、9～16；Nilsson, L. O. ら、1999、J. Clin. Endocrinol. Metab.、84、370～373）、ならびに破骨細胞およびその前駆体（Oursler, M. J. ら、1993、Ann. Med.、25、361～371）で十分に証明された。特に、骨芽細胞および破骨細胞におけるER α 、ER β 、およびARの発現レベルは、再生組織と比較して少なくとも1/10であった。さらに、雌および雄再生器官と比較して雄および雌由来の細胞でERまたはARレベルは類似しているので、受容体の性特異的分布は認められない（Benz, D. J. ら、1991、J. Bone Miner. Res.、6、531～541；Benz, D. J. ら、1991、Endocrinology、128、2723～2730；Komm, B. S. ら、1988、Science、241-81-84；Braidman, I. ら、2000、Bone、26、423～427）。さらに、一方で雄および雌成体骨の両方においてエストロゲンは骨活性性ステロイドであり、他方で芳香族化不可能なアンドロゲンがエストロゲン欠損症の副作用から雌の骨を保護することができることを提案する見かけ上矛盾した証拠が存在する（Riggs, B. L. ら、1998、J. Bone Miner. Res.、13、763～776；Vanderschueren, D. ら、1998、Bone、23、391～394）。実際、
40変異エストロゲン受容体を有する雄における骨量の減少（Carani, C. ら、1997、N. Engl. J. Med.、337、91～95；Bilezikian, J. P. ら、1998、N. Engl. J. Med.、339、599～603）およびP-450アロマターゼ欠損症の2匹の雄におけるエストロゲン治療後の骨量の増加（Riggs, B. L. ら、1998、J. Bone Miner. Res.、13、763～776）により、アンドロゲンの末梢芳香族化に由来するエストロゲンも雄の骨量の維持に重要であることが示唆される。しかし、3つ全ての場合、エストロゲン欠損症の幼若雄における骨量の減少および骨マーカーレベルの増加は、アンドロゲンが十分であることを考慮すると、発達中の骨成長の欠損およびこれらの個体が決して思春期ではないという事実（骨量の喪失ではなく、骨粗鬆症に共通の形態を有する症例である）により、ピーク骨量に
50

達し損ねた十分な結果であり得る。この主張を支持して、完全なアンドロゲン不感性のヒトは、X染色体上のアンドロゲン受容体遺伝子の変異のために、エストロゲンレベルの上昇にもかかわらず骨量が減少した (Schwartz, B. D. ら、1999、エンドクリン学会、第81回年次集会93 (概要))。さらに、DHTなどの非芳香族化アンドロゲンを含むアンドロゲンは、少なくともげっ歯類における生合成活性および出生ならびにインビトロおよびインビボでの骨細胞死に対してエストロゲンと同一の効果を有し (Bellido, T. ら、1995、J. Clin. Invest.、95、2886~2895; Weinstein, R. S. ら、1997、Endocrinology、138、4013~4021; Weinstein, R. S. and S. C. Manolagas、2000、Am. J. Med.、108、153~164; Weinstein, R. S. ら、1997、Endocrinology、138、4013~4021; Weinstein, R. S. ら、1999、J. Bone Miner. Res.、14、S451 (概要))、さらにより重要なことは、卵巣摘出雌における骨損失を予防することができる (Vanderschueren, D. E. ら、1992、Endocrinology、130、2906~2916; Tobias, J. H. ら、1994、Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.、267、E853~E859; Coxam, V. ら、1996、Bone、19、107~114、Lea, C. K. and A. M. Flanagan.、1999、J. Endocrinol.、160、111~117)。現在まで、何故骨細胞は再生組織と比較して低レベルのERおよびARしか発現しないのか、または何故雄骨細胞と雌骨細胞との間でERおよびARの性分布を欠くのか、または何故雌および雄における性ステロイドのいずれかのクラスの効果が不可解であるのかについて説明されていない。

【0015】

雌および雄における性ステロイドのいずれかのクラスの性非特異的効果およびこれらの効果における性ステロイド受容体の役割のこの誤解は、マウスにおけるER α またはER β のノックアウト (α ERKOおよび β ERKO) の不明瞭な骨表現型によってさらに混乱している (Cuse, J. F. and K. S. Korach、1999、Endocr. Rev.、20、358~417)。 α ERKOまたはER α とER β の両方 (二重ERノックアウトマウス、DERKO) は、雌と雄の両方で大腿骨の長さおよび直径が減少しているが、大腿骨の骨塩密度の小規模且つ局所的減少を示すことで特徴付けられる弱い骨表現型を示す。それに対して、ER β ノックアウト (β ERKO) マウスは、メスにおいてより長い大腿骨および骨膜周囲皮質の増加を示すが、雄では変化がない (Windahl, S. H. ら、1999、J. Clin. Invest.、104、895~901)。それにもかかわらず、体積測定pQCTまたは組織形態計測によって野生型コントロールと比較したこれらのノックアウトマウスの任意の変化も明らかにできず、これは、得られた骨塩密度 (DEXAによる) の変化がより小さな骨の結果である可能性が高いことを示している。重要なことには、 α ERKOおよびDERKOマウス的大腿骨の長さの減少は、骨端閉鎖の遅延に由来する性機能低下症患者の長骨の伸長と正反対である (Smith, E. P. ら、1994、N. Engl. J. Med.、331、1056~1061; Carani, C. ら、1997、N. Engl. J. Med.、337、91~95; Bilezikian, J. P. ら、1998、N. Engl. J. Med.、339、599~603)。したがって、ERKOマウスにおける表現型に小さな変化があるとするれば、骨成長に対するエストロゲン効果の喪失に関連し得るが、これらの変化は、思春期または成体骨再構成に対するエストロゲンに関して有益ではない。アロマターゼ欠損 (ArKO) マウスにおいて多義的骨表現型もまた認められている (Oz, O. K. ら、2000、J. Bone Miner. Res.、15、507~514)。雌ではなく雄ArKOで長骨成長が減少した。それに対して、雌では代謝回転が増加したが、雄では代謝回転は減少した。この結果は、エストロゲンがいずれかの性において骨活性性ステロイドであるという主張に強く反論するものである。重要には、2匹の罹患雄マウス (骨生検を行った) のうち1匹およびアロマターゼ欠損および雌マウスにおける壁の厚さ

、骨芽細胞数または生存の代理物 (surrogate) はエストロゲン依存性であり、エストロゲン処理後に較正することができる (Vanderschueren, D. ら、1998、Bone、23、391～394)。それに対して、代謝回転は、破骨細胞形成および骨芽細胞形成の変化およびそれによる細胞数の変化を反映するので、雌においてエストロゲン依存性を示すが (エストロゲン欠損に対する推定二次的増加)、雄ではアンドロゲン依存性を示す (過剰なアンドロゲンに対する推定二次的抑制を示す)。同様に、アンドロゲン耐性雄および雌ラットおよびマウス (精巢性女性化モデル、Tfm) では、エストロゲン濃度がより高い (非機能的アンドロゲンの芳香族化に起因する) にもかかわらず、骨長が減少するが、海綿質体積は正常である (Young, C. Y. ら、1989、Endocrinology、124、771～775; Gaspar, M. L. ら、1991、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A、88、8606～8610; Murphy, L. and P. J. O'Shaughnessy、1991、J. Endocrinol.、131、443～449; Uesugi, Y. ら、1992、Anat. Rec.、234、541～548; Vanderschueren, D. ら、1993、J. Bone Miner. Res.、8、801～809)。

10

20

30

40

50

【0016】

アーカンソー大学評議会が提出したWO 00/20007は、少なくとも 10^8 M^{-1} のエストロゲン α または β 受容体 (およびこの実施形態の1つの態様では、化合物はエストロゲンではない) またはアンドロゲン受容体 (およびこの実施形態の1つの態様では、化合物はアンドロゲンではない) に結合し、 17β -エストラジオールレベルの5%に過ぎない遺伝子転写活性を誘導する一方で細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) 活性が増加する化合物の投与による宿主の骨量の増加法を開示している。WO 00/20007は、エストロゲンまたはアンドロゲンのエストロゲンまたはアンドロゲンの転写活性を増加させることなくERK活性を増加させる能力を保存する1つの方法は、置換基または置換部分をエストロゲンまたはアンドロゲンに結合させてこれらの細胞通過を阻止し、遺伝子活性を活性化させるように核に輸送することを防ぐものであることを強調している。

【0017】

McDonnellとその共同研究者は、異なるER部位に結合し、ER α を選択的に遮断することができるが、コンセンサスEREを試験した場合にそれと逆にER β 媒介転写は遮断することができないいくつかのクラスの小さな (11から19個のアミノ鎖) ペプチドを単離した (Norris, J. D. ら、1999、Science、285、744～746; Chang, C. ら、1999、Mol. Cell Biol.、19、8226～8239)。

【0018】

スクリーニング法

ステロイド受容体としてまたはそれを介して作用する薬剤のいくつかのスクリーニング法が当該分野で既知である。例えば、Evansらに付与された米国特許第5,071,773号は、ホルモン受容体と考えられるタンパク質が転写を刺激するかどうか、および化合物が受容体タンパク質の機能的リガンドであるかどうかを同定する方法を開示および主張している。

【0019】

Evansらに付与された米国特許第5,298,429号は、ホルモン受容体タンパク質またはその同族体をコードする非内因性DNAおよびレポーター遺伝子に連結した有効なホルモン応答性要素をコードするDNAを発現する培養細胞の形質添加に対する化合物の効果の評価によって化合物がホルモン受容体タンパク質の機能的リガンドであるかどうかを同定するアッセイを開示している。

【0020】

一般的なバイオアッセイには、化合物活性化タンパク質が細胞での表現型変化を誘導するようにコントロール細胞よりも高いレベルで細胞で発現されたタンパク質を活性化する化合物のバイオアッセイを開示しているHouseyに付与された米国特許第5,877,

007号が含まれる。

【0021】

アメリカン・ホーム・プロダクツ社名義のWO 00/37681は、ER α またはER β のいずれかに特異的な受容体モジュレーターを同定するためのアッセイを開示している。開示されたアッセイは、第1の組が機能的ER α をコードするDNAおよび応答性レポーター遺伝子構築物を含み、第2の細胞組がEREレポーター構築物およびER β を含む2組の細胞を使用している。化合物を、ER α またはER β を発現する細胞における転写の選択的活性化または阻害についてスクリーニングすることができる。

【0022】

米国特許第5,643,720号は、AP-1に結合してDNA結合を阻止する複合体を形成するためのレンチノイド受容体に結合するリガンドのスクリーニング法を開示している。米国特許第5,702,914号は、遺伝子改変細胞におけるレポーター遺伝子構築物の転写のアッセイによって化合物がレンチノイド受容体の機能的リガンドであるかどうか同定するバイオアッセイを開示している。 10

【0023】

米国特許第5,863,733号は、遺伝子改変細胞におけるレポーター遺伝子構築物を使用して化学物質が目的の遺伝子の転写活性を特異的に調整するかどうかを同定する方法を開示している。

【0024】

米国特許第5,563,036号は、試験化合物で処理した場合の固体基質上の標識転写因子の有無の検出によって核酸への転写因子の結合を阻害する化合物のスクリーニング法を開示している。 20

【0025】

米国特許第5,854,004号は、レポーター遺伝子およびイノシトール-1,4,5-トリリン酸(IP₃)、およびジアシルグリセロール濃度の変化に応答するDNA調節配列を含むように遺伝子改変された細胞におけるレポーター遺伝子転写のモニタリングによって受容体依存性シグナル伝達経路を調整する化合物のスクリーニング法を開示する。

【0026】

Laufferらに付与された米国特許第5,639,597号は、化合物が受容体のリガンドであるかどうかを同定する無細胞アッセイを開示している。 30

【0027】

Dixitに付与された米国特許第6,060,238号は、牛刀ウイルスサイトカイン応答改変Aと比較してアポトーシスを阻害する薬剤のスクリーニング法を開示している。

【0028】

McDonnellらによって提出された米国特許第5,506,102号は、プロゲステロン受容体A型を使用したステロイド細胞内媒介転写のアンタゴニストのスクリーニング法を記載している。

【0029】

米国特許第5,834,213号は、原形質膜受容体と相互作用する化学的シグナルによって処理された転写応答をモニターするための組織培養スクリーニング系を開示している。この組織培養スクリーニング系には、膜受容体を含む細胞株、標的遺伝子、およびステロイド受容体、ビタミン受容体、およびオーファン受容体からなる群から選択される特異的受容体が含まれる。 40

【0030】

Novalon Pharmaceutical Corporationによって提出されたWO 99/54728は、受容体の高次構造を改変するペプチドまたは核酸リガンドとの相互作用に基づいて、化合物が多細胞生物における受容体の生物活性を調整するかどうかを予想する方法が記載されている。データを、既知の生物活性を有する基準化合物のフィンガープリントと比較する。

【0031】

(他の関連する引例)

L a b r i e に付与された米国特許第 5, 3 6 2, 7 2 0 号、同第 5, 5 4 5, 6 3 4 号、同第 5, 8 4 6, 9 6 0 号、および同第 5, 5 6 7, 6 9 5 号は、低用量のプロゲステンまたは男性ホルモン活性を有し且つ男性化活性の低い他のステロイド誘導体を投与する工程を含む、感受性温血動物における乳癌および子宮内膜癌、骨粗鬆症および子宮内膜症の治療または予防法を開示している。主な実施形態では、この方法は、アンドロゲン受容体に対して 2×10^{-8} 未満の K_i 値を有する少なくとも 1 つの男性ステロイドであって、3.0 ナノモル/L 未満の濃度で最大半減値に達するヒト乳癌 Z R - 7 5 - 1 細胞の増殖に対するアンドロゲン受容体媒介阻害効果を示し、および 5 0 n M 未満の血清濃度で男性化活性が認められないステロイドの投与によるアンドロゲン受容体の活性化、を含み、このような各ステロイドを 5 0 ナノモル/L 未満の蓄積血清濃度の維持に十分に低い濃度で投与する。

10

【0032】

S i m p k i n s に付与された米国特許第 5, 8 4 3, 9 3 4 号は、非実質的な性関連活性を有するエストロゲンを患者に投与して雄または雌の骨粗鬆症の障害作用を遅延させることができることを主張している。' 9 3 4 特許は、どのようにして骨量を増加させる化合物を選択したかを説明できないが、その代わりにどのようにして骨喪失の影響を遅延させるかを教示している。好ましい実施形態では、使用したエストロゲンは、17 α -エストラジオールである。' 9 3 4 特許では、発明者はどのようにして 17 α -エストラジオールが細胞保護効果を発揮するかという機構を理解することはできないと述べているが、直接的保護効果（受容体作用によるものとは対照的であろう）を發揮することを示唆している。直接保護効果についての所与の 1 つの例は、グルコース調節の調整である（' 9 3 4 特許のカラム 7 および 8 を参照のこと）。

20

【0033】

フロリダ大学研究基金によって提出された W O 9 8 / 2 2 1 1 3 は、虚血に関連する細胞集団に対して細胞保護を付与するためのエストロゲン化合物の β 異性体の利用法を開示している。

【0034】

米国特許第 5, 8 5 9, 0 0 1 号は、細胞に神経保護を付与する四員環シクロペンタノフェナントレン化合物中にフェノール末端基を有する非エストロゲン化合物の使用を開示している。

30

【0035】

フロリダ大学研究基金によって提出された W O 9 8 / 3 1 3 8 1 は、効果を高めるための多環式フェノール化合物と抗酸化剤との組み合わせを投与する工程を含む、細胞集団に対する多環式フェノール化合物の細胞保護効果を高める方法を開示している。1 つの開示された組み合わせは、グルタチオンおよびエストロゲンである。

【0036】

アーカンソー大学評議会が提出した W O 9 9 / 6 1 0 4 4 は、骨再構成を調節するための骨芽細胞形成および破骨細胞形成の調節用治療薬としてのノブリン (n o g g i n) およびノブリン (n o g g i n) のアンタゴニストの使用を開示している。アーカンソー大学評議会が提出した W O 2 2 / 2 0 6 2 5 はまた、糖質コルチコイド誘導性骨疾患は骨細胞の誕生および死の変化に起因することおよび糖質コルチコイドの投与により成熟骨芽細胞および骨細胞のアポトーシスが増加し、且つ形成速度および骨塩密度が減少することを開示している。

40

【0037】

さらに、アーカンソー大学評議会が提出した W O 0 0 / 1 9 8 2 3 は、ヒト副甲状腺ホルモン 1 - 3 4 (h P T H (1 - 3 4)) はインビボで間欠性様式でマウスに投与した場合に骨芽細胞に対して抗アポトーシス効果を發揮することを開示している。これと同一の出願はまた、ウシ P T H (1 - 3 4) (b P T H (1 ~ 3 4)) は、骨芽細胞および骨細胞のインビトロでの糖質コルチコイド誘導性アポトーシスを予防するという証拠を提供し

50

ている。

【0038】

アーカンソー大学評議会が提出したWO 00/20625は、糖質コルチコイド投与により、骨髄の骨芽細胞形成および破骨細胞形成の欠損によって成熟骨芽細胞および骨細胞のアポトーシスが増加し、骨形成速度および骨塩密度が減少することを開示している。

【0039】

上記の考察から、ステロイドシグナル伝達の理解に対する相当な前進にもかかわらず、どのようにしてステロイドが核内転写制御を介さない効果および核内転写制御を介する効果を媒介するのかという理解が欠けていることが明らかである。

【0040】

本発明の目的は、ステロイドの選択的効果を誘導することにある。

10

【0041】

本発明の目的はまた、ステロイドまたはステロイド受容体関連障害または疾患の治療法を提供することにある。

【0042】

本発明のさらに別の目的は、ステロイドの選択的応答を誘導することができる化合物をスクリーニングするためのトランスジェニック動物を提供することにある。

【0043】

本発明のさらに別の目的は、ステロイドの選択的応答に有用な化合物の選択法を提供することにある。

20

【0044】

(発明の概要)

本発明は、ステロイド核内転写制御を介さない作用機構およびそのステロイド核内転写制御を介する作用との関係についての理解における基本的発見に関する。(i)核内転写制御を介さない効果および核内転写制御を介する効果は同一のステロイド受容体によって媒介することができること；(ii)両効果がリガンドに誘導されること；(iii)迅速且つ緩やかに適合することができるステロイド受容体のリガンド結合ドメインにおけるリガンド相互作用によって核内転写制御を介さない効果が発揮されること、(iv)リガンド結合ドメインとのリガンド相互作用によって核内転写制御を介する効果が発揮されるが、それは典型的にはより遅く且つ強力な相互作用の結果であるステロイド受容体のDNA結合ドメインを必要とすること；(v)リガンド相互作用の核内転写制御を介さない効果が、選択的応答に影響を与えるような様式でリガンド相互作用の核内転写制御を介する効果から分離し得ることことを発見した。

30

【0045】

この先駆的な発見に基づいて、ステロイド受容体の核内転写制御を介する効果からステロイド核内転写制御を介さない効果を分離する方法が得られる。1つの実施形態では、本発明は、受容体を、受容体に核内転写制御を介さない効果を媒介させる様式で受容体のリガンド結合ドメインと十分に相互作用する一方で、有意な核内転写制御を介する効果が得られない様にDNA結合ドメインが活性化されない化合物と接触させる工程を含む、ステロイドの核内転写制御を介さない効果を選択的に誘導する方法を含む。別の実施形態では、受容体を、受容体に核内転写制御を介する効果を媒介させる様式で受容体のDNA結合ドメインを十分に活性化させる一方で、有意な核内転写制御を介さない効果が得られない化合物と接触させる工程を含む、ステロイドの核内転写制御を介する効果を選択的に誘導する方法が得られる。天然のステロイド効果の10%未満、好ましい実施形態では天然のステロイド効果の5、1、または0.1%未満である効果である場合、リガンドは「有意な」または「実質的な」効果を誘導しないと考えられる。

40

【0046】

核内転写制御を介さない活性型の例には、細胞内の第2の伝令(セカンド・メッセンジャー)系、シグナル伝達経路、タンパク質キナーゼシグナル伝達経路、MAPキナーゼシグナル伝達経路、Src/Shc/ERKシグナル伝達経路の活性化；細胞内カルシウム濃

50

度の調節；分泌；細胞形態学の変化；細胞移動性；細胞骨格再配列；およびアポトーシスが含まれるが、これらに限定されない。

【0047】

本発明の別の態様では、リガンド結合相互作用活性をマスクする手段としての受容体上の結合部位のステロイド受容体の内因性または外因性リガンドと競合する選択的誘導化合物（ペプチド、タンパク質、またはリガンドアンタゴニストが含まれるが、これらに限定されない）を投与することができる。1つの例として、リガンドの核内転写制御を介さない効果の誘導を阻止する方法でリガンド結合ドメインと結合するペプチドまたはリガンドアンタゴニストを投与することができる。別の実施形態では、リガンドの核内転写制御を介する効果の誘導を阻止する方法で受容体のリガンド結合ドメインと結合するペプチドまたはリガンドアンタゴニストを投与することができる。選択的誘導化合物は、DNA-受容体相互作用の直接的干渉または受容体の他の転写レギュレーターとのタンパク質-タンパク質相互作用形成の間接的阻止によってステロイド受容体の転写活性を阻害することができる。さらに、選択的誘導化合物は、少なくとも2つの成分を有する複合体として存在することができ、該成分が組合わされた場合、複合体はステロイド受容体の核内転写制御を介する活性を不活化し、核内転写制御を介さない活性を活性化してもよい。

10

【0048】

さらに別の実施形態では、受容体の高次構造または配置の変化の誘導によって受容体のDNA結合領域を不活化する有効量の化合物を投与する工程を含む、ステロイド受容体の選択的効果の誘導法が得られる。本発明のさらに別の態様では、タンパク質の高次構造または立体配置の変化の誘導による、受容体のリガンド結合領域のみによって媒介される機能を不活化する有効量の化合物を投与する工程を含む、ステロイド受容体の選択効果を誘導する方法が得られる。

20

【0049】

別の実施形態では、実質的にステロイドの核内転写制御を介する効果を誘導することなくステロイドの核内転写制御を介さない効果を誘導することができるか実質的にステロイドの核内転写制御を介さない効果を誘導することなくステロイドの核内転写制御を介する効果を誘導することができる化合物のスクリーニング法が得られる。本方法を、

（1）化合物の実質的にステロイド受容体のDNA結合ドメインを活性化することなくステロイド受容体のリガンド結合ドメインにほぼ結合する能力またはステロイド受容体のリガンド結合ドメインのみによって媒介される機能を実質的に活性化することなくステロイド受容体のDNA結合ドメインをほぼ活性化する能力を評価する工程と、その後

30

（2）試験化合物の生物活性を測定して、実質的に核内転写制御を介する効果を誘導することなく標的核内転写制御を介さない効果を誘導する能力または実質的に核内転写制御を介さない効果を誘導することなく標的核内転写制御を介する効果を誘導する能力を評価する工程とを含む、多数の方法で行うことができる。

【0050】

第1の工程を、好ましくはコンピュータ支援による分子モデリングによって行うことができる。あるいは、リガンド結合ドメインのみからなり、機能的DNA結合ドメインを欠く受容体の改変形態を使用して、試験化合物がリガンド結合ドメインまたはDNA結合ドメインを活性化するかを同定することができる。改変形態を、例えば、形質転換細胞中で発現させることができる。インビトロで培養した細胞を、ステロイド受容体またはその遺伝子変異体を発現するように遺伝子を変化させることができる。核内転写制御を介する活性を、試験化合物との反応で得られた全mRNA量または1つまたは複数のステロイド調節遺伝子に特異的なmRNAの測定などの既知の技術を使用して定量することができる。

40

【0051】

あるいは、工程1および2を、インビトロ細胞ベースのアッセイにおいて実質的に他の効果を誘導することなく核内転写制御を介さない効果または核内転写制御を介する効果のいずれかを選択的に誘導する化合物の簡単なアッセイによって組み合わせることができる。

【0052】

50

本発明を使用して、任意のステロイド受容体ファミリー（エストロゲン受容体の α または β 形態（ER α およびER β ）、エストロゲン受容体関連受容体1および受容体2（ER γ およびER δ ）、アンドロゲン受容体（AR）、プロゲステロン受容体（PR）、レチノイン酸受容体（および関連オーファン受容体RO α 、RO β 、およびRO γ ）；糖質コルチコイド受容体（GR）、電解質コルチコイド受容体（MR）、ビタミンD受容体、神経刺激受容体、ファルネソイドX受容体（FXR）、肝臓X受容体（LXR α およびLXR β ）、甲状腺ホルモン受容体AおよびB（トリヨードチロニン（T $_3$ ）およびチロキシン（T $_4$ ）に結合する）、COUP-TF、エクジソン、PPARファミリー（PPAR α 、PPAR γ 、およびPPAR σ が含まれるペルオキシソーム増殖活性化タンパク質）、プレグナンX（「PX $_R$ 」）、胆汁酸結合ファミリー、ならびにキメラ受容体およびオーファン受容体が含まれる）の応答を選択的に起こすことができる。

10

【0053】

本発明の別の実施形態では、ステロイドは、典型的な結合受容体以外のステロイド受容体との相互作用を介して核内転写制御を介さない効果を誘導することができることが発見された。本発明のこの態様の1つの非限定的な例では、エストロゲン受容体（ER α およびER β ）およびアンドロゲン受容体（AR）は、結合リガンドがエストロゲンまたはアンドロゲンであるかどうかに関係なく類似の効率で骨芽細胞および骨細胞に抗アポトーシスシグナルを伝達することができることが発見された。さらに、骨芽細胞／骨細胞の場合に細胞外シグナル調節キナーゼ（ERK）の活性化を含むエストロゲンおよびアンドロゲン作用の核内転写制御を介さない受容体依存性抗アポトーシス機構が受容体の転写活性から機械的に分離可能であることが発見された。

20

【0054】

ステロイドは以前に無関係とみなされているステロイド受容体を使用して核内転写制御を介さない効果を誘導することができるという事実は、現在、ステロイドの核内転写制御を介さない効果が各クラスの受容体を欠く細胞または組織で発揮されるという発明の背景の例外的記載を説明する。このような場合、ステロイドは、核内転写制御を介さない効果を媒介するために無関係のステロイド受容体を使用する。

【0055】

1つの例として、種々のタンパク質ドメインで変異を有するヒトエストロゲン受容体クローンの試験によって、核内転写制御を介さない効果（例えば、抗アポトーシス効果）を担う受容体の領域が位置付けられる。本明細書中で使用される、用語「抗アポトーシスドメイン」は、抗アポトーシス誘導リガンド（エストロゲンまたはアンドロゲンなど）に結合した場合に骨芽細胞および骨細胞に対して抗アポトーシス効果を媒介するタンパク質上の位置をいう。エストロゲン受容体の抗アポトーシスドメインがリガンド結合領域（ドメインE）中に存在することが発見された。特に、合成ペプチド（ α II）がドメインEでリガンド結合エストロゲン受容体に結合した場合、このペプチドはエストロゲン受容体の転写活性を有効に遮断することが既知であるが、リガンド結合エストロゲン受容体のその後の抗アポトーシス効果に対する効果はないことが見出された。

30

【0056】

プロトタイプとしてER α を使用して、次に、性ステロイドの受容体の抗アポトーシス活性が転写活性に必要なドメインと同一または異なるドメインが必要であることを調査した（図3A）。これを行うために、アポトーシス予防に対するいくつかのER α 変異体の効果を比較した。これらの変異体は、ヒト細胞に一過性にトランスフェクトされた場合に予想されるたんぱく質を産生することが示されている（Schodiniら、1995；Krausら、1997；Ekenaら、1996）。二量体形成（D）およびリガンド結合ドメイン（E）またはEドメインのみを含む変異体もまた予想されるタンパク質を産生し、転写活性を欠くことが示された。

40

【0057】

ER α と同様に、全N末端転写活性化機能（AF-1）ドメインを欠く変異体 Δ A／Bまたはセリンがアラニンに置換された変異体（S104、106、118A）またはFドメ

50

インを欠く変異体 ΔF 、または DNA 結合ドメイン（アミノ酸 185～251）のほとんどを欠く変異体 ΔDBD は、 E_2 結合 ER の抗アポトーシスシグナルを伝達することができた。しかし、これら全ての変異体は、ERE 媒介遺伝子転写活性が減少しているか存在しなかった。Le Goff ら、J. Biol. Chem.、269、4458～4466；McInerney ら、J. Biol. Chem.、271、24172～24178；Katzenelebogen。より印象的には、リガンドの抗アポトーシスシグナルを伝達する能力は、全 $AF-1$ および DNA 結合ドメイン（DE）を喪失している欠失変異体および $AF-2$ / リガンド結合ドメイン（E）のみからなる欠失変異体で保存されていた。それに対して、ホルモン結合能力を欠く ER 変異体 L525A および C 末端転写活性化機能（ $AF-2$ ）が欠失した S554fs は、抗アポトーシスシグナルおよびタンパク質の転写活性を喪失していた。

10

【0058】

次に、E ドメインの抗アポトーシス活性がその特定の細胞内区画への局在に依存するかを同定した（図 3B）。このドメインを、原形質膜または核局在化配列をそれぞれ含む増強シアン蛍光タンパク質への融合によって HeLa 細胞の原形質膜または核に標的した。落射蛍光顕微鏡（epifluorescence microscopy）によって明らかになったように、非標的化 $ER\alpha$ および非標的化 E は、核および細胞質中に類似のシアン蛍光分布を示し、これは、ER のリガンド結合ドメイン以外の全てのドメインの除去によっても細胞内分布が変化しないことを示している。しかし、同一の細胞におけるシアンおよび赤色蛍光の分布から認められるように、適切な標的配列の組み込みにより予想された膜または核 ECFP 融合タンパク質の細胞内局在化が達成された。E ドメインまたは全長 $ER\alpha$ と同一なこの融合タンパク質の抗アポトーシス活性によって証明されるように、原形質膜への E ドメインの支配的標的化により、リガンド誘導性抗アポトーシスシグナルを伝達する能力は変化しなかった。しかし、非常に対照的には、細胞核への E ドメインの排他的な標的化により、その抗アポトーシス活性が完全に喪失した。

20

【0059】

本明細書中に記載の図面は、本発明の実施形態を例示し、本発明の範囲の制限を意図しない。

【0060】

（図面の簡単な説明）

30

図 1 は、インビボおよびインビトロでの性ステロイドによる骨芽細胞および骨細胞のアポトーシスの調節を示す一連のグラフである。A. マウスの卵巣摘出および精巣摘出後の骨芽細胞および骨細胞アポトーシスの罹患率。バーは、群あたり 4～5 匹の動物の平均 $\pm$ SD を意味する。* $p < 0.05$ 。B. 頭蓋冠骨芽細胞を、 $10^{-11} M \sim 10^{-6} M$ の E_2 または DHT で 1 時間処理後、プロアポトーシス薬エトポシド（ $50 \mu M$ ）で 6 時間処理した。死細胞率を、トリパンブルー染色によって定量した。ステロイドの非存在下でのエトポシド誘導性アポトーシスを 100% とした。バーは、三連の同定の平均 $\pm$ SD を示す（ E_2 または DHT 処理培養対各処理について異なる一元配置分散分析を使用した賦形剤について * $p < 0.05$ ）。C および D. 頭蓋冠由来の骨芽細胞または MLOY 骨細胞を $10^{-8} M$ の E_2 または DHT で処理し、エトポシド、デキサメタゾン（ 10^{-7} ）、または TNF α （ $1 nM$ ）の添加によってアポトーシスを誘導した。死細胞率を B に記載のように定量した。結果を、二元配置分散分析によって分析した。各薬剤群および各薬剤対賦形剤内の前処理と所与の前処理と比較した場合、* $p < 0.05$ 。E. コラーゲンゲルに組み込まれた OB-6 骨芽細胞を、異なる濃度の E_2 または DHT で 24 時間処理した。無作為に選択した全部で 200 個の細胞を評価した。賦形剤コントロールでは、 $32.3 \pm 2.5\%$ の細胞がアポトーシスであった。各処理について異なる一元配置分散分析を使用した E_2 または DHT 処理培地対賦形剤は * $p < 0.05$ 。

40

【0061】

図 2 は、 E_2 または DHT の抗アポトーシス効果が ER または AR アンタゴニストの両方で阻害され、これは ER（ α または β ）または AR のいずれかを介して媒介され得ること

50

を示す一連のグラフである。頭蓋冠骨芽細胞をERアンタゴニストICI 182, 780 (10^{-7} M)またはARアンタゴニストフルタミド (10^{-7} M)で30分間前処理後、 10^{-8} Mの E_2 またはDHTと1時間インキュベートした。その後、エトポシドを添加し、6時間後にアポトーシス細胞を図1Bに記載のように定量した。結果を、ステロイドの非存在下 (100%)でのエトポシド誘導性アポトーシスの百分率として示す。バーは、三連の同定の平均±SDを示す (ANOVAによって賦形剤に対して* $p < 0.05$)。B. HeLa細胞を、Nuc-E GFP発現ベクターと共に、ER α 、ER β 、AR、VDR、またはRXR発現ベクターまたは空のベクター (ev)のいずれかで一過性にトランスフェクトした。トランスフェクションから16時間後、細胞を表示の濃度の E_2 、DHT、または1, 25-ジヒドロキシビタミンD₃ (1, 25D₃)で1時間処理後、エトポシドで6時間処理した。200から500個のトランスフェクトした (蛍光)細胞の核の形態学の実験によってアポトーシス細胞を同定した。ステロイドの非存在下 (ー)で培養した細胞のエトポシド誘導性アポトーシスを100%とした。結果を、エトポシド誘導性アポトーシスの百分率として示した (平均±SD)。ANOVAによるステロイドの非存在下でエトポシドで処理した細胞に対して* $p < 0.05$ 。

10

【0062】

図3は、E (リガンド結合)ドメインへのER α の抗アポトーシス活性の局在化および核標的化による除去を示す図である。A. HeLa細胞を、Nuc-E GFPおよび種々のER α 変異体の発現ベクターで同時トランスフェクトし、次いで 10^{-8} Mの E_2 で1時間処理後、エトポシドで6時間処理した。B. 全長ER α を、非標的化ECFPに融合した (ER α -ECFP)。ER α のEDメインを、非標的化ECFP (E-ECFP)、膜標的化ECFP (E-Mem-ECFP)、または核標的化ECFP (E-Nuc-ECFP)のいずれかに融合した。これらの各融合タンパク質を、HeLa細胞中で核標的化赤色蛍光タンパク質 (Nuc-ERFP)と共に発現し、その細胞内分布を落射蛍光顕微鏡で分析した。左および中央のパネルは、シアンまたは赤色フィルターセットを使用して得た同一の細胞の顕微鏡写真を示す。バー=15 μ m。その除去がシアン融合タンパク質の除去と容易に区別することができるので、本実験でNuc-ERFPを使用してアポトーシスを定量した。トランスフェクト細胞を、 10^{-8} Mの E_2 または賦形剤で1時間処理後、エトポシドで6時間処理した。3Aおよび3Bのアポトーシスを、図2に記載のように定量した。バーは、三連の同定の平均±SDを示す。ANOVAによるエトポシドで

20

30

【0063】

図4は、ERおよびARの抗アポトーシス活性がSrc/Shc/ERKシグナル伝達経路を介して媒介されることを示す図である。A. MLO-Y4細胞を、 E_2 またはDHTと2、5、または15分間、またはPD98059 (50 μ M)またはPP1 (10 μ M)と25分間インキュベート後、 E_2 またはDHTで5分間インキュベートした。細胞溶解物を得、タンパク質を抗ERK1/2または抗ホスホERK1/2 (p-ERK1/2)抗体を使用したウェスタンブロット分析によって分析した。アポトーシスの同定のために、細胞を賦形剤、PD98059、またはPP1で30分間インキュベート後、 E_2 またはDHTを添加した。30分後、エトポシドを添加し、図1Bに記載のように6時間後にアポトーシスをアッセイした。B. 図1Bに記載のように、Src+/+対Src-/-マウス由来の胚線維芽細胞においてアポトーシスに対する E_2 またはDHTの効果を比較した。実験手順に記載のように、RT-PCRを行った。C~E. HeLa細胞を、Nuc-E GFPおよび全長ER α またはそのEDメインをコードする発現ベクター、またはARのみ (C、左のパネル)またはdn MEK (C、右のパネル)；キナーゼ活性を欠くSrc変異体 (Src^K)、SH2ドメインを欠くSrc変異体 (Src Δ SH2)、またはSH3ドメインを欠くSrc変異体 (Src Δ SH3) (D)；またはER α とともにwt Shc、dn Shc変異体Y239F/Y240F/Y317F (Shc^{FFF})、Y317F (Shc^{YYF})、またはY238F/Y240F (Shc^{FFY}) (E)でトランスフェクトした。バーは、三連の同定の平均±SDを意

40

50

味する。ANOVAによる、ステロイドを使用しないで培養した細胞に対して* $p < 0.05$ 。

【0064】

図5は、ペプチドを使用したER α 媒介転写作用対抗アポトーシス作用およびER α 媒介対ER β 媒介効果の分離を示す図である。A. HeLa細胞を、ER α 発現ベクターのみまたは α -IIペプチドのSV40プロモータによって駆動するGAL4-DNA結合ドメインとの融合物を保有するベクターと共に一過性にトランスフェクトした。さらに、転写研究のために、細胞をERE-lucまたはIL-6-lucとトランスフェクトしアポトーシス研究のためにEGFP-nucでトランスフェクトした。バーは、三連の同定の平均 $\pm$ SDを示し、ERE-luc刺激倍率またはIL-6-lucの阻害倍率、または賦形剤(E_2 -)または 10^{-8} Mの E_2 (E_2 +)におけるアポトーシスを示すトランスフェクト細胞の%を示す。ANOVAによる賦形剤処理細胞にたいして* $p < 0.05$ 。B. HeLa細胞を、ER α もしくはER β のみまたは2X293もしくは2XF6ペプチドを保有する発現ベクターとともにトランスフェクトした。バーは、表示の受容体およびペプチドでトランスフェクトした細胞対受容体のみでトランスフェクトした細胞における E_2 (10^{-8} M)に応答する活性の三連の同定(ERE-luc、IL-6-luc、または抗アポトーシス)の平均 $\pm$ SDを示す。受容体を保有するがペプチドを保有しない細胞における E_2 誘導活性を、100%とした。ANOVAによる受容体のみでトランスフェクトした細胞に対して* $p < 0.05$ 。C. HeLa細胞を、GRIPペプチドのみまたはER α を共に保有するベクターでトランスフェクトした。バーは、三連の同定の平均 $\pm$ SDを示す。ANOVAによる賦形剤処理細胞に対して* $p < 0.05$ 。

10

20

【0065】

図6は、合成リガンドを用いたERの核内転写制御を介する活性から核内転写制御を介さない活性の分離を示す図である。A. C3媒介転写のために、HeLa細胞を、C3-lucおよびER α でトランスフェクトし、表示の濃度のエストレンまたはピラゾールで処理した。バーは、 β -ガラクトシダーゼ活性を基準とした相対ルシフェラーゼ単位(RLU)の平均 $\pm$ SDを示す。ANOVAによる空のベクター(ev)でトランスフェクトした細胞に対して* $p < 0.05$ 。図1Bに記載のように、エストレンおよびピラゾールの抗アポトーシス活性を、頭蓋冠由来の骨芽細胞において評価した。ANOVAによるエトポシドで処理されていない細胞に対して* $p < 0.05$ 。B. 図4Aに記載のように、MLO-Y4細胞を、表示濃度の異なるリガンドと5分間インキュベートし、ERKリン酸化を評価した。

30

【0066】

図7は、性ステロイド受容体の古典的核内転写制御を介する活性からの抗アポトーシス活性のリガンド誘導分離についての提案モデルを示す図である。3つの絵は、核内転写制御を介する応答または抗アポトーシス応答のいずれかを示すために必要な、リガンドとの相互作用前後の受容体タンパク質の高次構造の状態を示す。不活性非ライゲーション受容体を、中央に灰色で示す。転写活性を優先的に誘発するリガンド(例えば、図6のピラゾール)との相互作用によって誘導された高次構造の変化を、右に青色で示す。受容体の抗アポトーシス活性を優先的に誘発するリガンド(例えば、図6のエストレン)との相互作用によって誘導された高次構造の変化を、右に赤色で示す。緑色の円および緑色の菱形は、2つのリガンドを示す；結合ポケット内の完全および不完全な適合を留意のこと。受容体に対する2つの異なる型のリガンドの会合(k_a)および解離(k_d)速度を、異なる幅および長さの矢印で示す。 E_2 などのリガンドは、もちろん両方の高次構造を誘導する。抗アポトーシスモデルにおいて、受容体とSrcとの間の直接的接触が認められるにもかかわらず、アダプタータンパク質が2つの分子間の相互作用に架橋することができる。不活性非ライゲーション状態における対応する受容体タンパク質のエネルギーレベル(破線)、核内転写制御を介する高次構造(青色の線)または抗アポトーシス高次構造(赤色の線)のいずれかへの進行を下部に示す。エネルギー線図中の不連続な縦軸は、2つの活性間のエネルギー要件における尺度の相違が大きいことを示す。

40

50

【0067】

図8は、 α I Iおよび293ペプチドのDox誘導性発現についての同一のマウスに同時移入した2つの導入遺伝子構築物の図である。

【0068】

図9Aは、Creリコンビナーゼの骨芽細胞特異的発現についてのDox誘導系の作製および機能的特徴づけを示す図である。OG-2の調節下でのCreによるROSA26遺伝子座の活性化。「SA」は、元のROSA26遺伝子座のスプライス受容体部位を示す。

【0069】

図9Bは、インビトロでのCre発現のDox誘導活性化を示すゲルである。Ob-6細胞を、Tet-OG2-Cre構築物で一過性にトランスフェクトし、次いで0.5mg/ml Doxまたは賦形剤で24時間処理した。細胞を回収し、RT-PCR分析によってCre発現を評価した。レーン1はサイズマーカーを含む。レーン2は、空の賦形剤+Doxで処理した細胞を示す。レーン3は、Doxを使用しないOG2-rtA-Creを含む細胞を示す。レーン4は、Doxを使用したOG2-rtA-Creを含む細胞を示す。レーン4は、Doxを使用して誘導したOG2-rtA-Creプラスミドを含む。

10

【0070】

図10は、マウスER α 遺伝子のエクソン3および4を含む86Kbの核内転写制御を介する遺伝子座へのフロックス化(floxed)エクソン3の標的を示す図である。

20

【0071】

(発明の詳細な説明)

本発明は、ステロイド核内転写制御を介さない作用機構およびそれらのステロイド核内転写制御を介する作用に対する関係についての理解おける基本的発見に関する。(i)核内転写制御を介さない効果および核内転写制御を介する効果は同一のステロイド受容体によって媒介することができること；(ii)両効果がリガンドで誘導されること；(iii)迅速且つ緩やかに適合することができるリガンド結合ドメインのリガンド誘導性活性化によって核内転写制御を介さない効果が発揮されること、(iv)典型的にはより遅く且つ強力な相互作用の結果であるステロイド受容体のDNA結合ドメインのリガンド誘導性活性化によって核内転写制御を介する効果が発揮されること；(v)リガンド相互作用の核内転写制御を介さない効果が、選択的応答に影響を与えるような様式でリガンド相互作用の核内転写制御を介する効果から分離し得ることことを発見した。

30

【0072】

この先駆的発見に基づいて、ステロイド受容体のステロイド核内転写制御を介する効果からステロイド核内転写制御を介さない効果を分離する方法が得られる。1つの実施形態では、本発明は、受容体を、受容体に核内転写制御を介さない効果を媒介させる様式で受容体のリガンド結合ドメインと十分に相互作用する一方で、核内転写制御を介する効果を誘導する様式でDNA結合ドメインを活性化させない化合物に接触させる工程を含む、ステロイドの核内転写制御を介さない効果を選択的に誘導する方法を含む。別の実施形態では、受容体を、受容体に核内転写制御を介する効果を媒介させる様式で受容体のDNA結合ドメインを十分に活性化させる一方で、核内転写制御を介さない効果を誘導する様式でリガンド結合ドメインを活性化させない化合物に接触させる工程を含む、ステロイドの核内転写制御を介する効果を選択的に誘導する方法を提供する。本明細書中に開示した全ての発明のうちの1つでは、受容体はエストロゲン受容体ではないか、プロゲステロン受容体ではない。

40

【0073】

I. 定義

本明細書中で使用される、「エストロゲン化合物」は、発情ホルモンの生物活性を保有する四員環のステロイド化合物またはその結合同型およびエステル化誘導体、或いは同一の化合組成および構造を有しているが活性形態と立体化学が異なるので活性形態の生物活性を

50

保有しないそれらの誘導体をいう。エストロゲンの非限定的な例には、プロパレストロール、クロトリアニセン、ジエノエストロール、エピメストロール、エキリン、エストラプロニケート、エストロピペート、エチニルエストラジオール、フォスフェストロール、ヒドロキシエセトロン、メストラノール、エストラジオール、エストリオール、結合型およびエステル化エストロゲン、エストロン、ポリエストラジオール、プロメストリン、キネストラドール、キネストロール、スチベストロール、およびゼラノールが含まれる。

【0074】

本明細書中で使用される、「アンドロゲン」は、精巣または副腎皮質で産生することができるか合成ホルモンであり、男性の二次的な性の特徴を調節するように作用する四員環のステロイド化合物または同一の化学組成および構造を有しているが活性形態と立体化学が異なるので活性形態の生物活性を保有しない誘導体をいう。非限定的な例には、ボルデノン、クロステボール、ダナゾール、ドロスタノロン、エピチオスタノール、エチルエストレノール、フルオキシメステロン、フォルメボロン、フラザボール、メピチオスタン、メステロロン、メタンジエノン、メテノロン、メチルテストステロン、ナンドロロン、ノルエタンドロロン、オキサボロン、オキシメトロン、プラステロン、キンボロン、スタオロン、スタノゾールオール、テストステロン、およびトレンボロンが含まれる。

10

【0075】

既知のように、エストロゲンおよびアンドロゲンはキラル炭素を有するので、多数の立体化学構造で存在し得る。典型的には、例えば、17βヒドロキシエストロゲンは生物活性を有する一方で、17αヒドロキシエストロゲンは性的特徴に対して効果はほとんどない（ホルモン様遺伝子転写活性をほとんど誘導しない）。本明細書の目的のために、化合物が本発明の明記した規準を満たす限り、生物活性構造、生物不活性構造、または活性の低い構造を含む任意の立体化学構造を使用することができる。

20

【0076】

Steroids Inc.、Wilton H. H. の「ステロイド」というタイトルのカタログは、多数のエストロゲンおよびアンドロゲン誘導体を含む3000種を超えるステロイドのリストが記載されている。このカタログを、会社への連絡すれば入手することができ、現在、インターネットの<http://www.steraloids.com>で利用可能である。本発明で使用するためにこのライブラリーから選択および購入することができる（全て市販されているので容易に入手および評価できる）。

30

【0077】

本明細書中で使用される、用語「ステロイド」は、伝統的に「タンパク質の核ホルモン受容体ファミリー」と呼ばれるものの1つに結合する任意のリガンドをいう。本発明での発見に基づいて、現在、これらの受容体には核を必要とせず、実際、核外または膜上に存在する場合に、おそらく核内と同様に核内転写制御を介さない効果を誘導することができることが判明した。各受容体ファミリーの各ファミリーメンバーの名称は、Cell、97、161～163、1999で公表されており、以下の表に再現する。この論文は、核受容体命名委員会が記載した。現在、ヒトゲノムおよびプロテオームの分析によって示されるように、ヒトには少なくとも60のタンパク質ファミリーメンバーが存在することが既知であり、Nature、409、860～921、2001に発表されている。この論文は、国際ヒトゲノム配列決定協会によって記載された。1つの実施形態では、Natureの論文に記載のように、受容体はジンクフィンガーおよびリガンド結合ドメインを有する。一般に、ステロイド受容体は、可変性の高いN末端トランス活性化ドメイン（NT-TAD）、その後2つのジンクフィンガーからなる保存性の高いDNA結合ドメイン（DBD）、ヒンジ領域、および中程度に保存されたC末端リガンド結合ドメイン（CT-LBD）を有する。これらの領域は、標的ステロイド受容体に対して既にマッピングされているか、既知の技術を使用して容易にマッピングされる。

40

【0078】

【表1】

表1—核受容体の推奨される命名

スーパーファミリー 及び群	NR/遺伝子	慣用名	アセション番号
1A	NR1A1	TRα, c-erbA-1, THRA	M24748
	NR1A2	TRβ, c-erbA-2, THRB	X04707
1B	NR1B1	RARα	X06538
	NR1B2	RARβ, HAP	Y00291
	NR1B3	RARγ, RARD	M57707
1C	NR1C1	PPARα	L02932
	NR1C2	PPARβ, NUC1, PPARδ, FAAR	L07592
	NR1C3	PPARγ	L40904
1D	NR1D1	REVERBα, EAR1, EAR1A	M24898
	NR1D2	REVERBβ, EAR1β, BD73, RVR, HZF2	L31785
	NR1D3	E75	X51548
1E	NR1E1	E78, DR-78	U01087
1F	NR1F1	RORα, RZRα	U04897
	NR1F2	RORβ, RZRβ	Y08639
	NR1F3	RORγ, TOR	U16997
	NR1F4	HR3, DHR3, MHR3, GHR3, CNR3, CHR3	M90806
1G	NR1G1	CNR14	U13075
1H	NR1H1	ECR	M74078
	NR1H2	UR, OR-1, NER1, RIP15, LXRβ	U07132
	NR1H3	RLD1, LXR, LXRα	U22662
	NR1H4	FXR, RIP14, HRR1	U09416
1I	NR1I1	VDR	J03258
	NR1I2	ONR1, PXR, SXR, BXR	X75163
	NR1I3	MB67, CAR1, CARα	Z30425
	NR1I4	CAR2, CARβ	AF00932
1J	NR1J1	DHR96	U36792
1K	NR1K1	NHR1	U19360
2A	NR2A1	HNF4	X76930
	NR2A2	HNF4G	Z49826
	NR2A3	HNF4B	Z49827
	NR2A4	DHNF4, HNF4D	U70874
2B	NR2B1	RXRα	X52773
	NR2B2	RXRβ, H-2RIIBP, RCoR-1	M84820
	NR2B3	RXRG	X66225
2C	NR2B4	USP, Ultraspiracle, 2C1, CF1	X52591
	NR2C1	TR2, TR2-11	M29960
	NR2C2	TR4, TAK1	L27586
2D	NR2D1	DHR78	U36791
2E	NR2E1	TLL, TLX, XTLL	S72373
	NR2E2	TLL, Tailless	M34639
2F	NR2F1	COUP-TFI, COUPTFA, EAR3, SVP44	X12795
	NR2F2	COUP-TFII, COUPTFB, ARP1, SVP40	M64497
	NR2F3	SVP, COUP-TF	M28863
	NR2F4	COUP-TFIII, COUPTFG	X63092
	NR2F5	SVP46	X70300
	NR2F6	EAR2	X12794
3A	NR3A1	ERα	X03635
	NR3A2	ERβ	U57439
3B	NR3B1	ERR1, ERRα	X51416
	NR3B2	ERR2, ERRβ	X51417
3C	NR3C1	GR	X03225
	NR3C2	MR	M16801
	NR3C3	PR	M15716
	NR3C4	AR	M20132
4A	NR4A1	NGFIB, TR3, N10, NUR77, NAK1	L13740
	NR4A2	NURR1, NOT, RNR1, HZF-3, TINOR	X75918
	NR4A3	NOR1, MINOR	D38530
	NR4A4	DHR38, NGFIB	U36762
5A	NR5A1	CNR8, C48D5	U13076
	NR5A2	SF1, ELP, FTZ-F1, AD4BP	D88155
	NR5A3	LRH1, xFF1rA, xFF1rB, FFLR, PHR, FTF	U93553
5B	NR5B1	FTZ-F1	M63711
	NR5B2	DHR39, FTZF1B	L06423
6A	NR6A1	GCNFI, RTR	U14666
0A	NR0A1	KN1, Knirps	X13331
	NR0A2	KNR1, Knirps 関連	X14153
	NR0A3	EGON, 胚生殖腺, EAGLE	X16631
	NR0A4	ODR7	U16708
	NR0A5	Trithorax	M31617
0B	NR0B1	DAX1, AHCH	S74720
	NR0B2	SHP	L76571

(脚注) この群は、脊椎動物においてしばしばパラログスな関係の非常に関連した遺伝子を含む (RARA, RARB, RARG)。用語「イソ型」は、選択的プロモーターの利用または選択的スプライシング、または選択的翻訳の開始による同一の遺伝子由来の異なる遺伝子産物とする。

【0079】

用語「骨量」は、骨塩 (mineral) 量をいい、典型的には、二重エネルギー X 線吸収測定法 (DEXA) によって同定する。

【0080】

用語「骨強度」は、機械的な力に対する耐性をいい、椎骨圧縮強度または長骨の三点曲げを含む任意の既知の方法によって測定することができる。

【0081】

10

20

30

40

50

用語「骨質」は、非鈣化骨基質が過剰に蓄積しない正常なコラーゲン配位をいい、非脱灰骨組織形態計測を含む任意の既知の方法によって測定することができる。

【0082】

用語「抗骨吸収薬」は、破骨細胞の再構築または活性および／または寿命の抑制によって骨吸収を遮断する化合物をいう。

【0083】

用語「骨減少症」は、構造の完全性を損なう許容範囲未満の骨量の減少をいう。

【0084】

本明細書中で使用される、用語「キメラ」は、2つの異なる受容体の遺伝子配列の融合によって形成されたDNA鎖を意味する。ステロイド受容体は、DNA結合ドメインおよびリガンド結合ドメインの両方から構成される。キメラ受容体では、DNA結合ドメインがある受容体の遺伝コードから構成され、別の受容体の遺伝コードからリガンド結合ドメインが構成される。これら2つのドメインを融合して、キメラ受容体を形成する。ドメインは、異なる種または同一の種内の異なる受容体由来であり得る。

10

【0085】

本明細書中で使用される、用語「オーファン」は、アミノ酸相同性によって同定された約69受容体のファミリーをいう。オーファン受容体は、DNA結合ドメイン中に高度に保存されたアミノ酸配列を有し、受容体のリガンド結合ドメイン中に存在するコンセンサス領域を有する。ファミリーの任意のメンバーを直接活性化するリガンドが同定されていないので、これらをオーファン受容体と呼ぶ。オーファン受容体の例は、ニワトリオボアルブミン上流プロモータ転写因子(GOUP-TF)である。

20

【0086】

本明細書中で使用される、用語「代謝骨疾患」、「整形外科上の骨障害」、または「歯疾患」を、骨量の減少および／または骨および／または歯構造の崩壊によって特徴付けられる病態として定義する。

【0087】

本明細書中で使用される、用語「アポトーシス」は、形態学的基準および末端ウリジンデオキシヌクレオチドトランスフェラーゼニック末端標識(TUNEL)染色によって検出される核断片化および細胞の萎縮で特徴付けられる計画的細胞死をいう。

【0088】

本明細書中で使用される、用語「宿主」は、任意のステロイド受容体を含んでいる細胞または動物をさす。

30

【0089】

本明細書中で使用される、用語「導入遺伝子」は、動物のゲノム、特に生きた動物の哺乳動物細胞に人工的に挿入されているか挿入されようとしている遺伝物質を説明する。

【0090】

「トランスジェニック動物」は、細胞の一部に核外エレメントとして存在するか、その生殖系列DNA(すなわち、その細胞のほとんどまたは全部の核内転写制御を介する配列中)に安定に組み込まれた非内因性(すなわち、異種)核酸配列を有する非ヒト動物(通常、哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ウサギ、ハムスターなど))を意味する。異種核酸を、宿主動物の例えば胚または胚幹細胞の遺伝子操作によってこのようなトランスジェニック動物に移入する。

40

【0091】

「構築物」は、特定の核酸配列を発現させるために作製されるか他の組換えヌクレオチド配列の構築で使用する組換え核酸(通常、組換えDNA)を意味する。

【0092】

「作動可能に連結された」は、DNA配列および調節配列が適切な分子(例えば、転写活性化タンパク質)が調節配列に結合した場合に遺伝子発現するような方法で接続されていることを意味する。

【0093】

50

「作動可能に挿入された」は、目的のヌクレオチド配列が、目的の移入ヌクレオチド配列の転写および翻訳を指示する（すなわち、例えばA P P配列によってコードされるポリペプチドの産生を促進する）ヌクレオチド配列に隣接して存在することを意味する。

【0094】

「シグナル伝達経路応答性転写調節単位」は、転写アクチベータタンパク質がシグナル伝達経路の活性化に応答して調節配列に結合した場合に遺伝子を発現する調節DNA配列を意味し、これにはMAPK、κB細胞の核因子（NFκB）、JNK、AP-1、p38K、PKA、PKC、PI3-K、またはNFATシグナル伝達経路が含まれるが、これらに限定されない。シグナル伝達経路応答性転写調節単位の転写アクチベータタンパク質を、シグナル伝達経路においてタンパク質キナーゼによってリン酸化し、その後DNA調節配列に結合することができる。シグナル伝達経路応答性転写調節単位の例には、血清応答因子、アクチベータタンパク質1、cAMP応答エレメント、EボックスDNA結合エレメント、E2F DNA結合エレメント、糖質コルチコイド応答エレメント、熱ショック応答エレメント、インターフェロンγ活性化配列、インターフェロン刺激応答エレメント、活性化T細胞の核因子、κB細胞の核因子、p53応答エレメント、Rb応答エレメント、およびSTAT3応答エレメントが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0095】

本明細書中で使用される、用語「レポーター遺伝子」は、試験化合物または化学的シグナルによって転写される場合にタンパク質を産生する任意の種々の遺伝子をいう。このタンパク質を測定して転写に対する効果を同定する。レポーター遺伝子を、エストロゲン応答エレメントなどのステロイド応答エレメントの調節下でプロモータに作動可能に連結する。

20

【0096】

「ステロイド受容体の核内転写制御を介さない活性」は、受容体のDNA結合ドメインの活性化または補助転写レギュレーターとの相互作用を必要としない受容体のリガンド結合ドメインのみの急速な活性化を意味する。

【0097】

「ステロイド受容体の核内転写制御を介する活性」は、転写および翻訳のインヒビターに感受性を示すリガンド依存性転写調整を意味する。

【0098】

「ステロイド受容体関連障害」は、ステロイドまたはステロイド受容体の異常に高いまたは低い濃度、利用可能性、変異、または他の不均衡によって発症するか特徴付けられる任意のヒトまたは動物の障害、病態、または疾患を意味する。「異常に高い」は、通常十分な生理学的、生化学的、身体的、精神的、または心理学的影響による発現を超えた任意の相違を意味する。「異常に低い」は、通常十分な生理学的、生化学的、身体的、精神的、または心理学的影響による発現未満の任意の相違を意味する。好ましい実施形態では、ステロイド関連障害は、閉経後の女性の障害などのさらなるステロイド転写活性が望ましくないような障害である。ステロイド受容体関連障害は、ステロイドホルモン受容体を発現する任意の細胞、組織、器官、または系と関連し得る。

30

【0099】

II. ステロイド応答の選択的誘導法。

40

【0100】

この先駆的発見に基づいて、ステロイド受容体のステロイド核内転写制御を介する効果からステロイド核内転写制御を介さない効果を分離する方法が得られる。1つの実施形態では、本発明は、受容体を、受容体に核内転写制御を介さない効果を媒介させる様式で受容体のリガンド結合ドメインと十分に相互作用する一方で、有意な核内転写制御を介する効果を誘導する様式でDNA結合ドメインを活性化させない化合物に接触させる工程を含む、ステロイドの核内転写制御を介さない効果を選択的に誘導する方法を含む。別の実施形態では、受容体を、受容体に核内転写制御を介する効果を媒介させる様式で受容体のDNA結合ドメインを十分に活性化させる一方で、有意な核内転写制御を介さない効果を誘導

50

しない化合物に接触させる工程を含む、ステロイドの核内転写制御を介する効果を選択的に誘導する方法を提供する。天然のステロイド効果の10%未満、好ましい実施形態では天然のステロイド効果の5、1、または0.1%未満である効果である場合、リガンドは「有意な」または「実質的な」効果を誘導しないと考えられる。

【0101】

核内転写制御を介さない活性型の例には、細胞内の第2の伝令系、シグナル伝達経路、好ましくはタンパク質キナーゼシグナル伝達経路、MAPキナーゼシグナル伝達経路、Src/Shc/ERKシグナル伝達経路の活性化；細胞内カルシウム濃度の調節；分泌；細胞形態学の変化；細胞移動性；細胞骨格再配列；およびアポトーシスが含まれるが、これらに限定されない。

10

【0102】

本発明の別の態様では、リガンド結合相互作用活性をマスクする手段としての受容体上の結合部位でステロイド受容体の内因性または外因性リガンドと競合する選択的誘導化合物（ペプチド、タンパク質、またはリガンドアンタゴニストが含まれるが、これらに限定されない）を投与することができる。1つの例として、リガンドの核内転写制御を介さない効果の誘導を阻止する方法でリガンド結合ドメインと結合するペプチドまたはリガンドアンタゴニストを投与することができる。別の実施形態では、リガンドの核内転写制御を介する効果の誘導を阻止する方法でDNA結合ドメインを不活化するペプチドまたはリガンドアンタゴニストを投与することができる。選択的誘導化合物は、所望するDNA-受容体相互作用の直接的干渉またはリガンド結合ドメインまたはDNA結合ドメインとのタンパク質-タンパク質相互作用形成の間接的阻止によってステロイド受容体の転写活性を阻害することができる。さらに、選択的誘導化合物は、成分が組み合わされるように少なくとも2つの成分を有する複合体として存在することができ、複合体はステロイド受容体の核内転写制御を介する活性を不活化し、核内転写制御を介さない活性を活性化する。

20

【0103】

さらに別の実施形態では、受容体の高次構造または配置の変化の誘導によって受容体のDNA結合領域を不活化する有効量の化合物を投与する工程を含む、ステロイド受容体の選択的効果の誘導法が得られる。本発明のさらに別の態様では、受容体の高次構造または立体配置の変化を誘導することにより、受容体のリガンド結合領域のみによって媒介される機能を不活化する有効量の化合物を投与する工程を含む、ステロイド受容体の選択効果を誘導する方法が得られる。本明細書中で使用される、用語「高次構造の変化」は、受容体の三次元構造の変化をいう。用語「立体配置」は、タンパク質構造の化学変化をいう。

30

【0104】

本発明を使用して、任意のステロイド受容体ファミリー（本明細書中の表1に記載のものを含むが、特に、エストロゲン受容体の α または β 形態（ER α およびER β ）、エストロゲン受容体関連受容体1および受容体2（ERR-1およびERR-2）、アンドロゲン受容体（AR）、プロゲステロン受容体（PR）、レチノイン酸受容体（および関連オーファン受容体RORE α 、RORE β 、およびRORE γ ）；糖質コルチコイド受容体（GR）、電解質コルチコイド受容体（MR）、ビタミンD受容体、神経刺激受容体、ファルネソイドX受容体（FXR）、肝臓X受容体（LXR α およびLXR β ）、甲状腺ホルモン受容体AおよびB（トリヨードチロニン（T3）およびチロキシシン（T4）に結合する）、COUP-TF、エクジソン、PPARファミリー（PPARE α 、PPARE γ 、およびPPARE σ が含まれるペルオキシソーム増殖活性化タンパク質）、プレグナンX（「PX R」）、胆汁酸結合ファミリー、ならびにキメラ受容体およびオーファン受容体が含まれる）の応答を選択的に起こすことができる。

40

【0105】

III. 無関係の受容体を介する、ステロイドによる核内転写制御を介さない効果の誘導
本発明の別の実施形態では、ステロイドは、典型的な結合受容体以外のステロイド受容体との相互作用を介して核内転写制御を介さない効果を誘導することができることが発見された。本明細書中で使用される、用語「無関係の受容体」は、ステロイドが核内転写制御

50

を介する効果を誘導しないものをいう。これまで、定義によればステロイドは無関係の受容体を介して核内転写制御を介する効果を誘導せず、細胞の核内転写制御を介さない効果が全く不明であったので、ステロイドが無関係の受容体を作用することができることは未知であった。したがって、本発明は、受容体を所望の効果をj得るためにステロイドのリガンド結合ドメインに結合してその機能を活性化させるのに十分な無関係のステロイドに接触させる工程を含む、ステロイド受容体の核内転写制御を介さない効果を選択的に誘導する方法を含む。本明細書中に記載の任意のスクリーニング法を使用して、選択したステロイドが以前に無関係であると考えられていたステロイド受容体を介した標的核内転写制御を介さない効果を誘導することができるかどうかを同定することができる。

【0106】

10

本発明のこの態様の1つの非限定的な例では、エストロゲン受容体 (ER α および ER β) およびアンドロゲン受容体 (AR) は、結合リガンドがエストロゲンまたはアンドロゲンであるかどうかに関係なく類似の効率で骨芽細胞および骨細胞に抗アポトーシスシグナルを伝達することができることが発見された。さらに、骨芽細胞／骨細胞の場合に細胞外シグナル調節キナーゼ (ERK) の活性化を含むエストロゲンおよびアンドロゲン作用の核内転写制御を介さない受容体依存性機構が受容体の転写活性から機械的に分離可能であることが発見された。

【0107】

ステロイドは以前に無関係とみなされているステロイド受容体を使用して核内転写制御を介さない効果を誘導することができるという事実は、現在、ステロイドの核内転写制御を介さない効果が各クラスの受容体を欠く細胞または組織で発揮されるという発明の背景の例外的記載を説明する。このような場合、ステロイドは、核内転写制御を介さない効果を媒介するために無関係のステロイド受容体を使用する (勿論、この効果が全く受容体を媒介しない場合を除く)。

20

【0108】

IV. ステロイド応答を選択的に誘導する能力について化合物をスクリーニングする方法実質的にステロイドの核内転写制御を介する効果を誘導することなくステロイドの核内転写制御を介さない効果を誘導することができるか実質的にステロイドの核内転写制御を介さない効果を誘導することなくステロイドの核内転写制御を介する効果を誘導することができる化合物のスクリーニング法が得られる。本方法を、

30

(1) 化合物の実質的にステロイド受容体のDNA結合ドメインを活性化することなくステロイド受容体のリガンド結合ドメインにはば結合する能力またはステロイド受容体のリガンド結合ドメインによって媒介される機能を実質的に活性化することなくステロイド受容体のDNA結合ドメインをほぼ活性化する能力を評価する工程と、その後

(2) 試験化合物の生物活性を測定して、実質的に核内転写制御を介する効果を誘導することなく標的核内転写制御を介さない効果を誘導する能力または実質的に核内転写制御を介さない効果を誘導することなく標的核内転写制御を介する効果を誘導する能力を評価する工程とを含む、多数の方法で行うことができる。

【0109】

第1の工程を、好ましくはコンピュータ支援による分子モデリングによって行うことができる。あるいは、機能的DNA結合ドメインを欠く受容体の改変形態を使用して、試験化合物がリガンド結合ドメインまたはDNA結合ドメインを活性化するかを同定することができる。改変形態を、例えば、形質転換細胞中で発現させることができる。インビトロで培養した細胞を、ステロイド受容体またはその遺伝子変異体を発現するように遺伝子を変化させることができる。核内転写制御を介する活性を、試験化合物との反応で得られた全mRNA量または1つまたは複数のステロイド調節遺伝子に特異的なmRNAの測定などの既知の技術を使用して定量することができる。スクリーニングはインビボまたはインビトロで行い得る。

40

【0110】

あるいは、工程1および2を、インビトロ細胞ベースのアッセイにおいて実質的に他の効

50

果を誘導することなく核内転写制御を介さない効果または核内転写制御を介する効果のいずれかを選択的に誘導する化合物の簡単なアッセイによって組み合わせることができる。

【0111】

本発明のさらなる実施形態は、組織培養細胞株を細胞が適切なコンフルエンス（典型的には、約50%コンフルエンス）に達するまで増殖させる工程と；前記組織培養物を特異的受容体の適切な発現プラスミドおよび前記選択受容体に反応性を示す標的遺伝子のための発現プラスミドでトランスフェクトする工程と；前記トランスフェクト細胞を試験化合物と接触させる工程と；前記試験化合物の標的遺伝子に対する効果を同定して、前記化合物が核内転写制御を介する効果を誘導するかを同定する工程とを含む、組織培養スクリーニング系の作製法である。この実施形態の態様では、化合物が所望の核内転写制御を介する効果を誘導するかどうかは評価される。この実施形態の非限定的な例として、細胞をプロアポトーシス薬と接触させ；試験化合物に接触させたアポトーシストランスフェクト細胞数を同定し；アポトーシスを阻害し、且つ実質的に標的遺伝子の転写を誘導しない化合物を選択する。

10

【0112】

本明細書中に記載のスクリーニング法では、組織培養細胞は、生物活性が試験される受容体を欠いてもよい。この場合、失われた受容体のcDNAまたは欠失受容体のキメラを保有するプラスミドのトランスフェクションによって細胞株に失われた受容体を付加する。この受容体の応答エレメントもまた、トランスフェクションを介して付加することができる。

20

【0113】

受容体応答エンハンサーDNAエレメントを、系で使用した特定の受容体に対応する応答エレメントから選択する。

【0114】

基本プロモータは、RNAポリメラーゼIIに結合することができる「TATA」エレメントを含む最小プロモータ配列からなり任意の一般的に使用されるエレメントから選択される。例えば、チミジンキナーゼプロモータ、オボアルブミンプロモータ、およびMMTVLTRがあげられる。

【0115】

レポーター遺伝子を、タンパク質産物が容易にアッセイまたは検出される任意の種々の遺伝子から選択することができる。タンパク質を熱量測定法、蛍光法；免疫化学的方法；化学的方法、または放射化学的方法によって容易にアッセイすることができることが当業者に容易に認識される。さらに、レポーター遺伝子はキメラであり得る。使用することができる種々のレポーター遺伝子の例には、細菌酵素クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ（CAT）、 β -ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ルシフェラーゼ、ペプチドホルモン、成長因子、およびキメラタンパク質が含まれる。好ましい実施形態では、非天然タンパク質産生遺伝子を使用する。例えば、CATは通常哺乳動物細胞に存在しない酵素であり、アッセイが容易であるので、哺乳動物系で使用される。したがって、組織培養細胞におけるCATの受容体依存性活性化を使用して、受容体と直接または間接的に相互作用して遺伝子の転写を活性化させる化合物を同定することができる。

30

40

【0116】

別の実施形態では、(i)天然または人工ステロイド受容体を発現する細胞を試験化合物と接触させる工程と、(ii)試験化合物が前記ステロイド受容体の核内転写制御を介さない活性（細胞内の第2の伝令系、シグナル伝達経路、タンパク質キナーゼシグナル伝達経路、MAPキナーゼシグナル伝達経路、Src/Shc/ERKシグナル伝達経路；細胞内カルシウム濃度の調節；分泌；細胞形態学の変化；細胞移動性；細胞骨格再配列；またはアポトーシスが含まれるがこれらに限定されない）を活性化させるかどうかを評価する工程と、(iii)前記試験化合物によって誘導された転写レベルを同定する工程と、(iv)実質的に前記ステロイド受容体の核内転写制御を介する活性を活性化することなく前記ステロイド受容体の核内転写制御を介さない活性を活性化させる化合物を選択する

50

工程とを含む、ステロイド受容体関連疾患または障害の治療用化合物のスクリーニング法が得られる。ステロイド受容体の核内転写制御を介する活性が「実質的に活性化される」は、天然のステロイド受容体の10%を超える転写、好ましくは5、2、1、または0.1%未満の転写の活性化を意味する。

【0117】

別の実施形態では、(i)天然または人工性ステロイド受容体を発現する細胞を試験化合物のみまたはプロアポトーシス薬との組み合わせと接触させる工程と、(ii)試験化合物が前記ステロイド受容体の核内転写制御を介さない活性(例えば、タンパク質キナーゼシグナル伝達経路、MAPキナーゼシグナル伝達経路などのシグナル伝達経路、または一般にアポトーシスを予防する機構)を活性化させるかどうかを評価する工程と、(iii)前記試験化合物によって誘導された転写レベルを同定する工程と、(iv)前記試験化合物が試験化合物のみまたはプロアポトーシス薬との組み合わせと接触させた細胞中でアポトーシスを阻害するかを同定する工程と、(v)実質的に前記ステロイド受容体の核内転写制御を介する活性を活性化することなく前記ステロイド受容体の核内転写制御を介さない活性を活性化させる化合物を選択する工程とを含む、性ステロイド受容体関連疾患または障害の治療用化合物のスクリーニング法が得られる。

10

【0118】

さらに別の実施形態では、本明細書中にさらに記載の方法または他の既知の方法を使用して、化合物が実質的に受容体のDNA結合ドメインを活性化することなくエストロゲンまたはアンドロゲン受容体の抗アポトーシスドメインを活性化させるかどうかを評価する工程を含む、骨疾患の治療または骨量の増加に有用な化合物の選択法が得られる。好ましい実施形態では、ステロイドホルモン受容体タンパク質を、内因性DNAから発現させる。別の実施形態では、受容体配列はヒト、非ヒト、またはキメラであり得る。キメラは、少なくとも2つの異なる供給源由来の配列の混合物から構成される配列を意味する。あるいは、受容体を、特定の配列が欠失、付加、または改変されるように遺伝子を変化させることができる。

20

【0119】

別の実施形態では、ステロイドホルモン受容体のDNA結合ドメインの活性化を、受容体遺伝子に作動可能に連結された操作可能なホルモン応答エレメントをコードする非内因性DNA配列の使用によって同定する。転写レベルの測定法は当該分野で既知であり、これにはmRNAの物理的単離および定量ならびにより複雑な手順が含まれる。例えば、mRNAの産生を、逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)を使用して定量することができる。最適に行われた場合、RT-PCRを使用して非常に低レベルで産生された転写物を検出することができ、微量の出発材料でRNAを同定することができる。試薬およびRT-PCRキットは、市販されている。したがって、転写レベルに対する化合物の効果を評価するために内因性mRNAレベルを容易にモニターすることができる。本発明の他の実施形態では、ステロイド受容体と相互作用する試験化合物に応答する細胞の外観または物理的特徴の変化のアッセイによって化合物はスクリーニングされない。

30

【0120】

あるいは、遺伝子発現を、DNAマイクロアレイアッセイを使用して同定することができる。簡単に述べれば、長い二本鎖相補DNAまたはオリゴヌクレオチドの形態の核酸を、ロボット制御ピンまたは固相化学合成のいずれかを使用して顕微鏡用ガラススライドにアブライする。何万〜何十万の固有の核酸スポットを、各スライドにアブライすることができる。次いで、放射性または蛍光標識サンプル(プローブ)DNAを、スライドにアブライし、適当な時間および数回の洗浄後、ハイブリッド形成プローブ核酸を、顕微鏡またはスキャナを使用して検出する。スライド上の各スポットの核酸の正体が既知である場合、サンプル中の対応する核酸を、スライド上のスポットの位置でのシグナルの存在によって検出することができる。この方法を使用して、数千の遺伝子の発現レベルを、わずか数時間で同時に測定することができる。

40

【0121】

50

さらに別の実施形態では、選択的核内転写制御を介さないシグナル伝達のアクチベータを、(i)天然または人工ステロイド受容体を発現する細胞を試験化合物と接触させる工程と、(ii)前記試験化合物に接触させた細胞中のERK活性化量を同定する工程と、(iii)前記試験化合物に接触させた細胞中の転写量を同定する工程と、(iv)天然ステロイドに接触させた細胞の転写レベルと比較してERK活性化およびより少ない細胞の転写レベルを示す試験化合物に接触させた細胞を選択する工程とによって選択することができる。好ましい実施形態では、SRE-SERP構築物(正の読み出し)およびC3(補体3)転写(負の読み出し)を使用してERK活性化を同時に検出する高処理組み合わせスクリーニングを使用して化合物を同定する。

【0122】

10

SRE-SERPアッセイは、分泌アルカリホスファターゼ(SERP)の発現を駆動する単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(HSV-tk)プロモータの上流に存在する血清応答エレメント(SRE)の転写因子(Elk-1/SRE)誘導活性化のアッセイによってMAPK/JNKシグナル伝達経路の活性化を検出する。このアッセイは、MEK1またはMEK1のインビボアッセイ用のキットとして市販されている。一般に、トランスフェクションから24時間後、血清含有培地を約0.2%血清を含む培地と交換する。細胞を約0.2%の血清中で24時間培養後、アッセイする。コントロールサンプルを、賦形剤のみで処理する。

【0123】

本発明のさらなる実施形態は、適切な培地中で組織培養スクリーニング系を増殖させる工程であって、前記組織培養スクリーニング系の細胞株が少なくとも1つの同定された核内転写制御を介さない活性を有するステロイド受容体を含み、前記培地に試験化合物または化学的シグナルを添加する工程と、転写量および核内転写制御を介さない活性量を測定する工程とを含む、実質的に核内転写制御を介する性受容体活性を活性化することなく核内転写制御を介さない性受容体を活性化させる試験試験化合物または化学的シグナルを同定するためのアッセイである。当業者は、選択した培地は選択した細胞株に依存し、これは当該分野で既知の任意の化学的に定義され且つ細胞株に適切な培養培地であることを容易に認識する。受容体およびレポーター遺伝子を、一過性または安定なトランスフェクションのいずれかによって付加することができる。

20

【0124】

30

別の実施形態では、(i)細胞培養培地中で細胞を培養する工程であって、前記細胞がステロイド受容体を天然にまたは人工的に発現し；(ii)前記細胞を試験化合物に接触させる工程と、(iii)前記試験化合物が前記ステロイド受容体の核内転写制御を介さない活性を活性化するかを同定する工程と、(iv)前記試験化合物が前記ステロイド受容体の核内転写制御を介する活性を活性化するかを同定する工程と、(v)ステロイド受容体の核内転写制御を介さない活性を活性化するが実質的に核内転写制御を介する活性を活性化しない化合物を選択する工程を含む、ステロイド受容体の選択性リガンドのスクリーニング法が得られる。

【0125】

1つの実施形態では、細胞株はOB-6であり、核内転写制御を介さない活性を、試験化合物がアポトーシスを阻害するかどうかの評価によって同定することができる。アポトーシスは当事者に公知の方法で測定し得る。例えば、細胞を、アポトーシスと相互関係を示す核形態学の変化の評価を支援するための核に局在化した緑色蛍光タンパク質でトランスフェクトすることができる。アポトーシスを、末端ウリジンデオキシヌクレオチドトランスフェラーゼニック末端標識、in situ末端標識、ヘキスト染色、またはカスパーゼ-3活性の評価を使用して同定することもできる。さらに、核内転写制御を介さない活性を、シグナル伝達経路、好ましくはSrc/Shc/ERKシグナル伝達経路を活性化するか同定によって評価することができる。血清応答エレメントの誘導活性化が分泌アルカリホスファターゼの発現を駆動するように、核内転写制御を介さない活性マーカー、好ましくは血清応答エレメント/分泌アルカリホスファターゼ(SRE-SERP)構築物

40

50

で細胞をトランスフェクトすることができる。S R E－S E A P構築物により、転写因子（E l k－1／S R F）のアッセイによってM A P K／J N Kシグナル伝達経路の活性化が検出される。核内転写制御を介する活性の程度を、当該分野で既知の技術を使用して評価することができる。好ましい実施形態では、試験化合物に接触したステロイド受容体を単離し、特定のステロイド受容体に関連するステロイド応答エレメントに対応する核酸配列と組み合わせることができる。ステロイド－試験化合物複合体の応答エレメント配列への結合の欠如は、試験化合物が核内転写制御を介する活性に影響を与えないことを示す。非標識ステロイドまたは非標識応答エレメントを固相に固定することができ、次いで、必要に応じて標識ステロイドまたは標識応答エレメントを固相に付加することができる。10
が当業者に認識される。試験化合物の存在下での固相上の標識の検出は、試験化合物－受容体複合体は核酸に結合しないので、核内転写制御を介する活性に影響を与えないことを示す。あるいは、ステロイド受容体－試験化合物複合体を、既知の核転写因子（A P－1、N F k B、S R C－1などが含まれるが、これらに限定されない）を使用した結合アッセイに使用することができる。ステロイド受容体－試験化合物が転写因子と結合しないことは、試験化合物が核内転写制御を介する活性を阻害しないことを示す。

【0126】

本発明のさらなる実施形態は、細胞が任意選択的にステロイド受容体、核内転写制御を介する活性検出用の誘導レポーター遺伝子、または核内転写制御を介さない活性検出用のレポーター遺伝子プラスミドでトランスフェクトすることができるように複数のトランスフェクタントを使用したスクリーニング法を含む。ステロイド受容体は、1つまたは複数の20
レポーター遺伝子発現を誘導することができるように転写活性を示す。トランスフェクト細胞を試験化合物で処理した場合にレポーター遺伝子発現の変化のモニターによって核内転写制御を介する活性または核内転写制御を介さない活性に対する所望の効果について化合物をスクリーニングすることができる。例えば、第1のレポーター遺伝子構築物は、トランスフェクトステロイド受容体がステロイド応答エレメントと相互作用してレポーター遺伝子の発現を誘導するタンパク質をコードするようにレポーター遺伝子上流に応答エレメントを有することができる。細胞は、一重、二重、または三重トランスフェクタントであるか、任意の他の多重トランスフェクタントであり得る。別の実施形態では、（a）細胞を試験化合物に接触させる工程であって、前記細胞は、30
i）機能的ステロイド受容体またはステロイド受容体の遺伝子変異体をコードするD N A配列であって、前記ステロイド受容体が転写活性を示し、
i i）応答エレメント－受容体遺伝子構築物と、
i i i）血清応答エレメント－受容体構築物とでトランスフェクトされており、
（b）前記応答エレメントレポーター遺伝子構築物の転写に対する前記試験化合物の効果を同定する工程と、
（c）前記血清応答エレメント－レポーター遺伝子構築物の転写に対する前記試験化合物の効果を同定する工程と、
（d）実質的に応答エレメントE R Eレポーター遺伝子構築物の転写に影響を与えることなく血清応答エレメント－受容体遺伝子構築物の転写を活性化する化合物を選択する工程とを含む、実質的に核内転写制御を介する活性を誘導することなく核内転写制御を介さない活性を誘導するステロイド受容体のリガンドのスクリーニング法が得られる。40

【0127】

当業者は、複数のトランスフェクタントを含む1つの細胞株よりもむしろ複数の細胞株を使用して本発明を実施することができることを認識する。1つの実施形態では、転写活性ステロイド受容体および前記ステロイド受容体に転写応答する第1のレポーター遺伝子構築物でトランスフェクトした第1の細胞株を得る工程と；転写活性ステロイド受容体および第2のレポーター遺伝子構築物でトランスフェクトした第2の細胞株を得る工程であって、前記第2のレポーター遺伝子構築物の転写は核内転写制御を介さない活性、好ましくはシグナル伝達経路の活性化を示し；前記第1および第2のレポーター遺伝子構築物の転写に対する前記試験化合物の効果を同定する工程と；実質的に前記第1のレポーター遺伝40

子構築物の転写を活性化することなく前記第2のレポーター遺伝子構築物の活性化を誘導する化合物を選択する工程を含む、ステロイド受容体関連障害を治療するための化合物のスクリーニング法が得られる。

【0128】

本発明のさらに別の実施形態では、試験化合物を宿主、好ましくは哺乳動物、最も好ましくはマウスに投与する工程と；標的核内転写制御を介さない作用に対する化合物の効果を同定する工程と；ステロイド受容体によって調節される遺伝子の転写に対する化合物の効果を同定する工程と、ステロイド調節遺伝子の核内転写制御を介さない効果を媒介し、且つ実質的に転写を活性化しない化合物を選択する工程とを含む、ステロイドレポーター関連疾患または障害治療に有効な化合物のスクリーニング法が得られる。

10

【0129】

骨細胞のアポトーシスを、TUNELまたはヘキスト染色を使用した試験化合物投与後の宿主からの骨細胞の獲得によって評価することができる。さらに、骨組織形態計測を、骨組織に対する試験化合物の効果の直接且つ正確な分析に使用することができる。組織学サンプルを、通常、骨生検によって得る。骨細胞のアポトーシスに対する試験化合物の効果を、骨量または骨強度に対する試験化合物の効果の同定によって評価することもできる。骨量を、DEXAまたは末梢骨コンピュータ断層撮影法（pQCT）を使用して評価することができる。骨強度を、生化学試験を使用して測定することができる。ステロイド調節遺伝子転写の活性化を、子宮肥大活性または乳房活性に対する試験化合物の効果の同定によって評価することができる。

20

【0130】

当業者は、本発明のスクリーニング法を使用して、ステロイドの核内転写制御を介さない活性を活性化することなくステロイド受容体の核内転写制御を介する活性を活性化する化合物を同定することもできることを認識する。ステロイド受容体の核内転写制御を介さない活性は望ましくないが、核内転写制御を介する活性は望ましい場合、これらの化合物を使用することができる。したがって、これらの化合物を使用して、ステロイドの核内転写制御を介する活性が望まれるが、核内転写制御を介さない活性が望まれないステロイドまたはステロイド受容体関連疾患および障害を治療することができる。したがって、（i）天然または人工ステロイド受容体、1つの実施形態では性ステロイド受容体を発現する細胞を試験化合物に接触させる工程と；（ii）前記化合物が前記ステロイド受容体の核内転写制御を介さない活性を活性化するかを評価する工程と；（iii）前記試験化合物によって誘導された転写レベルを同定する工程と、（iv）実質的にステロイド受容体の核内転写制御を介さない活性を活性化することなく前記ステロイド受容体の核内転写制御を介する活性を活性化する化合物を選択する工程とを含む、ステロイド受容体関連疾患または障害、1つの実施形態では性ステロイド受容体関連疾患を治療するための化合物のスクリーニング法が得られる。実質的にステロイド受容体の核内転写制御を介さない活性を活性化するとは、細胞中で第2の伝令系が核内転写制御を介さない生物学的応答を誘導するような第2の伝令系の活性化を意味する。生物学的応答の例は、化学的カスケード（リン酸化、形態学の変化、分泌、増殖、DNA合成、タンパク質合成、および骨細胞再配列によるカスケードが含まれるがこれらに限定されない）である。

30

40

【0131】

V. 選択的ステロイド受容体活性を誘導する化合物の使用法。

【0132】

本明細書中に詳述している基準を満たす活性化合物を使用して、広範な種々の医学的状態を治療することができる。さらに、性ステロイド受容体を含むステロイド受容体は哺乳動物中の種々の組織（神経組織、筋肉組織、骨組織、血液、生殖組織が含まれるが、これらに限定されない）で発現することが既知であるので、本発明の活性化合物を使用して、障害が核内転写制御を介するかまたは核内転写制御を介さないいずれかのステロイド作用に関連しているこれらまたは他の組織の標的障害を治療することができる。

【0133】

50

選択された実施形態では、活性化合物を使用して心血管疾患を治療することができる。例えば、巨大および小さな動脈中の平滑筋弛緩におけるステロイドの核内転写制御を介さない活性を有する化合物を使用して、血管反応性および交感神経の均衡を調整することができる。本発明によって同定された活性化合物は、複数のステロイド受容体に対して活性であり、それぞれ異なる効果を有し得る。例えば、活性化合物は、異なるステロイド受容体の核内転写制御を介する活性を阻害することなくあるステロイド受容体の核内転写制御を介する活性を阻害することができる。同様に、ステロイド受容体の核内転写制御を介さない活性を阻害することができる一方で、異なるステロイドホルモン受容体の核内転写制御を介さない活性が活性化される。

【0134】

本発明の活性化合物を使用して、非インスリン依存性糖尿病を含むエンドクリン障害を治療し、免疫系を調整することもできる。T細胞はステロイド受容体を発現することが既知であり、活性化合物を使用して増殖疾患および感染症を治療することができる。活性化合物を使用して、癲癇、不安、うつ病、不眠症、片頭痛、記憶障害、および薬物依存症を含む神経学的障害を治療することもできる。

【0135】

活性化合物をヒトを含む宿主で骨同化薬として使用して、スポーツまたは肉体労働などの激しい身体活動のために骨を強化することができ、骨粗鬆症ではないが、宿主がこの疾患群に属する危険性があるので将来的に骨粗鬆症を罹患し得るヒトまたは他の宿主の骨を強化することができる。ヒトにおける骨同化薬の他の用途には、宿主（生まれつき骨が細いか、小さいか、通常脆弱な骨（脆弱な歯を含む）のヒト、遺伝的に骨同化疾患、身体的形態異常疾患（関節変性など）、非癒合骨折、糖尿病による身体的形態異常問題、インプラント周囲組織炎症（periimplantitis）、不十分な骨移植応答、移植、または骨折にかかりやすいヒトが含まれる）の治療が含まれる。

【0136】

これらの化合物を使用して、労働用ウマおよびイヌならびに競走などのスポーツ用の動物の骨量を増加させることができる。化合物を使用して、食肉生産で処理を容易にするために使用したニワトリおよびシチメンチョウで骨量を増加させることができる。

【0137】

代表的な代謝骨疾患は、閉経後骨粗鬆症、雄または雌の老人性骨粗鬆症、糖質コルチコイド誘導性骨粗鬆症、非可動化誘導性骨粗鬆症、無重力誘導性骨粗鬆症（宇宙飛行など）、移植後骨粗鬆症、遊走性骨粗鬆症、特発性骨粗鬆症、若年性骨粗鬆症、パジェット病、骨形成不全症、慢性副甲状腺機能亢進症、甲状腺機能亢進症、慢性関節リウマチ、ゴーストアウト疾患、マックキューン-オールブライト症候群、および種々の癌の骨溶解性転移、または多発性骨髄腫である。身体形態異常疾患は、骨量の喪失、全身の骨の脆弱、関節変性、非癒合骨折、糖尿病による身体的形態異常および歯の問題、インプラント周囲組織炎症（periimplantitis）、骨移植片／移植／骨代理材料の不十分な応答、歯周病、および骨の加齢、およびその結果である。

【0138】

本明細書中に提供した基準に従って選択した化合物を、低骨量および高い脆弱性によって特徴付けられる疾患の骨量の増大および／または骨折の予防にも使用することができる。化合物を使用して、骨芽細胞形成が減少した骨疾患状態（老人性骨粗鬆症および特に幼児および青年期（この時期の骨構成の阻止は有害である）の糖質コルチコイド誘導性骨粗鬆症など）を治療することもできる。さらに、当業者は、本発明によって同定された化合物を利用して、一般にステロイド治療、好ましくは性ステロイド治療が必要な病態を治療することができることを認識する。ステロイド治療が必要な病態には、炎症、関節炎、紅斑性狼瘡、器官移植、癌、癲癇、不安、うつ病、不眠症、片頭痛、記憶障害、薬物依存症、免疫障害、および心血管障害が含まれる。

【0139】

本発明によって選択された化合物は、転写を誘導することなくステロイドホルモン受容体

10

20

30

40

50

経路のシグナル伝達機構およびその利点を開始させ、現在のステロイド治療に関連する副作用を予防することができるので、本発明によって選択された化合物は既存のステロイド治療よりも有利である。現在の性ステロイド治療に関連する副作用の例には、望ましくない二次性特徴（雌の多毛症および雄の女性化乳房を含む）が含まれる。種々のレベルの転写活性および抗アポトーシス活性を示す化合物を、異なる病態または疾患の治療に有用であり、当業者は当該分野で一般的に既知の方法本明細書中に開示の方法を使用した特定の疾患の治療に必要な転写レベルおよび化合物の抗アポトーシス活性を容易に同定することができる。他の実施形態では、ステロイド受容体の核内転写制御を介する活性を活性化するが、ステロイド受容体の核内転写制御を介さない活性を活性化しない活性化化合物を選択することができる。これらの活性化化合物は、ステロイド受容体の核内転写制御を介さない活性が望ましくない場合に有利である。 10

【0140】

V I . キット

本発明のさらなる実施形態は、安定なトランスフェクト細胞株を有し、前記細胞株がステロイド応答レポーター遺伝子構築物を含むコンテナと、核内転写制御を介さない活性の活性化を評価するための手段と、ステロイド受容体とを含む、ステロイド受容体依存性核内転写制御を介さない活性を測定するためのキットである。キットはまた、少なくとも1つのステロイド受容体、レポーター遺伝子構築物を発現プラスミドとして含む細胞株を含んでもよい。

【0141】

1つの非限定的な例では、17β-エストラジオールは、ERK活性化およびC3転写のポジティブコントロール化合物である。ERK活性化のネガティブコントロールとしてピラゾールを使用することができ、C3転写のネガティブコントロールとしてエストレンを使用することができる。17β-エストラジオールと比較して強力なSRE-SERP活性を有するがC3-Luc活性が低いが存在しない化合物を選択する。選択基準は、C3転写に対するERK活性化の比に基づく目的の化合物の分類を含み得る。 20

【0142】

V I I . トランスジェニック動物

本発明のさらに別の実施形態では、少なくとも1つのステロイド受容体アンタゴニスト（例えば、ペプチドF6、αII、または293などのERペプチドアンタゴニスト）をコードする誘導性導入遺伝子を含み、2つのコピーをコードすることが好ましいトランスジェニック非ヒト動物が得られる。1つの実施形態では、導入遺伝子の誘導により、受容体の核内転写制御を介する性および核内転写制御を介さない性の両方が遮断される。別の実施形態では、1つまたは2つの導入遺伝子の誘導により、ステロイド受容体の転写活性が遮断される。少なくとも1つの誘導性ステロイド受容体特異的アンタゴニストを有する非ヒト動物（好ましくは、マウス）を使用して、この受容体を介して特異的に作用する疾患を治療するための化合物をスクリーニングすることができる。 30

【0143】

1つの実施形態では、(i) 少なくとも1つの誘導性受容体アンタゴニスト導入遺伝子を含むトランスジェニック動物中で少なくとも1つの受容体アンタゴニストの発現を誘導する工程と、(ii) 前記トランスジェニック動物に試験化合物を投与する工程と、(iii) 工程(ii)の動物中での核内転写制御を介さない効果の程度を同定する工程と、(iv) 工程(ii)の動物中での転写レベルを同定する工程と、(v) 前記試験化合物を投与されたトランスジェニック動物で有意に転写を増加させることなく核内転写制御を介さない効果を誘導する化合物を選択する工程とを含む、受容体応答を選択的に誘導する化合物をスクリーニング法が得られる。トランスジェニック動物の作製は、当該分野で既知である。Leeらに付与された米国特許第6,025,539号は、IL-5トランスジェニックマウスおよびトランスジェニックマウスの産生法を開示しており、その全体が本明細書中で参考として援用される。当業者は、誘導性導入遺伝子は、細胞、組織、または器官特異的であることを認識する。1つの実施形態では、導入遺伝子は、アクチンプロモ 40 50

ータによって駆動される逆テトラサイクリンリプレッサー／テトラサイクリン－ON系の調節下にあり、Gossen, M. ら、1993、Trends Biochem. Sci.、18、471～475およびGossen M. ら、1995、Science、268、1766～1769に記載されている。

【0144】

より特定の実施形態では、(i) 少なくとも1つの誘導性ERアンタゴニスト導入遺伝子を含むトランスジェニック動物中で少なくとも1つのERアンタゴニストの発現を誘導する工程と、(ii) 前記トランスジェニック動物に試験化合物を投与する工程と、(iii) 工程(ii)の動物中でのアポトーシスを受けた骨芽細胞または骨細胞数を同定する工程と、(iv) 工程(ii)の動物中での転写レベルを同定する工程と、(v) 前記試験化合物を投与されたトランスジェニック動物で有意に転写を増加させることなくアポトーシスを阻害する化合物を選択する工程とを含む、受容体応答を選択的に誘導する化合物をスクリーニング法が得られる。

10

【0145】

逆テトラサイクリンリプレッサー (rTetRまたはTET-ON) 系は、テトラサイクリンリプレッサー (TetR) - オペレーター-テトラサイクリン (Tc) 相互作用、単純ヘルペスウイルス (HSV) - VP16 転写活性化ドメイン、およびテトラサイクリン (Tc) の高い特異性をうまく利用する。従来の (TET-OFF) 系では、HeLa細胞でのレポーターアッセイで認められるように、Tc調節トランスアクチベータ (tTA) (TetRとVP16タンパク質の活性化ドメインとの間の融合) により遺伝子発現が刺激される。TcはtTAの最小プロモータ上流のtetオペロン (tetO) への結合を阻止し、その結果tTA依存性発現をオフにする。しかし、TET-ON系は、改変されたrtTAアクチベータ (Tcなど) またはVP16のオペレーターへの結合を破壊するよりもむしろ誘導する誘導体ドキシサイクリン (Dox) を利用する。TET-ON系は、テトラサイクリンへの長期曝露後に真核細胞に付与し得る任意の潜在的な毒性を回避する。

20

【0146】

別の実施形態では、ステロイド受容体の不活化が誘導されたトランスジェニック非ヒト動物が得られる。1つの実施形態では、性ステロイド受容体が骨芽細胞および骨細胞のみで不活化されるトランスジェニック動物が開示されている。Cre/loxP二成分 (binary) 組換え系は、これらのトランスジェニック動物の作製に好ましい方法である。同定されたトランスジェニック動物を、Doxに応答したCre発現への変更能力について特徴付けることができる。別の実施形態では、ステロイド受容体遺伝子の特定のエクソンのスプライシングを誘導して特異的に受容体が欠失されたトランスジェニック動物が得られる。1つの例では、ER α 遺伝子のエクソン3またはエクソン4のスプライシングを誘導して、エクソン3もしくはエクソン4または両方のエクソンがER α 欠失したトランスジェニック動物を作製する。

30

【0147】

本発明のさらに別の態様では、骨疾患の非ヒトトランスジェニック動物モデルが得られる。トランスジェニック動物は、導入遺伝子についてヘテロ接合性またはホモ接合性であり、1つまたは複数の導入遺伝子を有し得る。導入遺伝子を、誘導プロモータに作動可能に連結させることができる。本発明の他の態様では、(i) エストロゲンまたはアンドロゲンへの曝露に対する性の核内転写制御を介する効果を媒介しないDNA結合ドメインを含み、(ii) エストロゲンまたはアンドロゲンへの曝露に対する骨芽細胞または骨細胞に対する抗アポトーシス効果を誘導しないリガンド結合ドメインを含む性ステロイド受容体を含むか(i)と(ii)の両方を含むトランスジェニック動物が得られる。

40

【0148】

さらなる態様では、エストロゲン受容体の核内転写制御を介する活性および抗アポトーシス活性の両方を遮断するがアンドロゲン受容体では遮断しない導入遺伝子として少なくとも1つのポリヌクレオチドを使用する。例えば、導入遺伝子として2XF6を使用して、

50

エストロゲン受容体の活性を遮断することができるが、アンドロゲン受容体を介したエストロゲンまたはアンドロゲンの抗アポトーシス活性を保持することができる。

【0149】

V I I I . 併用療法

本発明の1つの態様では、本明細書中に記載の1つの活性化合物を第2の医薬品と組み合わせて宿主に投与して、骨疾患を含むステロイドまたはステロイド受容体関連疾患または障害を治療することができる。

【0150】

骨疾患に関して、第2の医薬品は、抗骨吸収薬、第2の骨量同化薬、抗酸化剤、栄養補助食品、または骨構造、強度、密度、または骨量に対する活性化合物の有利な効果を増大させる任意の他の薬剤であり得る。骨粗鬆症治療に使用されている10の薬物クラスの任意のメンバーを、同化ステロイド、ビスホスホネート、カルシトニン、エストロゲンもしくはプロゲステロン、抗エストロゲン（ラロキシフェンまたはタモキシフェン）、副甲状腺ホルモン（「PTH」）、フルオリド、ビタミンDもしくはその誘導体、またはカルシウム調製物を含む有効成分と組み合わせて投与することができる。

10

【0151】

組み合わせのための適切な薬剤の非限定的な例には、アレンドロン酸、クロンドロ酸二ナトリウム、エチドロネ酸二ナトリウム、メドロネ酸二ナトリウム、オキシドロネ酸二ナトリウム、二ナトリウムパミドロネート、ネリドロネ酸、リセドロネ酸、酢酸テリパラチド、チルドロン酸、イプリフラボン、重炭酸カリウム、プロゲステゲン、チアジド、硝酸ガリウム、NSAIDS、プリカマイシン、水酸化アンモニウム、酢酸カルシウム、炭酸カルシウム、カルシウム、炭酸マグネシウム、およびスクラルファートが含まれるが、これらに限定されない。グルタチオンまたは他の抗酸化剤などの還元剤もまた、本発明の任意の化合物との組み合わせに有用であり得る。本明細書中で使用される、用語「抗酸化剤」は、生理学的条件下で酸化性化合物の酸化を阻止する物質をいう。1つの実施形態では、インビトロで内因性酸素ラジカルを還元させる場合、化合物をこの開示目的の抗酸化剤とみなす。抗酸化剤を、酸素付加条件下で細胞抽出物に添加し、酸化性化合物に対する効果を評価することができる。非限定的な例として、抗酸化剤は、酸素、スーパーオキシドアニオン、過酸化水素、スーパーオキシドラジカル、リポオキシドラジカル、ヒドロキシルラジカルを除去するか、反応性金属に結合して脂質、タンパク質、核酸への酸化損傷を阻止する。

20

30

【0152】

本発明の別の態様では、本明細書中に記載の1つの活性化合物を第2の医薬品と組み合わせて宿主に投与して、ステロイド受容体関連障害を治療することができる。第2の医薬品は、ステロイド、性ステロイド、改変ステロイド、改変性ステロイド、抗生物質、抗酸化剤、栄養補助食品、またはステロイド受容体関連障害に対する活性化合物の有利な効果を増大させる任意の他の薬剤であり得る。

【0153】

I X . 薬学的組成物

本明細書中に詳述の基準にしたがって選択した選択的ステロイド効果を誘導する化合物またはその薬学的に許容可能な塩を、任意選択的に薬学的許容可能なキャリアまたは希釈剤中で、本明細書中に記載の任意の病態の治療に有効な量で投与することができる。

40

【0154】

任意の適切な全身、局所、局所送達経路（例えば、経口、非経口、静脈内、皮内、皮下、舌下、鼻腔内、吸入、膣、直腸、または局所、液体、または固体形態）で有効成分を投与することができる。本発明の化合物の投与方法は、特定の用量または徐放賦形剤によってもよい。

【0155】

化成化合物の好ましい投与様式は、経口である。経口用組成物は、一般に、不活性希釈剤または食用キャリアを含む。活性化合物を、ゼラチンカプセルに封入するか、打錠するこ

50

とができる。経口治療投与の目的のために、化合物を賦形剤に組み込み、錠剤、トローチ、またはカプセルの形態で 사용할 ことができる。薬学的に適合可能な結合剤および／またはアジュバント材料を組成物の一部として含むことができる。

【0156】

錠剤、丸剤、カプセル、トローチなどは、任意の以下の成分、または類似の性質の化合物を含み得る：微結晶性セルロース、トラガカントガム、またはゼラチンなどの結合剤；デンプンまたはラクトースなどの補形薬；アルギニン酸、プリモゲル、またはコーンスターチなどの崩壊薬；ステアリン酸マグネシウムまたは S t e r o t e などの潤滑剤；コロイド状二酸化ケイ素などの糊稠剤；スクロースまたはサッカリンなどの甘味料；および／またはペパーミント、サリチル酸メチル、またはオレンジフレーバーなどの香料。単位投薬形態がカプセルである場合、上記型の材料に加えて、脂肪油などの液体キャリアを含むことができる。さらに、単位投薬形態は、投薬単位の物理的形態を改変する種々の他の材料（例えば、糖、シェラック、または他の腸溶性コーティング）を含むことができる。

10

【0157】

化合物を、エリキシル、懸濁液、シロップ、オブラート、チューイングガムなどの化合物として投与することができる。シロップは、活性化合物に加えて、甘味料としてのスクロース、一定の防腐剤、色素、および着色料、および香料を含み得る。

【0158】

化合物またはその薬学的に許容可能な誘導体もしくは塩を、所望の作用に損なわない他の活性材料または所望の作用を補足する材料（17β-エストラジオールまたはエチニルエストラジオールなどの古典的なエストロゲン；アレンドロネート、エチドロネート、パミドロネート、リセドロネート、チルドロネート、ゾレドロネート、シマドロネート、クロドロネート、イバンドロネート、オルパドロネート、ネリドロネート、E B-1053などのニリン酸塩；サケ、ウナギ、またはヒト起源のカルシトニン；グルタチオン、アスコルビン酸、または重亜硫酸ナトリウムなどの抗酸化剤など）と混合することができる。非経口、皮内、皮下、または局所塗布に使用される溶液または懸濁液は、以下の成分を含み得る：注射用の水、生理食塩水、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の合成溶媒などの滅菌希釈剤；ベンジルアルコールまたはメチルパラベンなどの抗菌薬；エチレンジアミンテトラ酢酸（E D T A）などのキレート剤；酢酸、クエン酸、またはリン酸などの緩衝液；および塩化ナトリウムまたはデキストロースなどの張度調整剤。非経口調製物を、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジ、または複数回投与バイアルに封入することができる。

20

30

【0159】

静脈内投与する場合、好ましいキャリアは、生理食塩水またはリン酸緩衝化生理食塩水（P B S）である。

【0160】

好ましい実施形態では、化成化合物を、埋没物およびマクロカプセル化送達系を含む身徐放処方物などの体からの急速な排出から化合物を保護するキャリアを用いて調製する。生体分解性生体適合性ポリマー（エチレンビニルアセテート、ポリアンヒドライド、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸）を使用することができる。このような処方物の調製方法は、当業者に自明である。

40

【0161】

リポソーム懸濁液（モノクローナル抗体で特異的細胞の表面抗原に標的したリポソーム）もまた、薬学的に許容可能なキャリアである。これらを、例えば、米国特許第4,522,811号（その全体が本明細書中で参考として援用される）に記載の当業者に既知の方法によって調製することができる。例えば、リポソーム処方物を、無機溶媒での適切な脂質（ステアロイルホスファチジルエタノールアミン、エテアロイヅホスファチジルコリン、アラカドイルホスファチジルコリン、および／またはコレステロールなど）の溶解および蒸発、コンテナ表面上の乾燥脂質の薄膜の放置によって調製することができる。活性化合物またはその一リン酸、ニリン酸、および／または三リン酸誘導体の水溶液を、コンテ

50

ナに入れる。次いで、コンテナを手で攪拌してコンテナの端から脂質物質を遊離させて脂質凝集体を分散させることにより、リポソーム懸濁的を形成させる。

【0162】

用量および投薬計画は、代謝性骨疾患の性質、特定の活性化合物の特徴（例えば、その治療指標）、患者、患者の病歴、および他の因子に依存する。投与した核内転写制御を介さないエストロゲン様シグナル伝達化合物のアクチベータの量は、典型的には、約1 pg/kg体重～10 mg/kg体重の範囲である。有効性を最適にする一方で治療副作用に対してバランスを取るようスケジュールを進行する。「レミントンの薬学」、第17版、1990、Mark Publishing Co.、Easton, Penn; および Goodman and Gilman's、「治療の薬理学的基礎」、第8版、1990、Pergamon Pressを参照のこと。

10

【0163】

非経口投与のために、活性化合物を、最も典型的には、薬学的に許容可能な非経口用賦形剤と組み合わせた注射単位投薬形態（溶液、懸濁液、乳濁液）処方する。このような賦形剤は、好ましくは、無毒且つ非治療薬である。このような賦形剤の例は、水、生理食塩水、リンゲル溶液、デキストロース溶液、および5%ヒト血清アルブミンである。固定油およびエチルオレエートなどの非水性賦形剤も使用することができる。キャリアとしてリポソームを使用することができる。賦形剤は、張度および化学的安定性を増大させる物質（例えば、緩衝液および防腐剤）などの少量の添加物を含み得る。核内転写制御を介さないエストロゲン様シグナル伝達化合物のアクチベータを、典型的には、約10 pg/mlから10 mg/mlの濃度で賦形剤中に処方する。

20

【0164】

薬物組成物中の化合物濃度は、薬物の吸収、不活化、および排出速度ならびに当業者に既知の他の要因に依存する。投薬量もまた緩和すべき病態の重症度によって変化することに留意すべきである。さらに、有効成分を一回で投与するか、より小さな用量として多数回に分けて種々の間隔で投与することができる。任意の特定の患者のために、特定の投薬計画を個体の要求、および投与者の専門的判断、または組成物の投与の監督に従って長期にわたり調整し、本明細書中に記載の濃度範囲は例示のみを目的とし、特許請求の範囲に記載の組成物の範囲または実施の制限を意図しないことをさらに理解すべきである。

【0165】

X. 実施例

以下の実施例を本発明の種々の実施形態の例示を目的として記載し、これは、本発明を決して制限することを意味しない。

【0166】

A. エストロゲンおよびアンドロゲンは、サイトカインの転写調節を介した破骨細胞形成および間葉先祖の自己再生の転写減衰を介した骨芽細胞形成を調整する；エストロゲンおよびアンドロゲンはまた、成熟骨細胞の寿命に対する効果および破骨細胞に対するプロアポトーシス効果も発揮するが、骨芽細胞および骨細胞の抗アポトーシス効果を発揮する：後者は、「核内転写制御を介さない効果」であるが依然として受容体依存性を示す作用機構によって媒介され、転写活性から機械的に分離される。

40

【0167】

骨芽細胞に対する性ステロイドの強力な抗アポトーシス効果は、受容体依存性機構によって媒介され、SrcおよびShcキナーゼを介したERKのリン酸化を必要とする。さらに、HeLa細胞での結果は、ERα、ERβ、またはARはリガンドがエストロゲンまたはアンドロゲンであるかどうかに関係なく同一の効率で抗アポトーシスシグナルを伝達することができることを示す。典型としてERαを使用して、AF-1機能、DNA結合、このタンパク質のFおよび二量体形成ドメインは、エストロゲンの抗アポトーシス効果に重要ではないことを発見した。その代わりに、これらの効果にはEドメイン内に存在するタンパク質の一部が必要である。したがって、エストロゲン受容体の抗アポトーシス活性は、リガンド活性化レセプターによる核内転写制御を介する効果を担うタンパク質領域

50

とは異なり、それと分離可能な別の領域に存在していることになる。ERの抗アポトーシスシグナルを伝達する能力が核へのタンパク質の局在化によって喪失するという証拠もまた開示する。

【0168】

他でも核内の転写活性から独立した核オーファン受容体TR3およびERの生物学的効果が報告されている(Li, H. ら、2000、Science、289、1159～1164; Simoncini, T. ら、2000、Nature、407、538～541)。さらに、Migliaccioら(Migliaccio, A. ら、2000、EMBO J.、19、5406～5417)は、前立腺癌におけるERまたはARのSrcとの同時免疫沈澱を示した。ERの抗アポトーシス活性がSrcのSH2ドメインを必要とする一方でARはSH3ドメインを必要とするという事実と一致して、Migliaccioらはまた、ERはSrcのSH2ドメインと、ARはSH3ドメインと相互作用することを示した。本発明の結果(図2および4)は、異種リガンドによるアポトーシスの予防を1つのステロイド受容体のみでトランスフェクトした細胞で証明することができるので、アンタゴニスト間でのクロストーク、より重要には同族リガンド間のクロストーク(Migliaccioの研究では考慮されていない論点)はERとARとの複合体形成に依存しないことを強力に主張するものである。

10

【0169】

SrcおよびERKを含むMAPキナーゼシグナル伝達経路のいくつかのメンバーは、小胞中に密集している(足場タンパク質カベオリン1中に富化され、1つのシグナル伝達を分画する特定の膜陥入)(Okamoto, T. ら、1998、J. Biol. Chem.、273、5419～5422)。小胞は、ヒトおよびマウス骨芽細胞を含む種々の細胞型で見出される(Solomon, K. R. ら、2000、J. Bone Miner. Res.、15、2391～2401; Solomon K. R. ら、2000、J. Bone Miner. Res.、15、2380～2390)。最近、ERαは、カベオリン1と同時免疫沈澱することが示された(Schlegel, A. ら、1999、J. Biol. Chem.、274、33551～33556)。ERαの垂集団が、カベオリンおよびeNOS(核内転写制御を介さない作用機構を介してエストロゲンによって活性化された酵素)を含む小胞中に共存していた(Chamblyss, K. L. ら、2000、Circ. Res.、87、E44～E52)。性ステロイド受容体に対するエストロゲンおよびアンドロゲンの抗アポトーシス効果の依存性は、ERのEドメインの抗アポトーシスシグナルがこのタンパク質を膜に局在化した場合に保存されるが、核に局在化した場合に喪失するという証拠と併せて、この効果をおそらく小胞内の原形質膜に会合した古典的受容体画分を介して媒介することができることを示す。この関係は、Src、Shc、およびERKに対する現象の同時依存性の所見によって支持される。

20

30

【0170】

本明細書中に開示のデータは、ステロイド受容体の核内転写制御を介さない活性をこの転写因子の核内転写制御を介する活性と機能的に分離することができること、および合成ステロイド性または非ステロイド性化合物を使用してこれを行うことができるという初めての証明である。本発明を性ステロイドを使用して示しているにもかかわらず、当業者は、本発明をエストロゲン、プロゲステロン、アンドロゲン、糖質コルチコイド、電解質コルチコイドを含む全てのステロイドホルモンに適用して核内転写制御を介する活性から核内転写制御を介さない活性を分離可能であることを認識する。同様に、本明細書は、転写を誘導することなくアポトーシスを阻害する性ステロイド受容体を介して作用する化合物を使用した骨疾患の新規の治療を最初に開示している。1つの実施形態では、2つの活性のリガンド誘導性分離は、抗アポトーシス応答に対して核内転写制御を介する効果に影響を与える必要がある、リガンドとの物理的会合後の受容体タンパク質によって予想される異なる高次構造状態の結果である(図7)。性ステロイド受容体が骨および脳などの再生組織以外の多数の組織で見出されるので、本発明を使用して選択した化合物を使用して、性ステロイド受容体を発現する組織または器官に関連する病態を治療することができる。性ス

40

50

テロイド受容体が見出される組織の例には、下垂体および視床下部組織、筋肉組織、血球、血管、および腸粘膜が含まれるが、これらに限定されない。

【0171】

分子相互作用および細胞事象の尺度において、核内転写制御を介する応答は比較的長期の応答であるので、クロマチン構造を再モデリングし、遺伝子転写速度を変化させるために必要な複数のタンパク質-タンパク質およびタンパク質-核酸相互作用および酵素活性化の獲得に十分な安定性および寿命を有する複合体を生成するための結合ポケット中のホルモンへの精密な適合を含む古典的リガンド-受容体相互作用が必要であると考えられる（図7、右端の複合体）。このような安定且つ寿命の長いリガンド-受容体複合体の形成には、エストロゲンおよびアンドロゲンの古典的核内転写制御を介する効果の特徴付ける周知の特異性および異なる薬理学により導かれる厳密なリガンド構造が必要である。 10

【0172】

対照的に、核内転写制御を介さない抗アポトーシス応答の基礎となるERK活性化は非常に急速であり、非常に一過的なリガンド-受容体複合体により導かれたあまり完全に作製されていないかより広い範囲の高次構造に影響を受け得る（図7、左端の複合体）。このような一過性種の形成には、リガンドが受容体に短時間会合して要することのみが必要であり得るので古典的結合親和性アッセイによって評価されたリガンドの親和性を同定する結合定数と解離定数との比よりもむしろリガンド結合定数に支配される。リガンド結合定数は解離定数よりもさらに類似しているので（Binddal R. D. ら、1987、J. Steroid Biochem., 28, 361~370; Raynaud JP ら 20、1978、Cancer Res., 38, 3044~3050）、このような短期間の複合体の形成は、構造特異性および潜在性／親和性順位（ranking）が非常に減少し、抗アポトーシス応答が現れる。

【0173】

リガンドに誘導された急速な応答は長期応答とは異なる潜在性を示し得るとする考えは、興味深い先例である。未成熟ラットの子宮のエストロゲン刺激の結果として起こる事象の経時変化では、吸水膨潤および初期RNA合成などの初期応答の誘導におけるエストラジオールおよびジメチルスチルベストロールなどの短期作用エストロゲンはエストラジオールおよびジエチルスチルベストロールなどの長期作用エストロゲンの等価であるのに対して、DNA合成および子宮成長などの後期応答の誘導における長期作用エストロゲンよりも著しく効力が低い（Katzenellenbogen BS ら、1979、Prog. Horm. Res., 35, 259~300; Katzenellenbogen BS ら、1978、Mol. Cell. Endocrinol., 10, 103~113）。実際、用語「妨害エストロゲン」は、短期応答と長期応答との間の潜在性のこの特徴的变化を説明するために作り出された。これらの相違は、長期応答を誘導するためのリガンドによる継続的および長期受容体占有の必要性を説明する一方で、一過性占有は、短期応答の誘導に十分であることを示す。 30

【0174】

生物学的にはより離れているが、本研究で記載した事象のタイムスケールにさらに関係するのは、酵素の「遅く且つ強固な結合インヒビター」の概念である（Szedlacssek, S. E., 1995、Methods Enzymology, 249, 144~180; Morrison, J. F., 1988、Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol., 61, 201~301）。多くの場合、酵素を、比較的広範囲のリガンドによって急速且つ有効に阻害することができ、そのうちの幾つがのみがゆるやかにより安定な複合体を形成する。したがって、急速に形成された最初の酵素-インヒビター（「ファーストローズ（fast-loose）」）複合体は、核内転写制御を介さない応答において本明細書中に示した緩やかな特異性を示すが、スロータイト（slow-tight）複合体は核内転写制御を必要とする古典的に認識されている性特異的且つ安定な複合体に類似している。 40

【0175】

骨芽細胞および骨細胞に対する性ステロイドのインビトロ抗アポトーシス効果と一致して、エストロゲンまたはアンドロゲンの喪失により、いずれかの性由来の性腺摘出マウスにおいて骨芽細胞および骨細胞の寿命が短くなる。エストロゲン喪失後の骨細胞のアポトーシスの増加は、ラットおよびヒトで以前に示されており (Noble, B. S. and Reeve, J., 2000, Mol. Cell Endocrinol., 159, 7~13)、破骨細胞に対するエストロゲンのプロアポトーシス効果およびエストロゲン欠失におけるその寿命の延長とは対照的である (Hughes, D. E. ら、1996, Nat. Med., 2, 1132~1136; Kameda, T. ら、1997, J. Exp. Med., 186, 489~495)。骨形成細胞の作用期間 (working life) の短縮および骨吸収細胞の作用器官の延長は、一部は、性ステロイドの喪失の結果としての骨吸収と形成との不均衡で説明することができる。さらに、骨細胞アポトーシスの増加により、骨細胞/小管機構の機械感覚の障害によって骨がさらに脆弱になり得る (Manolagas, S. C. (2000) Endocr. Rev. 21, 115-137)。実際、おそらく、内因性細胞と同様に剪断ストレスおよびエストロゲンに対する応答によって主に調節される骨細胞もまたERK活性化に伴う伸長に応答するので、エストロゲンのシグナルおよび機械的重圧のシグナルが骨に組み込まれるようである。

10

20

30

40

50

【0176】

合成リガンドでの性ステロイド受容体の核内転写制御を介する活性からの核内転写制御を介さない活性の分離により、望ましくない性ステロイド作用から望ましい作用の新規の分離法がえら得るので、改良された薬物療法薬が得られる。特に、組織特異的リガンド (SERM) または古典的エストロゲンまたはアンドロゲンと対照的に、ERまたはARの機構特異的リガンドは、骨減少のマネジメントのための有利な薬物療法薬のクラス (抗吸収と対照的な真の同化性および中性を示す) である。

【0177】

B. マウス。4月齢の雌スイスーウェブスターマウスまたは5月齢の雄SAMRIマウスを維持し、実験動物の世話および使用についてNIHガイドラインにしたがって使用した。マウスを擬給食操作または両側卵巣摘出または精巣摘出に供する。4または3週間後、雌または雄マウスをそれぞれ屠殺し、腰椎を取り出した。

【0178】

非脱灰骨切片中のアポトーシス骨芽細胞および骨細胞の定量
以前に記載のように (Weinstein, R. S. ら、1998, J. Clin. Invest., 102, 274~282; Jilka, R. L. ら、1999, J. Clin. Invest., 104, 439~446)、クレノウFrageL検出キット (Oncogene) を使用したTUNEL染色によって椎骨 (L1~L5) の非脱灰プラスチック包埋切片中にアポトーシス骨芽細胞および骨細胞を検出した。成長プレートの底に認められたTUNELポジティブ肥大性軟骨細胞を各骨切片の内部ポジティブコントロールとして使用した。

【0179】

細胞培養

コラゲナーゼ消化によって新生児マウスの頭蓋冠から骨芽細胞を獲得し、10% FBSを含む α MEM中で2から3日培養し、トリプシン-EDTAを使用して再懸濁し、使用まで凍結した。骨細胞MLO-Y4細胞 (Kato, Y. ら、1997, J. Bone Miner. Res., 12, 2014~2023) を、2.5% FBS、2.5% ウシ胎児血清を補足した無フェノールレッド α MEMで培養し、コラーゲンI型被覆プレート上で培養した。骨芽細胞OB-6細胞 (Lecka-Czernik, B. ら、1999, J. Cell. Biochem., 74, 357~71) を、5% FBSを補足した無フェノールレッド α MEMで培養した。HeLa細胞を、10% FBS、0.1mM非必須アミノ酸、および1mMピルビン酸ナトリウムを補足した無フェノールレッド α MEMで培養した。

【0180】

インビトロでのアポトーシス細胞の定量

以前に記載のように (Plotkin, L. ら、1999、J. Clin. Invest.、104、1363～1374; Jilka, R. L. ら、1998、J. Bone Miner. Res.、13、793～802; Jilka, R. L. ら、1999、J. Clin. Invest.、104、439～446)、アポトーシス細胞を、トリパンブルー染色または核形態の変化についての直接視覚化 (トランスフェクトHeLa細胞の場合) によって定量した。後者の方法では、核濃縮または断片化核の視覚化を、核局在化タンパク質を含む増強蛍光タンパク質 (緑色または赤色) (EGFP-nucおよびERFP-nuc) を同時トランスフェクションしたカバーガラス上にプレートの細胞を用いて容易にした。3.7%のホルムアルデヒドでの固定後、アポトーシス%を、200から500個のトランスフェクト (蛍光) 細胞の核形態学の同定によって同定した。 10

【0181】

Anoikisアッセイ

以前記載のように (Klein, C. E. ら、1991、J. Cell Biol.、115、1427～1436)、骨芽細胞OB-6細胞 (3.3×10^5 /ml) を、I型コラーゲンゲルで培養した。ゲル形成後、スパチュラを用いてウェルの底から細胞を引き離し、0.5mlの α MEM (10%、FBS、200 μ Mアスコルビン酸、賦形剤 (0.1%エタノール) またはステロイドのいずれかを含む) を重層した。固定後、10 μ mの切片を切断し、アポトーシス細胞を、TUNEL染色を使用して定量した。

【0182】

ウェスタンブロット分析

ERK1/2のリン酸化状態を、チロシンリン酸化ERK1/2を認識するマウスモノクローナル抗体または全ERK1/2を認識するウサギポリクローナル抗体を使用したウェスタンブロッティング、その後の西洋ワサビペルオキシダーゼに接合した抗マウスまたは抗ウサギ抗体のいずれかとのインキュベーションによって分析した。 20

【0183】

DNA構築物

2.25KbのヒトIL-6プロモータ、3コピーのビテロゲニンERE配列、またはホタルシフェラーゼ遺伝子を駆動する補体3プロモータを保有するレポータープラスミド (それぞれ、IL-6-luc、ERE-luc、およびC3-luc) を使用して、ステロイドの転写効果をアッセイした。 α IIまたは2コピーの293 (2×293)、または2コピーのF6 ($2 \times F6$) またはSV40プロモータによって駆動されるGAL4 DNA結合ドメインに融合したGRIPを保有するERペプチドアンタゴニストの発現プラスミドは以前に記載されている (Norris, J. D. ら、1999、Science、285、744～746)。ペプチド配列は、Changら、1999、「Mol. Cell Biol.、19、8226～8239 (その全体が本明細書中で参考として援用される) に開示されている。ペプチド α IIの配列は、 30

【0184】

【化1】

SSLTSRDFGSWYASR (配列番号: 1)

である。ペプチド293の配列は、

【0185】

【化2】

SSIKDFPNLISLLSR (配列番号: 2)

である。ペプチドF6の配列は、

【0186】

【化3】

GHEPLTLERLLMDDKQAV (配列番号: 3)

である。ペプチド G R I P の配列は、

【0187】

【化4】

HSRLHDSKGQTKLLQLLTTKSDQMEPSPLPSSLSDTNKDSTGSLPGPGSTHGT

SLKEKHKILHRLLDSSSPVDLAKLTAEATGKELSQESSSTAPGSEVTVKQEP

ASPKKKENALLRYLLDKDDTKDIGLPE (配列番号: 4)

10

である。同様に、ER α 変異体の発現プラスミド $\Delta A/B$; S104、106、118A; ΔF ; S554fs; ΔDBD ; またはL525Aは、以前に報告されている (Schodinn, D. J. ら、1995、J. Biol. Chem.、270、31163~31171; Ekena, K. ら、1996、J. Biol. Chem.、271、20053~20059; Montano, M. M. ら、1995、Mol. Endocrinol.、9、814~825; Montano, M. M. and Katzenellenbogen, B. S. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、94、2581~2586; McInerney, E. M. and Katzenellenbogen, B. S. ら、J. Biol. Chem.、271、24172~24178; Le Goff ら、1994、J. Biol. Chem.、269、4458~4466; Wrenn, C. K. and Katzenellenbogen, B. S.、1993、J. Biol. Chem.、268、24089~24098; Ince, B. A. ら、1993、J. Biol. Chem.、268、14026~14032)。ER α のDEおよびE変異体の構築のために、アミノ酸263~53および333~553にそれぞれ対応するヌクレオチドを、PCRによってER α から増幅した。正方向プライマーは、Sal Iの制限部位、およびER α コザック配列を含み、逆方向プライマーは、Bam H I制限部位を含んでいた。増幅PCR産物を、pCMVのSal I/Bam H I制限部位にサブクローニングした。

20

【0188】

ER α -ECFP、E-ECFP、E-Nuc-ECFP、およびE-Mem-ECFP 30
構築物を、プライマー対

【0189】

【化5】

5'-GCCGCTAGCACCATGACCATGACCCTCCAC-3' (配列番号: 5) および

5'-GCCACCGGTCTGACTGTGGCAGGGAAACC-3' (配列番号: 6) または

5'-GCCGCTAGCACCATGAAGAACAGCCTGGCCTTG-3' (配列番号: 7) および

5'-GCCACCGGTCTAGTGGGCGCATGTAGGCG-3' (配列番号: 8)

を使用したER α のPCR増幅によって作製した。PCR産物を、Nhe IおよびAge Iで消化し、適切なECFPベクターの同一の部位に挿入した。E-Mem-ECFPを作製するために、原形質膜に融合タンパク質を標的するシステイン3および4の翻訳後パルミトイル化シグナルを含むニューロモジュリンのN末端20アミノ酸を保有するMem-ECFPベクター (Clontech) にEをクローン化した。E-Nuc-ECFPを作製するために、ECFPのC末端に融合したサルウイルス40巨大T抗原の核局在化シグナルの3つのコポー保有するNuc-ECFPベクター (Clontech) にEをクローン化した。ER α -ECFPおよびE-ECFPの作製のために、核局在化シグナルを、Bg I I I/Bam H I消化および再結合によってNuc-ECFPベクターから除去して、ECFPを作製した。次いで、ER α またはE PCR産物を、ECFPのNhe I/Age I部位にライゲートした。すべてのPCR増幅領域の完全な配列を、配列 40

50

決定によって実証した。Src A S H 3、Src A S H 2、および Src K 2 9 5 M (Src K⁻) の c D N A は、William C. Home 博士、イェール大学 (Zhang, Z. ら、2000、J. Biol. Chem.、275、479～486) から賦与された。wt および Shc 変異体を、K. S. Ravichandran 博士、バージニア大学 (Walk S. F. ら、1998、Eur. J. Immunol.、28、2265～2275) から入手した。dnMEK を、N. G. Ahn 博士、コロラド大学 (Mansour, S. J. ら、1994、Science、265、966～970) から入手した。

【0190】

一過性トランスフェクション

HeLa 細胞を、 $5 \times 10^4 / \text{cm}^2$ でプレートし、16 から 24 時間後、リポフェクタミン (Life Technologies Inc.) を使用して $3 \mu\text{g}$ の DNA の全量でトランスフェクトした。4 から 6 時間のインキュベーション後、トランスフェクション混合物を 10% 活性炭処理血清を含む新鮮な培地と交換し、処理を開始した。以前に記載のように (Potttatz, S. T. ら、1994、J. Clin. Invest.、93、944～950)、IL-6 転写分析を行った。ERE または C3 媒介転写のために、トランスフェクト細胞を E_2 で処理し、24 時間後にルシフェラーゼおよび β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。

【0191】

胚線維芽細胞における ER および AR の RT-PCR 分析

以下のプライマー

【0192】

【化6】

:ER α (350 bp) 5'-TCTGCCAAGGAGACTCGCTACTGT-3' (配列番号: 9)

および 5'-CTTGCCAAAGGTTGGCAGC-3' (配列番号: 10);

ER β (162 bp) 5'-GAAGTGCCAGCGAGCAGGTG-3' (配列番号: 11) および

5'-TGCTGGGACGGCTCACTAGCACAT-3' (配列番号: 12);

AR (615 bp) 5'-TGTGTGGAAATAGATGGG-3' (配列番号: 13) および

5'-TACATGTGGTCAAGTGGG-3' (配列番号: 14); および β アクチン (200 bp)

5'-TGGAGAAGAGCTATGAGCTGCCTG-3' (配列番号: 15) および

5'-GTGCCACCAGACAGCACTGTGTTG-3' (配列番号: 16)

を使用した。

【0193】

統計分析

スチューデント t 検定を使用して、骨細胞アポトーシスのインビボ変化を評価し、分散の等価性およびデータの正規分布の確立後、群平均 ($n = 4 \sim 5$) の間の有意差を評価した。インビトロアポトーシスアッセイのデータを、ANOVA で分析し、スチューデント-ノイマン-クールズ法を使用して、平均の有意差レベルを評価した。ステロイド効果が使用したプロアポトーシス薬に依存するかを確立するために、図 1 C および 1 D のデータを、2 つの変数がプロアポトーシス薬 (賦形剤、デキサメタゾン、エトポシド、および TNF α) および予備処理物質 (賦形剤、 E_2 、および DHT) である二元置換 ANOVA によって分析した。その後、ボンフェローニ法を使用して、予備処理物質-薬剤組み合わせ間の有意差を評価した。

【0194】

実施例 1

インビボおよびインビトロでのエストロゲンまたはアンドロゲンによる骨芽細胞および骨

10

20

30

40

50

細胞アポトーシスの調節

擬給食コントロールと比較してマウスの卵巣摘出または精巣摘出による脊椎骨芽細胞アポトーシスが10倍および8.3倍、骨細胞アポトーシスは4倍および3.5倍にそれぞれ増加した(図1A)。これらの変化は、 17β -エストラジオール(E_2)を投与した卵巣摘出マウスで阻止された(データ示さず)。これらの効果の機構を解明するために、初代頭蓋冠細胞培養物および骨細胞株をインビトロモデルとして使用した。 E_2 または5 α -ジヒドロテストステロン(DHT)のいずれかは、 $10^{-9} \sim 10^{-8}$ Mで最大の効果を示すような用量依存様式で、頭蓋冠細胞のエトポシド誘導アポトーシスを阻害した(図1B); MLO-Y4細胞で同一の結果が得られた(示さず)。 E_2 またはDHTは、任意の3つの異なるプロアポトーシス刺激(エトポシド、デキサメタゾン、またはTNF; Fas-Fasリガンド(データ示さず))によって誘導した場合、頭蓋冠由来マウス骨芽細胞(図1C)または骨細胞株MLO-Y4(図1D)のアポトーシスを予防した。

【0195】

骨芽細胞および骨細胞のインビボでのアポトーシスの発症を調節するシグナルは未知である。しかし、細胞のそのマトリックスとの相互作用(特に、コラーゲン-インテグリン相互作用)は、細胞の生存またはアポトーシスによる自殺過程開始決定の重要なインビボでの合図であることを示唆する証拠が存在する。この現象はアノイクスと呼ばれている(Frisch, S. M. and Ruoslahti, E., 1997, Curr. Opin. Cell Biol., 9, 701~706)。したがって、I型コラーゲングル中で培養した骨髄由来骨芽細胞株(OB-6)を使用したアノイクスに対する性ステロイドの効果の研究した(図1E)。この系では、アポトーシスは、コラーゲン格子収縮の際のインテグリンシグナル伝達の喪失に起因する。他のプロアポトーシスシグナルの場合と同じく、 E_2 またはDHTのいずれかは、わずか 10^{-11} Mの濃度で用量依存的にアノイクスを減衰させる。

【0196】

実施例2

ER(α または β)またはARは、リガンドがエストロゲンまたはアンドロゲンであるかに無関係に同一の効率で抗アポトーシスシグナルを伝達する。エストロゲン受容体アンタゴニストICI 164,384またはアンドロゲン受容体アンタゴニストフルタミドは、頭蓋冠細胞中で E_2 およびDHTの抗アポトーシス効果を遮断し、これは、性ステロイドの効果がERおよびARによって媒介されたことを強力に示す。しかし、驚いたことに、 E_2 の抗アポトーシス効果もまたフルタミドによって、DHTの効果もICI 164,384によって排除された(図2A)。この予想外の結果と一致して、他でもICI 164,384を含む抗ホルモンがステロイド受容体の複数のクラスと相互作用することが示されている(Nawaz, Z., 1999, Cancer Res., 59, 372~376)。

【0197】

ERおよびARに対する E_2 およびDHTの抗アポトーシス効果の依存性を確立し、アンタゴニストを使用して予想外の結果が得られた各受容体の役割を詳細に分析するために、ERもARも発現しないHeLa細胞を使用した研究を行った。これらの実験では、HeLa細胞を、核局在化配列(EGFP-nuc)を含む増強緑色蛍光タンパク質およびER α 、ER β 、またはAR発現構築物のいずれか、または空のベクターコントロールで一過性にトランスフェクションさせた(図2B)。 E_2 およびDHT(10^{-12} M~ 10^{-8} M)はいずれも受容体を含まないベクター(空のベクター、ev)でトランスフェクトした細胞におけるエトポシド誘導性アポトーシスに対する効果は認められなかった。しかし、ER(α または β)またはARのいずれかでトランスフェクトするが、ビタミンD受容体(VDR)またはレチノイドX受容体(RXR)でトランスフェクトしていないHeLa細胞では、 E_2 またはDHTは共に同程度の濃度で用量依存様式にてアポトーシスを予防した。興味深いことに、 $1,25(OH)_2D_3$ は、VDRまたはRXRでトランスフェクトしたHeLa細胞においてアポトーシスを予防したがERまたはARでは予防

されなかった。アポトーシスを誘導するためのデキサメタゾンを使用して、同一の結果が得られた。

【0198】

骨芽細胞の初代培養物を用いた実験では、ICI 182, 780またはフルタミドは、HeLa細胞がER α またはARでトランスフェクトされていることとは無関係に、HeLa細胞でE₂またはDHTの効果を除いた。これらの結果は、エストロゲンの抗アポトーシス効果についてのER(α または β)またはARの要求性を明瞭に確立する。さらに、このデータにより、性ステロイドの核内転写制御を介さない効果を担う受容体は実際には古典的受容体タンパク質である(すなわち、代替タンパク質よりもむしろエストロゲンまたはアンドロゲンの再生機能を媒介する)ことが示唆される。より重要には、これらの所見は、古典的ERおよびARのいくつかの作用が性非特異的であることを示す。アンドロゲンによるERおよびエストロゲンによるARの転写調節は、最近乳癌細胞で記載されている(Maggiolini, M. ら、1999、Cancer Res.、59、4864~4869)が、この現象を、いくつかの細胞における特異的受容体の同時アクチベータの発現によって説明することができる(Yeh, S. ら、1998、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、95、5527~5532)。本明細書中に示した結果は、古典的ERおよびARの核内転写制御を介さない作用は性非特異的であることの最初の証明を示す。ERまたはARによるエストロゲンまたはアンドロゲンの性非特異的シグナル伝達により、雌および雄の成体骨における性ステロイドのいずれかのクラスの効率ならびにげっ歯類およびヒトにおけるERの多義的表現型、またはアロマターゼ欠失または変異が説明されるようである。

【0199】

実施例3

ER α の抗アポトーシス活性は、E(リガンド結合)ドメイン内に存在し、タンパク質の核外局在化を必要とする

典型としてER α を使用して、性ステロイド受容体の抗アポトーシス活性が、転写活性が必要とするドメインと同一または異なるドメインを必要とするかを同定した(図3A)。アポトーシスの予防に対するER α のいくつかの変異体の効果を同定した。これらのいくつかの変異体は以前に記載されており、ヒト細胞(本研究で使用したHeLa細胞など)に一過性にトランスフェクトした場合に予想されるタンパク質を産生することが示されている(Schodin, D. J. ら、1995、J. Biol. Chem.、270、31163~31171; Kraus, W. L. ら、1997、J. Steroid Biochem. Mol. Biol.、63、175~188; Ekena, K. ら、1996、J. Biol. Chem.、271、20053~20059; Ekena, K. ら、1997、J. Biol. Chem.、272、5069~5075; Montano ら、1995、Mol. Endocrinol.、9、814~825)。示していない実験では、DEまたはEDドメインを含む変異体も予想されるタンパク質を産生し、転写活性を欠くことが確立された。

【0200】

ER α と同様に、全N末端転写活性化機能(AF-1)ドメインを欠く変異体 $\Delta A/B$ 、セリン104、106、および118がアラニンに置換された変異体(S104、106、118A)、またはカルボキシ末端の全Fドメインを欠く変異体 ΔF 、またはDNA結合ドメイン(アミノ酸185~251)の一部を欠く変異体 ΔDBD は、E₂結合ERの抗アポトーシスシグナルを伝達することができる。さらに、これら全ての変異体は、ERE媒介遺伝子転写活性が減少しているか存在しない(Montano, M. M. and Katzenellenbogen, B. S.、1997、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、94、2581~2586; Le Goff ら、1994、J. Biol. Chem.、269、4458~4466; McInerney, E. M. and Katzenellenbogen, B. S. ら、(1996) J. Biol. Chem.、271、24172~24178; Montano ら、1995、Mol

. *Endocrinol.*、9、814～825)。より印象的には、リガンドの抗アポトーシスを伝達する能力は、AF-1およびDNA結合ドメイン(DE)を欠く欠失変異体ならびにAF-2/リガンド結合ドメイン(E)のみを含む欠失変異体で保存されていた。対照的に、ホルモン結合能力を欠くER変異体L525A(Ekenaら、1997、*J. Biol. Chem.*、272、5069～5075)およびC末端転写活性化機能(AF-2)が欠失した変異体S554fs(Schodininら、1995、*J. Biol. Chem.*、270、31163～31171; Inceら、1993、*J. Biol. Chem.*、268、14026～14032、Wrenn and Katze nell enb ogen、1993、*J. Biol. Chem.*、268、24089～24098)は、抗アポトーシスシグナルおよびタンパク質の転写活性の両方を伝達させる能力を喪失していた(Ekena, K. ら、1996、*J. Biol. Chem.*、271、20053～20059; Schodininら、1995、*J. Biol. Chem.*、270、31163～31171)。これらの結果は、タンパク質のリガンド結合領域(ドメインE)内のER残基の「抗アポトーシス」ドメインおよびその抗アポトーシス活性は、ERの転写活性に重要な一定のN末端A/Bドメイン部位のリン酸化を必要としないことを示す。

10

【0201】

次に、Eドメインの抗アポトーシス活性がその特定の細胞内区画への局在に依存するかを同定した(図3B)。このドメインを、原形質膜または核局在化配列をそれぞれ含む増強シアン蛍光タンパク質への融合によってHeLa細胞の原形質膜または核に標的した。落射蛍光顕微鏡(epifluorescence microscopy)によって明らかになったように、非標的化ER α および非標的化Eは、核および細胞質中に類似のシアン蛍光分布を示し、これは、ほとんどのERリガンド結合ドメインの除去により細胞内分布が変化しないことを示している。しかし、同一の細胞におけるシアンおよび赤色蛍光の分布の比較および対比から認められるように、適切な標的配列の組み込みにより膜または核ECFP融合タンパク質の所望の細胞内局在化が達成された。Eドメインまたは全長ER α と同一なこの融合タンパク質の抗アポトーシス活性によって証明されるように、原形質膜へのEドメインの支配的標的化により、リガンド誘導性抗アポトーシスシグナルを伝達する能力は変化しなかった。しかし、非常に対照的には、細胞核へのEドメインの排他的な標的化により、その抗アポトーシス活性が完全に喪失した。

20

30

【0202】

実施例4

ERおよびRの抗アポトーシス活性は、Src/Shc/ERKシグナル伝達経路によって媒介される。

【0203】

E₂またはDHTはMLO-Y4細胞でのERKのリン酸化を急速かつ一過性に増加し、5分で効果は最大となり、15分でベースラインに戻った(図4A)。マウス頭蓋冠骨芽細胞を使用して同一の結果が再現された(示さず)。E₂またはDHTによるERKリン酸化の誘導は、ERK、PD9809、およびUO126のリン酸化の特異的インヒビター(示さず)ならびにSrcファミリーチロシンキナーゼインヒビターPP1によって遮断された。さらに、PD98059およびPP1は共にE₂およびDHTの抗アポトーシス効果を完全に排除し、これは、ERKリン酸化およびSrcキナーゼ活性が両方の性ステロイドの抗アポトーシス効果に必要なことを示す。性ステロイドの抗アポトーシス効果におけるSrcキナーゼの不可欠な役割についての確認された証拠は、yesおよびFyn(Sorinaoら、1991、*Cell*、64、693～702)も欠くSrc-/-マウス由来のERおよびAR発現胚線維芽細胞の発見によって得られ、Src+/+野生型コントロールと異なり、E₂またはDHTの抗アポトーシス効果に応答しなかった(図4B)。

40

【0204】

性ステロイド受容体(ERまたはARのいずれか)ならびにSrc/ERKシグナル伝達

50

経路に対する E_2 および DHT の抗アポトーシス効果の同時依存性を、HeLa 細胞で証明した (図 4 C および D)。PD98059 またはドミナントネガティブ (dn) MEK の同時トランスフェクション、ERK のリン酸化を担うキナーゼは、ER α または AR でトランスフェクトした HeLa 細胞において E_2 または DHT 効果を排除した (図 4 C)。同様に、 E_2 または DHT の効果は、ER α または AR でトランスフェクトしたがキナーゼ活性を欠く Src 変異体で同時トランスフェクトした HeLa 細胞で排除された (SrcK) (図 4 D)。より印象的には、SH2 ドメインを欠く Src 変異体 (Src ASH2) は、リガンド活性化 ER α の抗アポトーシス活性を排除したが、AR のそれは排除されなかった。対照的に、SH3 ドメインを欠く Src 変異体 (Src ASH3) は、AR の抗アポトーシス活性を排除したが、ER のそれは排除しなかった。同様に、 E_2 または DHT 活性化 ER α の抗アポトーシス活性は、3 つ全てまたは Shc リン酸化の最初の部位である 3 つのチロシン (Y239、Y240、および Y317) の 3 番目がフェニルアラニンに置換されているドミナントネガティブ Shc 変異体によって排除された。しかし、チロシン 239 および 240 (317 ではない) が変異した場合、受容体の抗アポトーシス活性は影響を受けなかった (図 4 E)。

10

【0205】

ER の E ドメインがその抗アポトーシス活性に十分であることに一致して (図 3)、このドメイン (PD98059、dn MEK、SrcK、Src ASH2、または Src ASH3) によってトランスフェクトされた HeLa 細胞は、全長 ER α でトランスフェクトされた HeLa 細胞と厳密に同一の効果を示した (図 4 C および D)。

20

【0206】

実施例 5

ペプチドアンタゴニストを使用した ER α の抗アポトーシス活性からの転写活性の分離 McDonnell とその共同研究者は、以前に、異なるリガンド活性化 ER 部位に結合し、ER α を選択的に遮断することができるが、コンセンサス ERE (エストロゲン応答エレメント) を試験した場合にそれと逆に ER β 媒介転写を遮断することができないいくつかのクラスの小さな (11 から 19 個のアミノ鎖) ペプチドを単離した (Norris, J. D. ら、1999、Science、285、744~746; Chang, C. ら、1999、Mol. Cell Biol.、19、8226~8239)。これらのペプチドの E_2 の抗アポトーシス効果を遮断する能力を試験した (図 5)。並行実験では、ERE 駆動ルシフェラーゼ構築物 (ERE-Luc) または IL-6 プロモータ駆動ルシフェラーゼ (IL-6-Luc) でトランスフェクトした HeLa 細胞を使用して、これらのペプチドの転写を遮断する能力を試験した。リガンド結合ドメイン ER α に結合する配列 SSLTSRDFGSWYASR (配列番号 1) を有する α II と呼ばれるペプチドは、ERE-Luc 転写の E_2 誘導性増加を遮断した (図 5 A)。同様に、ペプチドは、IL-6 転写の E_2 誘導性減少を遮断した (ER と他の転写因子との間のタンパク質-タンパク質相互作用を介して媒介される転写調節の典型)。それにもかかわらず、 α II ペプチドは、 E_2 の抗アポトーシス効果に影響を与えなかった。HeLa 細胞の代わりに HEK293 を使用した実験で同一の結果が得られた (示さず)。

30

【0207】

ER β 特異的ペプチド (293) および ER α および ER β の両方と相互作用するペプチド (F6) (図 5 B) を調査した。これらの実験のために、HeLa 細胞を、ERE または IL-6 ルシフェラーゼ構築物および ER α または ER β のいずれかとトランスフェクトした。293 は、ER β 保有細胞において ERE および IL-6 プロモータの両方由来の転写に対する E_2 の効果を遮断したが、ER α 保有細胞では遮断されなかった。それに対して、F6 は、ER α および ER β 保有細胞の両方において ERE または IL-6 由来の転写に対する E_2 の効果を遮断した。より重要なことに、ER α (α II は ER α に特異的であるので、おそらく ER β) の抗アポトーシス活性に影響を与えない α II と異なり、293 は ER β の抗アポトーシス活性を遮断するが、ER α の抗アポトーシス活性に対する効果はなかった。F6 は、ER α および ER β の両方の抗アポトーシス活性ならび

40

50

に E R E および I L - 6 由来の転写を遮断した。これらの結果により、各ペプチドが A F - 2 結合ポケットの異なる部位に結合して遮断することの証拠が確認される (N o r r i s , J . D . ら、1999、S c i e n c e 、 285、774~746 ; C h a n g , C . ら、1999、M o l . C e l l B i o l . 、 19、8226~8239)。さらに、データはまた、 α I I が結合する部位の遮断は、E R α の転写活性を有効に遮断するとしても、この部位のみでは「抗アポトーシス」活性に影響を与えないことを示す。E R α または E R β 由来の転写および／または抗アポトーシス活性の遮断におけるこれらのペプチドの特異性の証明は、リガンド活性化受容体の抗アポトーシス活性が受容体タンパク質領域の異なる部位（便宜上「抗アポトーシス」ドメインと呼ぶ）に依存するという主張を支持する。

10

【0208】

E R の転写活性は、特異的同時アクチベータとの相互作用に劇的に影響を受け、そのほとんどが核受容体ボックスと呼ばれる保存 L X X L L モチーフを含む (M c K e n n a ら、1999、E n d o c r . R e v . 、 20、321~344)。ペプチド G R I P は、E R の G R I P - 1 (これらの同時アクチベータの1つ) との相互作用を阻止する (C h a n g , C . ら、1999、M o l . C e l l B i o l . 、 19、8226~8239)。G P I P ペプチドは、中心に同時アクチベータ G R I P - 1 由来の L X X L L モチーフの3つのコピーを含む。この領域のヌクレオチド配列を以下に示す。

【0209】

【化7】

20

CAC	AGCCGGCTGC	ATGACAGCAA	AGGGCAGACC	AAACTCCTGC
AGCTGCTGAC	CACCAAGTCC	GACCAGATGG	AGCCTTCACC	
CTTGCCCAGC	TCCTTGTCGG	ACACAAACAA	GGACTCAACA	
GGGAGCTTGC	CTGGGCCTGG	GTCCACGCAT	GGCACCTCGC	
TCAAGGAGAA	GCATAAGATT	TTGCACAGAC	TCTTACAGGA	
CAGCAGTTCC	CCTGTGGACT	TGGCCAAGCT	GACAGCAGAA	
GCCACAGGCA	AAGAGCTGAG	CCAGGAGTCC	AGCAGCACAG	
CTCCTGGGTC	GGAAGTGACT	GTCAAACAGG	AGCCAGCGAG	
CCCCAAGAAG	AAAGAGAATG	CACTACTGCG	CTATTTGCTC	
GACAAAGATG ATACTAAAGA TATTGGTTTA CCGGAA (配列番号: 17)				

30

このペプチドが H e L a 細胞に E R α と同時トランスフェクトされた場合、E R の抗アポトーシス活性に影響を与えず (図 5 C)、これは、リガンド活性化受容体の抗アポトーシス活性が核転写因子としてのこのタンパク質の機能に依存しないことをさらに主張する。

【0210】

実施例 6

40

E R α の転写活性を、合成リガンドを使用してその核内転写制御を介さない活性から分離することができる

プロモータ中に E R E を含み、且つ古典的様式でエストロゲンによって調節され、初代頭蓋冠細胞に対して抗アポトーシス効果を有する C 3 遺伝子の転写に対する種々のリガンドの効果の比較を行った。図 6 A に示すように、転写活性を示さず、強力な抗アポトーシス効果を示すエストレンが認められた。それに対して、強力な転写活性を有するピラゾールの抗アポトーシス効果は最小であった。これら 2 つの化合物のアポトーシス効力は、E R K リン酸化を誘導する能力と相互関係を示す (図 6 B)。

【0211】

実施例 7

50

導入遺伝子としてペプチド F 6 を使用したトランスジェニック動物

インビボで詳細に分析するために、エストロゲンまたはアンドロゲンの骨保護効果への A R 作用に対する E R 作用の相対的寄与を、野生型卵巣摘出マウスおよび E R - ペプチドアンタゴニスト 2 X F 6 をコードするテトラサイクリン誘導性導入遺伝子を保有するマウスにおける骨芽細胞形成および破骨細胞形成、骨芽細胞および破骨のアポトーシス、骨量および骨強度の比較によって行うことができる。エストロゲンは、E R α もしくは E R β または A R によって有効且つ同一の潜在性で抗アポトーシス効果を発揮することができる。さらに、E R α または E R β 媒介効果を、選択的 E R ペプチドアンタゴニスト 2 X F 6 を使用して遮断することができる (図 5 B)。A R を介したエストロゲンまたはアンドロゲンの活性を保持する一方で、導入遺伝子として 2 X F 6 を使用して E R α および E R β を介するこれらのステロイドの活性を同時に遮断することができる。E R K O マウスの結果を混同している可能性が高いこのような発達問題を、アクチンプロモータによって駆動される T E T - O N 系の調節下に導入遺伝子を置くことによって回避することができる、これは、G o s s e n, M. ら、1993、T r e n d s . B i o c h e m . S c i . 、18、471~475、および G o s s e n, M. ら、1995、S c i e n c e 、268、1766~1769に記載されている。

10

【0212】

逆テトラサイクリンリプレッサー (r T e t R または T E T - O N) 系は、T e t R - オペレーター - T c 相互作用、単純ヘルペスウイルス (H S V) - V P 16 転写活性化ドメイン、およびテトラサイクリン (T c) の高い特異性をうまく利用する。従来の (T E T - O F F) 系では、H e L a 細胞でのレポーターアッセイで認められるように、T c 調節トランスアクチベータ (t T A) (T e t R と V P 16 タンパク質の活性化ドメインとの間の融合) により遺伝子発現が刺激される。刺激効率を、レポーター遺伝子発現レベルの 10^5 倍増加によって立証した。T c は t T A の最小プロモータ上流の t e t オペロン (t e t O) への結合を阻止し、その結果 t T A 依存性発現をオフにする。しかし、T E T - O N 系は、改変された r t T A アクチベータ (T c など) または V P 16 のオペレーターへの結合を破壊するよりもむしろ誘導する誘導体ドキシサイクリン (D o x) を利用する。T E T - O N 系は、テトラサイクリンへの長期曝露後に真核細胞に付与し得る任意の潜在的な毒性を回避する。

20

【0213】

ペプチドの D o x 誘導発現用の同一のマウスに2つの構築物を移入した。第1の構築物では、r t T A (r T E T R および V P 16 活性化ドメインから構成される) をコードする遺伝子を、遍在発現用のアクチンプロモータの調節下に置く。このプロモータを首尾よく使用して、トランスジェニックマウスにおいてヒト胎盤アルカリホスファターゼ遺伝子の遍在発現を指示した (D e P r i m o, S. E. ら、1996、T r a n s g e n i c . R e s . 、5、459~466)。核局在化シグナル (N L S) およびポリアデニル化部位 (p o l y A) を含むヒト成長ホルモン (h G H) の第1のイントロン領域を、アクチン r t T A 構築物の下流にクローン化して、転写物を安定化し、最適なタンパク質発現レベルを付与する。第2の構築物では、t e t O 配列および最小プロモータを保有するテトラサイクリン応答エレメント (T R E) を、G A L 4 D B D 2 X F 6 - h G h - p o l y (a) カセットの上流に入れる。

30

40

【0214】

E R の転写および抗アポトーシス活性両方の抑制において1つのみのコピーよりも有効であるので、2 X 6 F ペプチドの2つのコピーを G A L 4 D N A 結合ドメイン 2 X F 6 ペプチド融合で使うことができる。同時組み込み構築物を保有するトランスジェニックマウスを成体まで成長させて、飲料水に混合した D o x で治療した。ドキシサイクリン (D O X) の非存在下では、第1の構築物中のトランスアクチベーターは、t e t O 配列への結合を遮断される。一旦ドキシサイクリンが添加されると、トランスアクチベータは T R E 中のその標的 t e t O 配列を認識し、アクチンプロモータの調節下で、プロモータはペプチド配列の転写活性化を駆動する。

50

【0215】

微量注入用のDNA構築物の作製

アクチン-rtTA-ポリ(A)およびTRE GAL4 DBD2XF6-hGH-poly(A) DNA構築物を、標準的なサブクローニング技術にしたがって作製する。2つの構築物のうちのそれぞれ1つには、多工程のクローニングが必要である。最終構築物の各工程を、配列分析およびDox治療に応答する両ERの活性遮断能力のモニタリングによってHeLa細胞の一過性トランスフェクタントに確立された機能を使用して評価する。

【0216】

トランスジェニックマウスの作製および同定

アクチン-rtTA-ポリ(A)およびTRE GAL4 DBD2XF6-hGh-poly(A) DNA構築物を、各ベクターから切り出し、マウス受精卵に微量注入する。卵を2細胞期にし、偽妊娠代理マウスの卵管に再移植する。得られた同腹子を、アクチン-rtTA-ポリ(A)およびTRE GAL4 DBD2XF6-hGh-poly(A)導入遺伝子の同時組み込みについてテールDNA PCRによってスクリーニングする。2つのDNAカセットが同一または類似の宿主ゲノム位置に組み込まれているかどうかを調査するために、創始者をC57BL6マウスと交配し、導入遺伝子伝達について子孫をスクリーニングする。上記のPCRを使用したDNAスクリーニング後、両構築物についてポジティブなトランスジェニック同腹子を、さらなる特徴づけのために選択する。各組み込み導入遺伝子のDNA配列の完全性を、テール核内転写制御性DNAのサザンブロット分析および各導入遺伝子の5'または3'末端に相同なプローブに対するハイブリッド形成によって確認する。

【0217】

マウスにおける導入遺伝子発現の特徴づけ

同定したトランスジェニック動物(Tet-F6という)を、Doxに応答するF6ペプチド発現にスイッチングする能力について特徴づけを行う。文献に記載のように(Ray, P. ら、1997、J. Clin. Invest.、100、2501~2511)、2匹のトランスジェニック同腹子を、通常の水または0.5mg/ml Dpoxを補足した水で種々の期間維持する。このアプローチは、F6ペプチドの発現を誘導するために必要なDox処理マウスの最低必要時間を評価する。マウスを、Doxの添加前、添加から2、4、6日間後に屠殺し、組織を採取する。全mRNAを、頭蓋冠、大腿骨、椎骨、子宮、乳腺、および多数の柔組織(肝臓、肺、腎臓、脾臓、脳など)から抽出し、ノーザンブロット分析を使用してF6発現を評価する。その後同一のアプローチを行って、2匹のトランスジェニック動物の飲料水からのDoxの除去により、ペプチド産生が停止されることを確認する。

【0218】

ペプチドのエストロゲン誘導性転写を遮断する能力の評価

2匹のトランスジェニックマウスを、ERE-lacZトランスジェニックマウスと交配させる。3匹のトランスジェニック同腹子が成体に達した場合、飲料水にDoxを添加し、ペプチド発現を少なくとも48時間誘導および維持する。ER媒介転写が遮断されたことを確認するために、20ng/g体重のE₂で24時間処理した後に動物を屠殺し、子宮、乳腺、大腿骨、および椎骨のlacZ活性を測定した。一旦ERE-lacZトランスジェニックマウスでのペプチド発現およびER転写の遮断が確認されると、WTマウスおよび擬給食または卵巣摘出マウスのいずれかにおいて成体期に少なくとも28日間F6発現を誘導するTet-F6マウスを使用して、遮断を直接確認する。手術後、全ての群を、20ng/g体重のE₂で28日間治療する。処理から28日後、マウスを屠殺し、子宮および乳腺を単離した。これらの組織から全RNAを抽出し、ラクトフェリン(古典的ERE結合を介してエストロゲンによって転写調節されている遺伝子)発現についてスクリーニングする。WTマウスでは、ラクトフェリンmRNAは、これらの同一の実験条件下で、子宮にて約5倍増加することが既知である。ERペプチドアンタゴニストの機能効率を、Tet-F6動物ではラクトフェリン発現が欠損するが、エストラジオールを投

与された卵巣摘出WTコントロールでは欠損しないことで直接確立した。

【0219】

骨表現型分析

E₂ (20 ng/g 体重)、DHT (20 ng/g 体重)、または賦形剤のいずれかで治療した4月齢の雌Tet-F6マウスにおいて導入遺伝子を、4から6週間オンにする。賦形剤またはステロイド治療Tet-F6マウスの骨表現型を、4月齢で卵巣摘出し、卵巣摘出後さらに4～6週間E₂またはDHT治療を行うか行わないで維持した野生型動物の表現型と比較する。Tet-F6および野生型動物を、導入遺伝子のオンまたは卵巣摘出から1週間間隔でインビボDEXA分析によって骨量を評価する。4から6週間後、両動物群を屠殺し、以下の同定を行うa) 全身ならびに子宮および乳腺の重量、b) 長骨の長さおよび骨膜と骨内膜との間の骨の幅、c) 骨髄細胞のエクスピボ培養における骨芽細胞形成および破骨細胞形成、d) 椎骨切片における骨芽細胞/骨細胞および破骨細胞アポトーシスの罹患率、e) 動的組織形態計測による骨形成および骨吸収の速度、f) 椎骨の圧縮強度。動的組織形態計測のために動物を屠殺する8日前および2日前に腹腔内注射で30 ng/g 体重の塩酸オキシテトラサイクリンを投与した。TET ON系は、ドキシサイクリンよりもテトラサイクリンに対して感度が1/100から1/1000であるに留意することが重要である。さらに、ドキシサイクリン(0.5 mg/ml 飲料水)の投与は骨再構成に影響を与えず、0.5 mgのテトラサイクリンの注射(s.c.)後の海綿質に形成されたテトラサイクリン標識の視覚化を干渉しないことが確立されている。したがって、この操作は、導入遺伝子の発現に影響を与えず、この段階でドキシサイクリンがオンになった。

【0220】

実施例8

αIIおよび293導入遺伝子を使用したトランスジェニック動物

2つのERペプチドアンタゴニストαII+2X293(ここから先はTet-ペプチドという)をコードするテトラサイクリン誘導導入遺伝子を保有するトランスジェニックマウスを、類似の方法を使用して作製することができる。導入遺伝子としてαII+2X293を使用して、ERαによる核内転写制御を介さない活性を保持することができるが、ERαおよびERβの両方による転写活性およびERβの核内転写制御を介さないを遮断することができる。293ペプチドは、ERβの転写活性および核内転写制御を介さない活性を遮断するが、ERαの転写活性または核内転写制御を介さない活性のいずれかに対する効果はない。

【0221】

2つの構築物を構築し、ペプチドのDox誘導性発現のために同一のマウスに同時移入する(図8)。第1の構築物では、rtTA(rtTetRおよびV16活性化ドメインから構成される)をコードする遺伝子を、遍在発現のためにアクチンプロモータの調節下に置く。核局在化シグナル(NLS)およびポリアデニル化部位(polyA)を含むヒト成長ホルモン(hGH)の第1のイントロン領域を、アクチンrtTA構築物の下流にクローン化して、転写物を安定化し、最適なタンパク質発現レベルを付与する。第2の構築物では、tetO配列および最小プロモータを保有するテトラサイクリン応答エレメント(TRE)を、GAL4DBDαII-IREs-GFP2X293-hGH-poly(A)カセットの上流に入れる。このカセットでは、GAL4 DNA結合ドメイン-αIIペプチド融合を、内部リボゾーム侵入部位(IREs、1つのmRNA由来の2つの読み取り枠を転写する)と共に緑色蛍光タンパク質遺伝子(GFP)に融合する293ペプチドの2つのコピーに連結させる。

【0222】

293ペプチドの2つのコピーを使用する理由は、予備試験でERβの転写および抗アポトーシス活性の両方の抑制において1コピーのみよりも有効であることを示したからである。αIIおよび2X293ペプチドをそれぞれ同一のGAL4DBDの代わりに異なるタンパク質を融合して、2つの同一のGAL4DBD領域間で起こる組換えの可能性を回

避する。さらに、G A L 4 D B D α I I - I R E S - G F P 2 X 2 9 3 - h G h - p o l y (A) カセットにG F Pを組み込んで、ペプチド発現の容易なスクリーニング手段を得る。同時組み込み構築物を保有するトランスジェニックマウスを成体まで成長させて、飲料水に混合したD o xで治療した。D o xの非存在下では、第1の構築物でのトランスアクチベーターは、t e t O配列への結合が遮断される。一旦D o xが添加されると、トランスアクチベーターはT R E中のその標的t e t O配列を認識し、アクチンプロモータの調節下で、プロモータはペプチド配列の転写活性化を駆動する。

【0223】

微量注入用のD N A構築物の作製

アクチン-r t T A-ポリ (A) およびT R E-G A L 4 D B D α I I - I R E S - G F P 2 X 2 9 3 - h G h - p o l y (A) D N A構築物を、標準的なサブクローニング技術にしたがって作製する。最終構築物の完全性を配列分析によって評価し、機能をE R α およびE R β 両方の転写活性ならびにE R β の抗アポトーシス活性の遮断能力のモニタリングによってH e L a細胞の一過性トランスファクタントで確立する。

【0224】

トランスジェニックマウスの作製および同定

アクチン-r t T A-ポリ (A) およびT R E-G A L 4 D B D α I I - I R E S - G F P 2 X 2 9 3 - h G h - p o l y (A) D N A構築物を、各ベクターから切り出し、マウス受精卵に微量注入する。卵を2細胞期にし、偽妊娠代理マウスの卵管に再移植する。テールD N Aを、アクチン-r t T A-ポリ (A) およびT R E-G A L 4 D B D α I I - I R E S - G F P 2 X 2 9 3 - h G h - p o l y (A) 導入遺伝子の同時組み込みについてスクリーニングする。2つのD N Aカセットが同一または類似の宿主ゲノム位置に組み込まれているかどうかを調査するために、創始者をC 5 7 B L 6 マウスと交配し、導入遺伝子伝達について子孫をスクリーニングする。上記のP C Rを使用したD N Aスクリーニング後、両構築物についてポジティブなトランスジェニック同腹子を、さらなる特徴づけについて選択する。各組み込み導入遺伝子のD N A配列の完全性を、テール核内転写制御性D N Aのサザンブロット分析および各導入遺伝子の5' または3' 末端に相同なプローブに対するハイブリッド形成によって確認する。

【0225】

マウスにおける導入遺伝子発現の特徴づけ

同定したトランスジェニック動物を、D o xに応答する α I I および2 9 3 ペプチド発現にスイッチングする能力について特徴づけを行う。2匹のトランスジェニック同腹子を、通常の水または0. 5 m g / m l D p o xを補足した水で種々の期間維持する。このアプローチは、 α I I および2 9 3 ペプチドの発現を誘導するために必要なD o x処理マウスの最低必要時間を評価する。マウスを、D o xの添加前、添加から2、4、6日間後に屠殺し、組織を採取する。全m R N Aを、頭蓋冠、大腿骨、椎骨、子宮、乳腺、および多数の柔組織（肝臓、肺、腎臓、脾臓、脳など）から抽出し、ノーザンブロット分析を使用して α I I および2 9 3 ペプチド発現を評価する。その後同一のアプローチを行って、2匹のトランスジェニック動物の飲料水からのD o xの除去により、ペプチド産生が停止されることを確認する。

【0226】

ペプチドのエストロゲン誘導性転写を遮断する能力の評価

T e t ペプチド動物のエストロゲン転写活性の選択的阻害を同定するために、2つのアプローチを行った。第1に、2匹のトランスジェニックマウスを、E R E-l a c Zトランスジェニックマウスと交配する。3匹のトランスジェニック同腹子が成体に達した場合、飲料水にD o xを添加し、ペプチド発現を少なくとも48時間誘導および維持する。E R 媒介転写が遮断されたことを確認するために、20 n g / g 体重のE₂で24時間処理した後に動物を屠殺し、子宮、乳腺、大腿骨、および椎骨のL a c Z活性を測定した。E R 媒介転写の遮断の直接確認のために、W T マウスおよび成体期に少なくとも28日間ペプチド発現を誘導するT e t ペプチドマウスを擬給食を与えるか卵巣摘出する。手術後、全

10

20

30

40

50

ての群を、 20 ng/g 体重の E_2 で 28 日間治療する。処理から 28 日後、マウスを屠殺し、子宮および乳腺を単離した。これらの組織から全 RNA を抽出し、ラクトフェリン（古典的 ERE 結合を介してエストロゲンによって転写調節されている遺伝子）発現についてスクリーニングする。Tet-ペプチド動物ではラクトフェリン発現が欠損するが、エストラジオールを投与した卵巢摘出 WT コントロールでは欠損しないことにより、ER ペプチドアンタゴニストの機能的効率を直接確立される。

【0227】

骨表現型分析

上記のように一旦 Tet-ペプチドマウスが確立され、特徴付けられると、雌を 4 月齢まで成長させる。この時点で、導入遺伝子を 4 から 6 週間オンにし、骨表現型を、4 月齢で 10
 卵巢提出し、卵巢摘出後さらに 4 から 6 週間維持した野生型動物と比較する。導入遺伝子のオンまたは野生型動物の卵巢摘出後 1 週間間隔で、両動物をインビボ DEXA 分析によって骨量を評価する。脊椎 BMD の変化 % が卵巢摘出野生型群では少なくとも 3 % が変化するか 6 週間後のいずれか早いほうで、動物を屠殺する。この相違には、群あたり 80 % を超える 8 匹の動物が必要である。4 から 6 週間後、両動物群を屠殺し、以下の同定を行う a) 全身ならびに子宮および乳腺の重量、b) 長骨の長さおよび骨膜と骨内膜との間の骨の幅、c) 骨髓細胞のエクスピボ培養における骨芽細胞形成および破骨細胞形成、d) 椎骨切片における骨芽細胞／骨細胞および破骨細胞アポトーシスの罹患率、e) 動的組織形態計測による骨形成および骨吸収の速度、f) 椎骨の圧縮強度。動的組織形態計測のため 20
 に動物を屠殺する 8 日前および 2 日前に腹腔内注射で $30 \mu\text{g/g}$ 体重の塩酸オキシテトラサイクリンを投与した。TET-ON 系は、Dox よりもテトラサイクリンに対して感度が $1/100$ から $1/1000$ であるに留意することが重要である。さらに、Dox (0.5 mg/ml 飲料水) の投与は骨再構成に影響を与えず、 0.5 mg のテトラサイクリンの注射 (s.c.) 後の海綿質に形成されたテトラサイクリン標識の視覚化を干渉しない。

【0228】

実施例 9

不活化誘導性ステロイド受容体を有するトランスジェニック動物

閉経後または精巣摘出後の正確且つ有益なモデルは、性ステロイド受容体のそれぞれ 1 つの欠失、細胞特異的様式（骨芽細胞、破骨細胞、および両方）および遍在の両方が必要で 30
 ある。バクテリオファージ P の 1 時間の Cre/loxP 二成分 (binary) 組換え系は、ES 細胞 (Zou, Y. R. ら、1994、Curr. Biol.、4、1099～1103; Gu, H. ら、1993、Cell、73、1155～1164) およびトランスジェニックマウス (Laks o, M. ら、1992、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、89、6232～6236; Urban, P. C. ら、1992、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、89、6861～6865) の両方での loxP 部位特異的組換えを有効に媒介することが示されている。

【0229】

微量注入用 DNA 構築物の作製

逆テトラサイクリンリプレッサー (rTetR または TET-ON) 系を使用して、条件的発現を行う。第 1 の構築物では、破骨細胞特異的発現のために rtTA をコードする遺伝子をオステオカルシン (OG-2) プロモータの調節下に置いた。核局在化シグナル (NLS) およびポリアデニル化部位 (poly(A)) を含むヒト成長ホルモン (hGH) の第 1 のイントロン領域を、OG-2-rtTA 構築物の下流にクローン化して、転写物を安定化し、最適なタンパク質発現レベルを付与する。第 2 の構築物では、テトラサイクリン応答エレメント (TRE) を、Cre-hGh-poly(a) カセットの上流に入れる。2 つの構築物のうちの 1 つはそれぞれ複数のクローニング工程を必要とする (図 9A)。各工程を、適切な制限酵素消化および PCR 反応でチェックし、最終構築物を配列決定した。さらに、Dox 誘導 Cre 発現の特異性および有効性を、Ob-6 骨芽細胞株を使用したインビトロ系で確認する。これらの細胞を、特徴づけ、オステオカルシンな 40
 50

らびにER α およびER β の両方を発現することが見出された。Ob-6細胞を、OG-2-rtTA-poly(A)およびTRE-Cre-hGh-poly(A)構築物または空のベクターのいずれかで一過性にトランスフェクトし、これらを1.5 μ g/mlのDoxまたは賦形剤で48時間処理した。細胞を回収し、全RNAの抽出に使用した。Cre特異的プライマーを使用した半定量RT-PCR分析により、Doxで処理した細胞集団のみでCreの特異的発現が認められた(図9B)。

【0230】

トランスジェニックマウスの作製および同定
OG-2-rtTA-poly(A)およびTRE-Cre-hGh-poly(A) DNA構築物を、適切な制限エンドヌクレアーゼで各ベクターから切り出し、受精C57BL/6マウスの卵の前核に微量注入した。卵を2細胞期にし、偽妊娠代理マウスの卵管に再移植する。創始者を、OG-2-rtTAおよびTRE-Cre導入遺伝子の同時組み込みについてのスクリーニングによって同定する。OG-2-rtTAおよびTRE-Cre構築物(以後Tet-OG2-Creという)の両方にトランスジェニックなマウスを、それぞれOG-2-rtTAおよびCre DNA配列の一部を増幅するようにデザインされている2組のプライマーを使用するテールDNAのPCR分析によって同定する。2つのDNAカセットがマウスゲノムの同一の部位に組み込まれているかを調査するために、創始者をC57BL/6マウスと交配し、導入遺伝子伝達について子孫をスクリーニングする。上記のPCRを使用したDNAスクリーニング後、両構築物についてポジティブなトランスジェニック同腹子を、さらなる特徴づけのために選択する。各組み込み導入遺伝子のDNA配列の完全性を、テール核内転写制御性DNAのサザンブロット分析および各導入遺伝子の5'または3'末端に相同なプローブに対するハイブリッド形成によって確認する。

【0231】

導入遺伝子の機能的特徴づけ

同定したトランスジェニック動物を、Doxに応答するCre発現にスイッチングする能力について特徴づけを行う。文献に報告のように(Ray, P. ら、1997、J. Clin. Invest.、100、2501~2511)、2匹のトランスジェニック同腹子を、通常の水または0.5 mg/ml Dpoxを補足した水で種々の期間維持する。このアプローチは、Dox処理マウスの最低必要時間を評価する。Creの発現を誘導するために、Doxの添加前、添加から2、4、6日間後に屠殺し、組織を採取する。全mRNAを、頭蓋冠、大腿骨、椎骨、子宮、乳腺、および多数の柔組織(肝臓、肺、腎臓、脾臓、脳など)から抽出し、ノーザンブロット分析を使用してCre発現を評価する。その後同一のアプローチを行って、2匹のトランスジェニック動物の飲料水からのDoxの除去により、Cre産生が停止されることを確認する。

【0232】

Cre媒介組換えをモニターするために、Tet-OG2-Creマウスを、現在Jackson Laboratoriesから利用可能なROSA26受容体マウス(Mao, X. ら、1999、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、96、5037~5042)と交配させる。これらのマウスでは、フロックス化(floxed) ストッパーフラグメントおよび β -ガラクトシダーゼ-ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ融合遺伝子(β geo)を、ROSA26遺伝子座に組み込んだ。ストッパーフラグメントのCre媒介切り出し後、 β geoの発現を、ROSA26対立遺伝子のエクソン1で駆動させ、これは胚発生期および成体期で遍在している。機能的Tet-OG2-Creトランスジェニック株とROSA26マウスの交配により、骨芽細胞で β -ガラクトシダーゼが発現する。頭蓋冠、大腿骨、および椎骨などの組織を、 β -ガラクトシダーゼ発現について染色する。類似のアプローチを使用して、T細胞特異的発現を評価した(Mao, X. ら、1999、Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.、96、5037~5042)。

【0233】

ERαのフロックス化エクソン3を保有するマウス変異株

第2のマウス株 (Ind-ERKO) は、それぞれCre組換えによって認識される一連の34bpの縦列反復からなる2つのloxP部位に隣接する96kbの0.249KbのマウスERαDNA結合ドメイン (740~989bp) (White, R. ら、1987、Mol. Endocrinol.、1、735~744) を含むエクソン3 (653~845bp) を保有する。2つのloxP部位 (フロックス化) に隣接した同方向の任意のDNA領域を、Cre組換え作用後に切り出した。エクソン3に含まれるDNA結合配列および弱い二量体形成ドメインの欠失によるERαの不活化により、受容体の転写活性を破壊する。さらに、エクソン3は、エクソン3の上流領域が除去された場合に選択的スプライシングが行われ得るいくつかの潜在的な受容体配列を含む。最後に、エクソン3のCre媒介欠失は、ERαDNA下流の読み取り枠を破壊し、抗アポトーシスまたは二量体形成を必要とする任意の残存する活性、および／またはリガンド結合ドメインを不活化する。

10

【0234】

ERα変異マウスの作製

C57B1/6マウス遺伝子ライブラリーから単離し、BACベクターにサブクローン化されたマウスERα遺伝子のエクソン3および4を含む86Kbの核内転写制御性遺伝子座 (図10) を、Ken Korach博士 (NIH) から入手した。この核内転写制御を介する遺伝子座を制限マッピングおよび配列分析に関して特徴づけ、5kbの左アームおよび3kbの右アームに隣接するエクソン3 (0.2Kb) を含むHindIII/BamHIフラグメントをサブクローン化した。標的構築物を、pEasy-Floxベクター (3つのloxP部位 (そのうちの2つがサイトメガロウイルス (CMV) プロモータの調節下でネオマイシン耐性 (neo^r) 遺伝子に隣接している) およびHSV-チミジンキナーゼ (HSV-tk) カセットを含む) に構築する。インビトロでのES細胞中のフロックス化エクソン3を作製し局在化させるための2工程戦略を図10に示した。第1の工程では、左アームの上流のフロックス化HSV-neo^r 選択マーカー、フロックス化エクソン3、右アーム、およびその後のHSV-tkカセットを含む標的構築物をC57B1/6ES細胞 (Eurogentec、Belgiumから獲得し、生殖系列伝達についての二倍体凝集および三倍体凝集による試験でポジティブ) にエレクトロポレーションし、相同組換えによって標的核内転写制御を介する遺伝子座の隣接領域に移入する。

20

30

【0235】

トランスフェクトES細胞を、マイトマイシンCおよびLIF処理したSwiss/129/Balb/cマウス由来neo耐性マウス胚線維芽細胞 (これもEurogentecから入手) の単層上で増殖させる。エレクトロポレーションおよびG418およびガンシクロビルを使用したポジティブESクローンの選択を、確立されたプロトコールにしたがって行った (Robertsonら、1986、Nature、323、445~448)。標的化構築物のG418ポジティブクローンへの相同組換えを、核内転写制御性DNAのサザンブロット分析を使用して確認する。相同組換え頻度は二剤耐性コロニーにおいて18個のうち1個 (Gu, H., Jetら、1994、Science、265、103~106) および50個のうち1個 (Pasparakis, M. ら、1996、J. Exp. Med.、184、1397~1411) で変動することが報告されている。第2の工程では、CMVプロモータの調節下でCreを保有するプラスミドを、遺伝子改変ES細胞にエレクトロポレーションする。Creの発現は一過性であるので、3つのloxP部位のうち2つが1回だけ相同組換えして、3つの型の欠失が得られる可能性がある。I型欠失により、ESゲノムからエクソン3-loxP-HSV-neo^r 選択マーカーが完全に欠失し、対応するES細胞由来の動物は生殖系列中にフロックス化エクソン3を保有する。サザンブロット分析を使用して、III型欠失を同定する。このアプローチは説明されており、DNAポリメラーゼβ遺伝子セグメントのT細胞特異的欠失に首尾よく使用されている (Gu, H., Jetら、1994、Science、265、103

40

50

～106)。標的化ES細胞を、BALB/C胚盤胞に微量注入する。雄キメラを、C57B1/6雌と交配させる。子孫での生殖系列伝達を、サザンブロット分析によって確認する。最後に、フロックス化遺伝子の機能の完全性を、古典的な受容体結合研究および卵巣および子宮などの古典的標的組織から単離した細胞を使用した転写アッセイを使用して同定する。

【0236】

骨芽細胞または破骨細胞特異的ER α 不活化のために、Ind- α ERKOマウスをTet-OG2-CreトランスジェニックマウスまたはTRAP-Creトランスジェニックマウスと交配させた。得られた子孫を成体まで成長させ、Tet-OG2-Creの場合、所定の時間Doxで処理し、Cre発現を最大にする。次いで、マウスを屠殺し、頭蓋冠、大腿骨、椎骨、子宮、乳腺、肺、肝臓、腎臓、および脳を含む組織を採取し、核内DNAを抽出する。エクソン3欠失に特異的なCre媒介細胞の有効性を、異なる組織から抽出した核内転写制御性DNAのサザンブロット分析によって評価する。ER α の骨芽細胞特異的不活化を、ER α ノックアウトマウスから単離した頭蓋冠細胞の複数のERE-ルシフェラーゼ構築物でのトランスフェクションによって証明した。他の細胞ではなく骨芽細胞におけるER α 不活化の特異性を、頭蓋骨芽細胞の代わりに同一のマウス由来の乳房または子宮細胞を使用した同一の研究によって確立する。このアプローチをErnstおよび共同研究者は以前に首尾よく使用して、骨芽細胞における低レベルの機能的内因性ERの存在を証明した(Ernst, M., M. G. Parker, and G. A. Rodan, 1991, Mol. Endocrinol., 11, 1597～1606)。これらの実験では、ER β を介したERE転写に対する潜在的効果を、17 β -E₂の代わりにER α 特異的リガンドであるプロピルピラゾールトリオール(John Katzenellenbogen博士、イリノイ大学、Urbana-Champaignが開発した合成化合物)の使用によって取り除く。プロピルピラゾールトリオールは、Katzenellenbogenグループによって報告されている化合物群に関連する種々の構造のERリガンドである(Sun, J. ら、1999, Endocrinology, 140, 800～804)。この化合物は、明らかなER α 選択性結合親和性を有し(17 β -E₂に対するRBAはER α では63、ER β では0.095)、および一過性トランスフェクトヒト子宮内膜癌(HEC-1)細胞において高いER α 転写潜在性を示すが、高い治療濃度でさえER β 媒介転写活性を示さない(私信)。ノックアウトマウスにおける骨芽細胞特異的様式でのER α 不活化を証明するためのさらなるアプローチとして、ノックアウトマウスをERE-lacZレポーターマウスと交配させる。得られた同腹子および野生型動物の卵巣を摘出して内因性エストロゲンを除去する。卵巣摘出から1週間後、いずれかの型のマウスを、プロピルピラゾールトリオールで24時間処理する。24時間の治療後、マウスを屠殺し、ER α またはこれを欠く転写活性を、子宮、乳房、および骨切片の β ガラクトシダーゼ染色でアッセイする。

【0237】

骨芽細胞および破骨細胞のみにER α 不活化が標的化されたマウスの作製に加えて、ER α がこの遺伝子を発現する全ての細胞型で不活化された異なるマウスを、Ind- α ERKOマウスのMx-Cre導入遺伝子を保有する既存のトランスジェニックマウスとの交配によって作製する(Kuhn, R. ら、1995, Science, 269, 1427～1429)。このマウスでは、Creリコンビナーゼは、Mx1遺伝子プロモータの調節下にある。この遺伝子は健常なマウスではサイレントであるが、ウイルス感染時にオンになる。実験的に、IFN- α 若しくは β または合成二本鎖RNAポリイノシン酸-ポリチジル酸(pI-pC)(これ自体がマウスのIFNインデューサーである)の投与によってMx1プロモータ活性を非常に高いレベルに刺激することができる。フロックス化ER α およびMx-Creの両方を保有するマウスは、IFNまたはpI-pCでの処理時にER α の不活性に変異する。

【0238】

実施例10

10

20

30

40

50

核内転写制御を介さないエストロゲン様シグナル伝達のスクリーニング法

転写活性を欠く核内転写制御を介さないエストロゲン様シグナル伝達のアクチベータを、SRE-SAP検出系（ポジティブ読み出し）およびC3（補体3）転写（ネガティブ読み出し）を使用してERK活性化が同時に検出されるハイ・スループット・コンビネーションスクリーニングで同定する。このために、HeLa細胞を、レトロウイルスを使用してhER α および／またはhAR、SRE-SAPならびにC3-Lucプラスミドで安定にトランスフェクトする。本発明の別の態様は、hER α またはhAR遺伝子がTET-OFF（テトラサイクリン-OFF）系の調節下で条件的に発現する安定なトランスフェクタントである。

【0239】

SRE-SAPアッセイは、分泌アルカリホスファターゼ（SAP）発現を駆動する単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ（HSV-tk）プロモータの上流に存在する血清応答エレメント（SRE）の転写因子（Elk-1/SRF）誘導活性化のアッセイによってMAPK/JNKシグナル伝達経路の活性化を検出する。このアッセイは市販されている。MEK1またはMEKK1キナーゼのインビボアッセイ用キットもまた市販されている。一般に、トランスフェクションから24時間後、血清含有培地を、約0.2%血清を含む培地と置換する。細胞を約0.2%の血清中で24時間培養し、その後アッセイする。コントロールサンプルを、賦形剤のみで処理する。

【0240】

一般に、HeLa細胞を、 $4 \sim 5 \times 10^4$ / ウェルの濃度で48ウェルプレートに分注し、10%活性炭処理FBS（ウシ胎児血清）、抗生物質（ペニシリンおよびストレプトマイシン）、およびグルタミンを含む無フェノールレッドMEM培地中で一晚培養する。培地を除去し、細胞をPBSで2回洗浄し、トランスフェクション混合物（リポフェクタミン、リポフェクタミンプラス、0.6mgまでのトランスフェクトされる全量DNA）を含む無血清無抗生物質培地を重層する。細胞をトランスフェクション混合物と2から3時間インキュベートする。トランスフェクション混合物を除去し、10%活性炭処理FBS、抗生物質、およびグルタミンを含む新鮮な無フェノールレッドMEM培地と置換し、細胞を放置して24時間後に回収する。10%FBS含有培地を、0.2%活性炭処理FBS、抗生物質、およびグルタミンを含む新鮮な無フェノールレッドMEM培地と置換する。細胞を0.2%FBS含有培地中で24時間培養する。細胞を所望の濃度のステロイドで24時間処理する。市販のキットを使用し、製造者の指示にしたがって、50mlの0.2%FBS含有細胞培養培地中でSRE-SAP活性を測定する。一過性トランスフェクションの場合、細胞溶解物におけるRenillaルシフェラーゼ活性のアッセイによってトランスフェクション効率についてデータを修正する。

【0241】

17 β -エストラジオールは、ERK活性化およびC3転写のポジティブコントロール化合物である。ERK活性化のネガティブコントロールとしてピラゾールを、C3転写のネガティブコントロールとしてエストレンを使用することができる。17 β -エストラジオールと比較して強力なSRE-SAP活性を有するがC3-Luc活性が低い化合物が存在しない化合物を選択する。選択基準には、C3転写に対するERK活性化の比に基づいた目的の化合物の分類を含み得る。目的の化合物を、骨芽細胞／骨細胞抗アポトーシス活性についてさらにスクリーニングする。

【0242】

さらに、ERの結合ポケットのコンビナトリアル・ケミストリーおよび三次元モデリングを使用して、新規のリガンドを合成することができる。

【0243】

本発明は目的を実行し、且つ記載の目標および利益ならびに本発明本来の目的、目標、および利益が得られるように十分に適用されることが当業者に容易に認識される。本発明の実施例は、本明細書中に記載の方法、手順、処理、分子、および特定の化合物と同様に現在の代表的な好ましい実施形態の例示であり、本発明の範囲の制限を意図しない。当業者

10

20

30

40

50

はこれらを変更して他の用途で使用し、これらは特許請求の範囲によって規定された本発明の精神の範囲内に含まれる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

インビボおよびインビトロでの性ステロイドによる骨芽細胞および骨細胞のアポトーシスの調節を示す一連のグラフである。A. マウスの卵巣摘出および精巣摘出後の骨芽細胞および骨細胞アポトーシスの罹患率。バーは、群あたり 4～5 匹の動物の平均±SDを意味する。 $p < 0.05$ 。B. 頭蓋冠骨芽細胞を、 10^{-11} M～ 10^{-6} Mの E_2 またはDHTで1時間処理後、プロアポトーシス薬エトポシド ($50 \mu\text{M}$) で6時間処理した。死細胞率を、トリパンブルー染色によって定量した。ステロイドの非存在下でのエトポシド誘導性アポトーシスを100%とした。バーは、三連の同定の平均±SDを示す (E_2 またはDHT処理培養対各処理について異なる一元配置分散分析を使用した賦形剤について $p < 0.05$)。CおよびD. 頭蓋冠由来の骨芽細胞またはMLO-Y4骨細胞を 10^{-8} Mの E_2 またはDHTで処理し、エトポシド、デキサメタゾン (10^{-7})、またはTNF α (1 nM) の添加によってアポトーシスを誘導した。死細胞率をBに記載のように定量した。結果を、二元配置分散分析によって分析した。各薬剤群および各薬剤対賦形剤内の前処理と所与の前処理と比較した場合、 $p < 0.05$ 。E. コラーゲンゲルに組み込まれたOB-6骨芽細胞を、異なる濃度の E_2 またはDHTで24時間処理した。無作為に選択した全部で200個の細胞を評価した。賦形剤コントロールでは、 $32.3 \pm 2.5\%$ の細胞がアポトーシスであった。各処理について異なる一元配置分散分析を使用した E_2 またはDHT処理培地対賦形剤は $p < 0.05$ 。

【図 2】

E_2 またはDHTの抗アポトーシス効果がERまたはARアンタゴニストの両方で阻害され、これはER (α または β) またはARのいずれかを介して媒介され得ることを示す一連のグラフである。頭蓋冠骨芽細胞をERアンタゴニストICI 182, 780 (10^{-7} M) またはARアンタゴニストフルタミド (10^{-7} M) で30分間前処理後、 10^{-8} Mの E_2 またはDHTと1時間インキュベートした。その後、エトポシドを添加し、6時間後にアポトーシス細胞を図1Bに記載のように定量した。結果を、ステロイドの非存在下 (100%) でのエトポシド誘導性アポトーシスの百分率として示す。バーは、三連の同定の平均±SDを示す (ANOVAによって賦形剤に対して $p < 0.05$)。B. HeLa細胞を、Nuc-E GFP発現ベクターと共に、ER α 、ER β 、AR、VDR、またはRXR発現ベクターまたは空のベクター (ev) のいずれかで一過性にトランスフェクトした。トランスフェクションから16時間後、細胞を表示の濃度の E_2 、DHT、または1, 25-ジヒドロキシビタミンD $_3$ (1, 25 D $_3$) で1時間処理後、エトポシドで6時間処理した。200から500個のトランスフェクトした (蛍光) 細胞の核の形態学の実験によってアポトーシス細胞を同定した。ステロイドの非存在下 (—) で培養した細胞のエトポシド誘導性アポトーシスを100%とした。結果を、エトポシド誘導性アポトーシスの百分率として示した (平均±SD)。ANOVAによるステロイドの非存在下でエトポシドで処理した細胞に対して $p < 0.05$ 。

【図 3A】

E (リガンド結合) ドメインへのER α の抗アポトーシス活性の局在化および核標的化による除去を示す図である。A. HeLa細胞を、Nuc-E GFPおよび種々のER α 変異体の発現ベクターで同時トランスフェクトし、次いで 10^{-8} Mの E_2 で1時間処理後、エトポシドで6時間処理した。B. 全長ER α を、非標的化ECFPに融合した (ER α -ECFP)。ER α のEドメインを、非標的化ECFP (E-ECFP)、膜標的化ECFP (E-Mem-ECFP)、または核標的化ECFP (E-Nuc-ECFP) のいずれかに融合した。これらの各融合タンパク質を、HeLa細胞中で核標的化赤色蛍光タンパク質 (Nuc-E RFP) と共に発現し、その細胞内分布を落射蛍光顕微鏡で分析した。左および中央のパネルは、シアンまたは赤色フィルターセットを使用して得た同一の細胞の顕微鏡写真を示す。バー=15 μm 。その除去がシアン融合タンパク質の除去

と容易に区別することができるので、本実験でNuc-E R F Pを使用してアポトーシスを定量した。トランスフェクト細胞を、 10^{-8} の E_2 または賦形剤で1時間処理後、エトポシドで6時間処理した。3 Aおよび3 Bのアポトーシスを、図2に記載のように定量した。バーは、三連の同定の平均 $\pm$ SDを示す。ANOVAによるエトポシドで処理されていない細胞に対して* $p < 0.05$ 。

【図3B】

E (リガンド結合) ドメインへのER α の抗アポトーシス活性の局在化および核標的化による除去を示す図である。A. HeLa細胞を、Nuc-E G F Pおよび種々のER α 変異体の発現ベクターで同時トランスフェクトし、次いで 10^{-8} Mの E_2 で1時間処理後、エトポシドで6時間処理した。B. 全長ER α を、非標的化E C F Pに融合した(ER α -E C F P)。ER α のエドメインを、非標的化E C F P (E-E C F P)、膜標的化E C F P (E-Mem-E C F P)、または核標的化E C F P (E-Nuc-E C F P)のいずれかに融合した。これらの各融合タンパク質を、HeLa細胞中で核標的化赤色蛍光タンパク質(Nuc-E R F P)と共に発現し、その細胞内分布を落射蛍光顕微鏡で分析した。左および中央のパネルは、シアンまたは赤色フィルターセットを使用して得た同一の細胞の顕微鏡写真を示す。バー=15 μ m。その除去がシアン融合タンパク質の除去と容易に区別することができるので、本実験でNuc-E R F Pを使用してアポトーシスを定量した。トランスフェクト細胞を、 10^{-8} の E_2 または賦形剤で1時間処理後、エトポシドで6時間処理した。3 Aおよび3 Bのアポトーシスを、図2に記載のように定量した。バーは、三連の同定の平均 $\pm$ SDを示す。ANOVAによるエトポシドで処理されていない細胞に対して* $p < 0.05$ 。

【図4A】

ERおよびARの抗アポトーシス活性がSrc/Shc/ERKシグナル伝達経路を介して媒介されることを示す図である。A. MLO-Y4細胞を、 E_2 またはDHTと2、5、または15分間、またはPD98059 (50 μ M) またはPP1 (10 μ M) と25分間インキュベート後、 E_2 またはDHTで5分間インキュベートした。細胞溶解物を得、タンパク質を抗ERK1/2または抗ホスホERK1/2 (p-ERK1/2) 抗体を使用したウェスタンブロット分析によって分析した。アポトーシスの同定のために、細胞を賦形剤、PD98059、またはPP1で30分間インキュベート後、 E_2 またはDHTを添加した。30分後、エトポシドを添加し、図1Bに記載のように6時間後にアポトーシスをアッセイした。B. 図1Bに記載のように、Src+/+対Src-/-マウス由来の胚線維芽細胞においてアポトーシスに対する E_2 またはDHTの効果を比較した。実験手順に記載のように、RT-PCRを行った。C~E. HeLa細胞を、Nuc-E G F Pおよび全長ER α またはそのエドメインをコードする発現ベクター、またはARのみ(C、左のパネル)またはdn MEK (C、右のパネル) ; キナーゼ活性を欠くSrc変異体 (Src^K)、SH2ドメインを欠くSrc変異体 (Src Δ SH2)、またはSH3ドメインを欠くSrc変異体 (Src Δ SH3) (D) ; またはER α とともにwt Shc、dn Shc変異体Y239F/Y240F/Y317F (Shc FFF)、Y317F (Shc Y Y F)、またはY238F/Y240F (Shc F F Y) (E) でトランスフェクトした。バーは、三連の同定の平均 $\pm$ SDを意味する。ANOVAによる、ステロイドを使用しないで培養した細胞に対して* $p < 0.05$ 。

【図4B】

ERおよびARの抗アポトーシス活性がSrc/Shc/ERKシグナル伝達経路を介して媒介されることを示す図である。A. MLO-Y4細胞を、 E_2 またはDHTと2、5、または15分間、またはPD98059 (50 μ M) またはPP1 (10 μ M) と25分間インキュベート後、 E_2 またはDHTで5分間インキュベートした。細胞溶解物を得、タンパク質を抗ERK1/2または抗ホスホERK1/2 (p-ERK1/2) 抗体を使用したウェスタンブロット分析によって分析した。アポトーシスの同定のために、細胞を賦形剤、PD98059、またはPP1で30分間インキュベート後、 E_2 またはDHTを添加した。30分後、エトポシドを添加し、図1Bに記載のように6時間後にアポト

ーシスをアッセイした。B. 図1Bに記載のように、Src+/+対Src-/-マウス由来の胚線維芽細胞においてアポトーシスに対するE₂またはDHTの効果と比較した。実験手順に記載のように、RT-PCRを行った。C~E. HeLa細胞を、Nuc-E GFPおよび全長ERαまたはそのEドメインをコードする発現ベクター、またはARのみ(C、左のパネル)またはdn MEK(C、右のパネル)；キナーゼ活性を欠くSrc変異体(Src K⁻)、SH2ドメインを欠くSrc変異体(Src ΔSH2)、またはSH3ドメインを欠くSrc変異体(Src ΔSH3)(D)；またはERαとともにwt Shc、dn Shc変異体Y239F/Y240F/Y317F(Shc FFF)、Y317F(Shc YYF)、またはY238F/Y240F(Shc FFY)(E)でトランスフェクトした。バーは、三連の同定の平均±SDを意味する。ANOVAによる、ステロイドを使用しないで培養した細胞に対して* p<0.05。 10

【図4C】

ERおよびARの抗アポトーシス活性がSrc/Shc/ERKシグナル伝達経路を介して媒介されることを示す図である。A. MLO-Y4細胞を、E₂またはDHTと2、5、または15分間、またはPD98059(50 μM)またはPP1(10 μM)と25分間インキュベート後、E₂またはDHTで5分間インキュベートした。細胞溶解物を得、タンパク質を抗ERK1/2または抗ホスホERK1/2(p-ERK1/2)抗体を使用したウェスタンブロット分析によって分析した。アポトーシスの同定のために、細胞を賦形剤、PD98059、またはPP1で30分間インキュベート後、E₂またはDHTを添加した。30分後、エトポシドを添加し、図1Bに記載のように6時間後にアポトーシスをアッセイした。B. 図1Bに記載のように、Src+/+対Src-/-マウス由来の胚線維芽細胞においてアポトーシスに対するE₂またはDHTの効果と比較した。実験手順に記載のように、RT-PCRを行った。C~E. HeLa細胞を、Nuc-E GFPおよび全長ERαまたはそのEドメインをコードする発現ベクター、またはARのみ(C、左のパネル)またはdn MEK(C、右のパネル)；キナーゼ活性を欠くSrc変異体(Src K⁻)、SH2ドメインを欠くSrc変異体(Src ΔSH2)、またはSH3ドメインを欠くSrc変異体(Src ΔSH3)(D)；またはERαとともにwt Shc、dn Shc変異体Y239F/Y240F/Y317F(Shc FFF)、Y317F(Shc YYF)、またはY238F/Y240F(Shc FFY)(E)でトランスフェクトした。バーは、三連の同定の平均±SDを意味する。ANOVAによる、ステロイドを使用しないで培養した細胞に対して* p<0.05。 20 30

【図4D】

ERおよびARの抗アポトーシス活性がSrc/Shc/ERKシグナル伝達経路を介して媒介されることを示す図である。A. MLO-Y4細胞を、E₂またはDHTと2、5、または15分間、またはPD98059(50 μM)またはPP1(10 μM)と25分間インキュベート後、E₂またはDHTで5分間インキュベートした。細胞溶解物を得、タンパク質を抗ERK1/2または抗ホスホERK1/2(p-ERK1/2)抗体を使用したウェスタンブロット分析によって分析した。アポトーシスの同定のために、細胞を賦形剤、PD98059、またはPP1で30分間インキュベート後、E₂またはDHTを添加した。30分後、エトポシドを添加し、図1Bに記載のように6時間後にアポトーシスをアッセイした。B. 図1Bに記載のように、Src+/+対Src-/-マウス由来の胚線維芽細胞においてアポトーシスに対するE₂またはDHTの効果と比較した。実験手順に記載のように、RT-PCRを行った。C~E. HeLa細胞を、Nuc-E GFPおよび全長ERαまたはそのEドメインをコードする発現ベクター、またはARのみ(C、左のパネル)またはdn MEK(C、右のパネル)；キナーゼ活性を欠くSrc変異体(Src K⁻)、SH2ドメインを欠くSrc変異体(Src ΔSH2)、またはSH3ドメインを欠くSrc変異体(Src ΔSH3)(D)；またはERαとともにwt Shc、dn Shc変異体Y239F/Y240F/Y317F(Shc FFF)、Y317F(Shc YYF)、またはY238F/Y240F(Shc FFY)(E)でトランスフェクトした。バーは、三連の同定の平均±SDを意味する。 40 50

ANOVAによる、ステロイドを使用しないで培養した細胞に対して* $p < 0.05$ 。

【図4E】

ERおよびARの抗アポトーシス活性がSrc/Shc/ERKシグナル伝達経路を介して媒介されることを示す図である。A. MLO-Y4細胞を、 E_2 またはDHTと2、5、または15分間、またはPD98059 ($50 \mu M$) またはPP1 ($10 \mu M$) と25分間インキュベート後、 E_2 またはDHTで5分間インキュベートした。細胞溶解物を得、タンパク質を抗ERK1/2または抗ホスホERK1/2 (p-ERK1/2) 抗体を使用したウェスタンブロット分析によって分析した。アポトーシスの同定のために、細胞を賦形剤、PD98059、またはPP1で30分間インキュベート後、 E_2 またはDHTを添加した。30分後、エトポシドを添加し、図1Bに記載のように6時間後にアポトーシスをアッセイした。B. 図1Bに記載のように、Src+/+対Src-/マウス由来の胚線維芽細胞においてアポトーシスに対する E_2 またはDHTの効果を比較した。実験手順に記載のように、RT-PCRを行った。C~E. HeLa細胞を、Nuc-E GFPおよび全長ER α またはそのEDメインをコードする発現ベクター、またはARのみ (C、左のパネル) またはdn MEK (C、右のパネル) ; キナーゼ活性を欠くSrc変異体 (Src^{K-})、SH2ドメインを欠くSrc変異体 (Src Δ SH2)、またはSH3ドメインを欠くSrc変異体 (Src Δ SH3) (D) ; またはER α とともにwt Shc、dn Shc変異体Y239F/Y240F/Y317F (Shc FFF)、Y317F (Shc Y Y F)、またはY238F/Y240F (Shc FFY) (E) でトランスフェクトした。バーは、三連の同定の平均 $\pm$ SDを意味する。ANOVAによる、ステロイドを使用しないで培養した細胞に対して* $p < 0.05$ 。

【図5】

ペプチドを使用したER α 媒介転写作用対抗アポトーシス作用およびER α 媒介対ER β 媒介効果の分離を示す図である。A. HeLa細胞を、ER α 発現ベクターのみまたは α -IIペプチドのSV40プロモーターによって駆動するGAL4 DNA結合ドメインとの融合物を保有するベクターと共に一過性にトランスフェクトした。さらに、転写研究のために、細胞をERE-lucまたはIL-6-lucとトランスフェクトしアポトーシス研究のためにEGFP-nucでトランスフェクトした。バーは、三連の同定の平均 $\pm$ SDを示し、ERE-luc刺激倍率またはIL-6-lucの阻害倍率、または賦形剤 (E_2 -) または 10^{-8} Mの E_2 (E_2 +) におけるアポトーシスを示すトランスフェクト細胞の%を示す。ANOVAによる賦形剤処理細胞にたいして* $p < 0.05$ 。B. HeLa細胞を、ER α もしくはER β のみまたは2X293もしくは2XF6ペプチドを保有する発現ベクターとともにトランスフェクトした。バーは、表示の受容体およびペプチドでトランスフェクトした細胞対受容体のみでトランスフェクトした細胞における E_2 (10^{-8} M) に応答する活性の三連の同定 (ERE-luc、IL-6-luc、または抗アポトーシス) の平均 $\pm$ SDを示す。受容体を保有するがペプチドを保有しない細胞における E_2 誘導活性を、100%とした。ANOVAによる受容体のみでトランスフェクトした細胞に対して* $p < 0.05$ 。C. HeLa細胞を、GRIPペプチドのみまたはER α を共に保有するベクターでトランスフェクトした。バーは、三連の同定の平均 $\pm$ SDを示す。ANOVAによる賦形剤処理細胞に対して* $p < 0.05$ 。

【図6】

合成リガンドを用いたERの核内転写制御を介する活性から核内転写制御を介さない活性の分離を示す図である。A. C3媒介転写のために、HeLa細胞を、C3-lucおよびER α でトランスフェクトし、表示の濃度のエストレンまたはピラゾールで処理した。バーは、 β -ガラクトシダーゼ活性を基準とした相対ルシフェラーゼ単位 (RLU) の平均 $\pm$ SDを示す。ANOVAによる空のベクター (ev) でトランスフェクトした細胞に対して* $p < 0.05$ 。図1Bに記載のように、エストレンおよびピラゾールの抗アポトーシス活性を、頭蓋冠由来の骨芽細胞において評価した。ANOVAによるエトポシドで処理されていない細胞に対して* $p < 0.05$ 。B. 図4Aに記載のように、MLO-Y4細胞を、表示濃度の異なるリガンドと5分間インキュベートし、ERKリン酸化を評価

した。

【図 7】

性ステロイド受容体の古典的核内転写制御を介する活性からの抗アポトーシス活性のリガンド誘導分離についての提案モデルを示す図である。3つの絵は、核内転写制御を介する応答または抗アポトーシス応答のいずれかを示すために必要な、リガンドとの相互作用前後の受容体タンパク質の高次構造の状態を示す。不活性非ライゲーション受容体を、中央に灰色で示す。転写活性を優先的に誘発するリガンド（例えば、図6のピラゾール）との相互作用によって誘導された高次構造の変化を、右に青色で示す。受容体の抗アポトーシス活性を優先的に誘発するリガンド（例えば、図6のエストレン）との相互作用によって誘導された高次構造の変化を、右に赤色で示す。緑色の円および緑色の菱形は、2つのリガンドを示す；結合ポケット内の完全および不完全な適合を留意のこと。受容体に対する2つの異なる型のリガンドの会合（ k_a ）および解離（ k_d ）速度を、異なる幅および長さの矢印で示す。 E_2 などのリガンドは、もちろん両方の高次構造を誘導する。抗アポトーシスモデルにおいて、受容体とSrcとの間の直接的接触が認められるにもかかわらず、アダプタータンパク質が2つの分子間の相互作用に架橋することができる。不活性非ライゲーション状態における対応する受容体タンパク質のエネルギーレベル（破線）、核内転写制御を介する高次構造（青色の線）または抗アポトーシス高次構造（赤色の線）のいずれかへの進行を下部に示す。エネルギー線図中の不連続な縦軸は、2つの活性間のエネルギー要件における尺度の相違が大きいことを示す。

10

【図 8】

α I I および 293 ペプチドの Dox 誘導性発現についての同一のマウスに同時移入した2つの導入遺伝子構築物の図である。

20

【図 9】

図9Aは、Creリコンビナーゼの骨芽細胞特異的発現についてのDox誘導系の作製および機能的特徴づけを示す図である。OG-2の調節下でのCreによるROSA26遺伝子座の活性化。「SA」は、元のROSA26遺伝子座のスプライス受容体部位を示す。図9Bは、インビトロでのCre発現のDox誘導活性化を示すゲルである。Ob-6細胞を、Tet-OG2-Cre構築物で一過性にトランスフェクトし、次いで0.5 mg/ml Doxまたは賦形剤で24時間処理した。細胞を回収し、RT-PCR分析によってCre発現を評価した。レーン1はサイズマーカーを含む。レーン2は、空の賦形剤+Doxで処理した細胞を示す。レーン3は、Doxを使用しないOG2-rtA-Creを含む細胞を示す。レーン4は、Doxを使用したOG2-rtA-Creを含む細胞を示す。レーン4は、Doxを使用して誘導したOG2-rtA-Creプラスミドを含む。

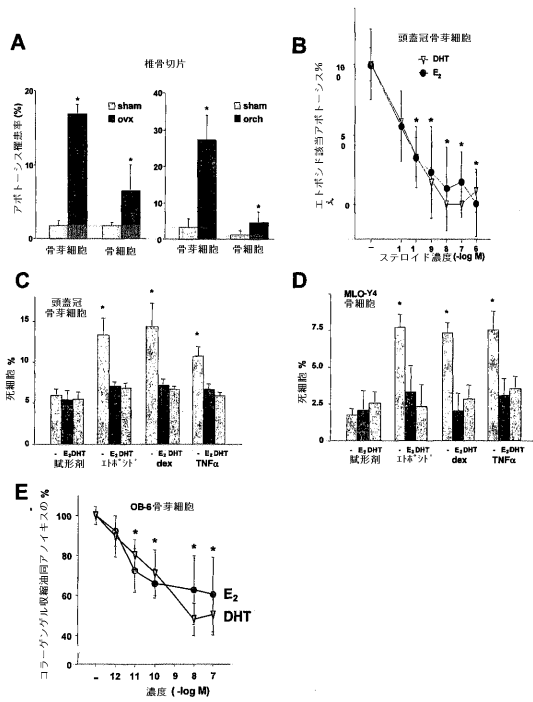
30

【図 10】

マウスER α 遺伝子のエクソン3および4を含む8.6 Kbの核内転写制御を介する遺伝子座へのフロックス化（floxed）エクソン3の標的を示す図である。

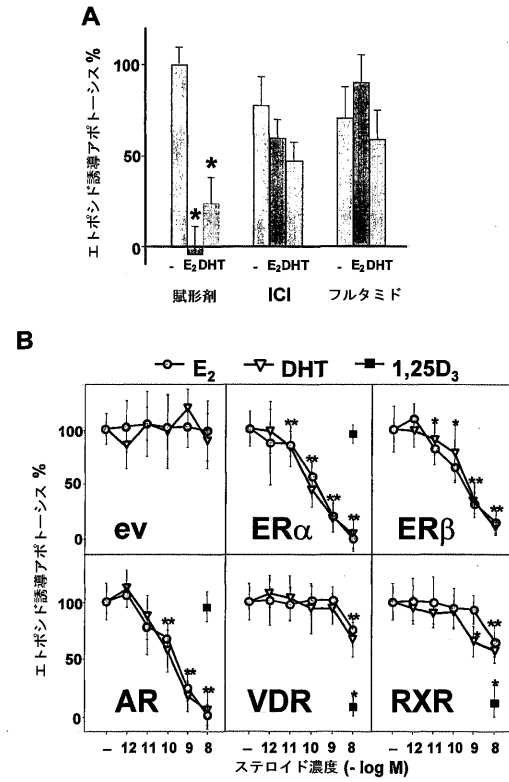
【図 1】

FIG. 1/10



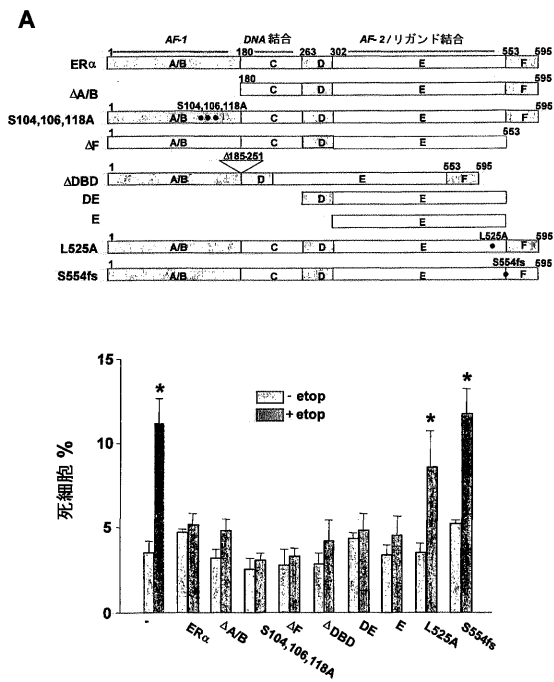
【図 2】

FIG. 2/10



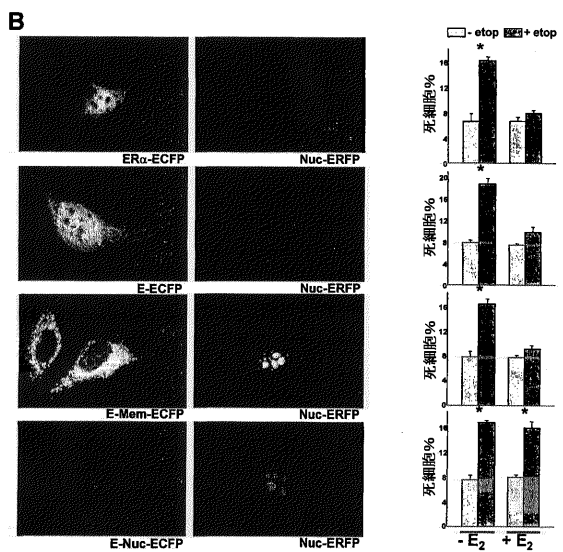
【図 3 A】

FIG. 3A/10



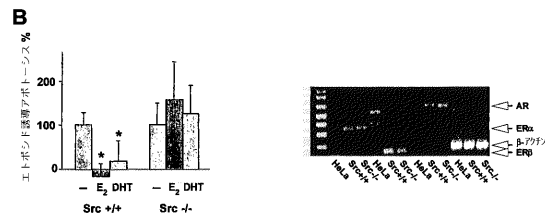
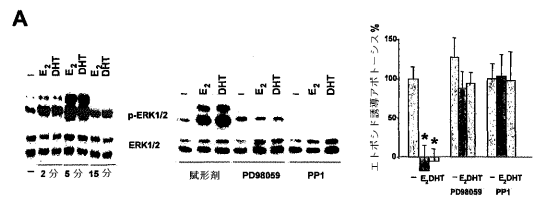
【図 3 B】

FIG. 3B/10



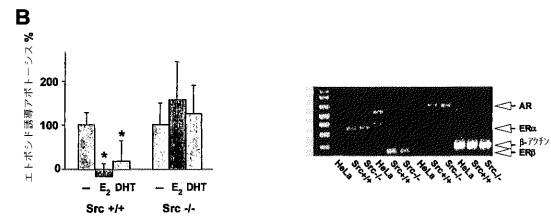
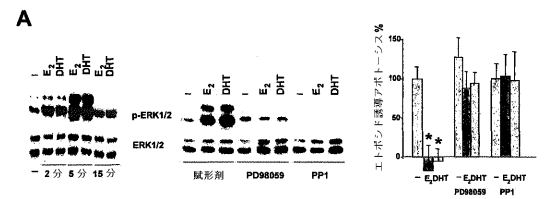
【図 4 A】

FIG. 4A,B/10



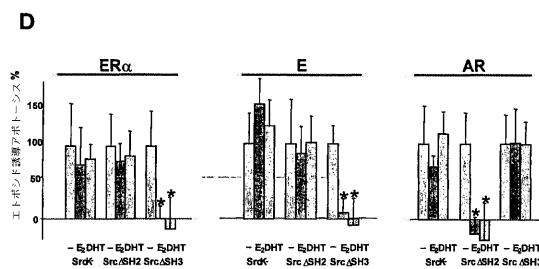
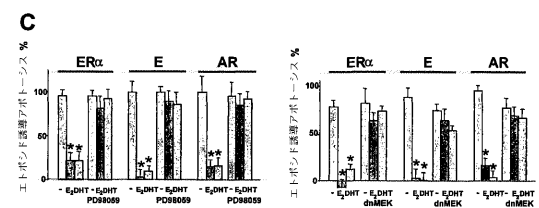
【図 4 B】

FIG. 4A,B/10



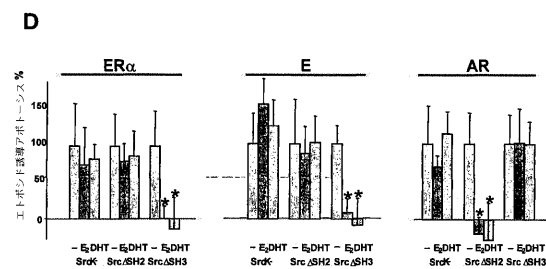
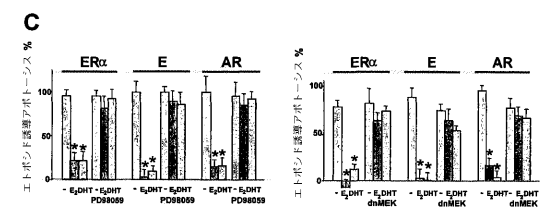
【図 4 C】

FIG. 4C,D/10



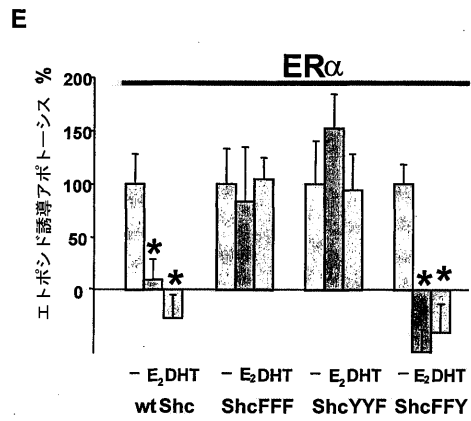
【図 4 D】

FIG. 4C,D/10



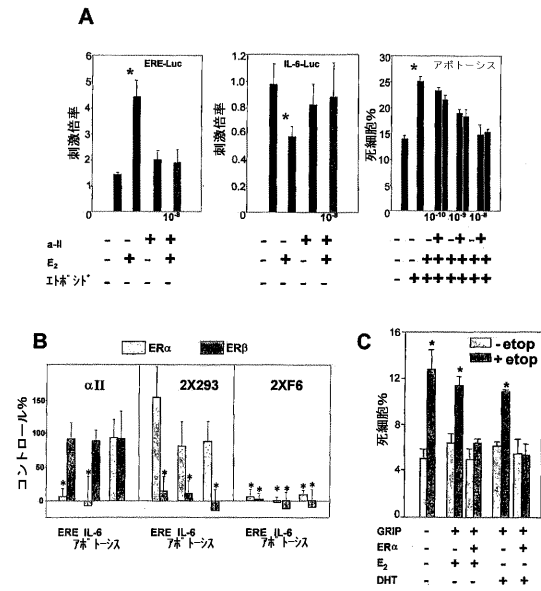
【図 4 E】

FIG. 4E/10



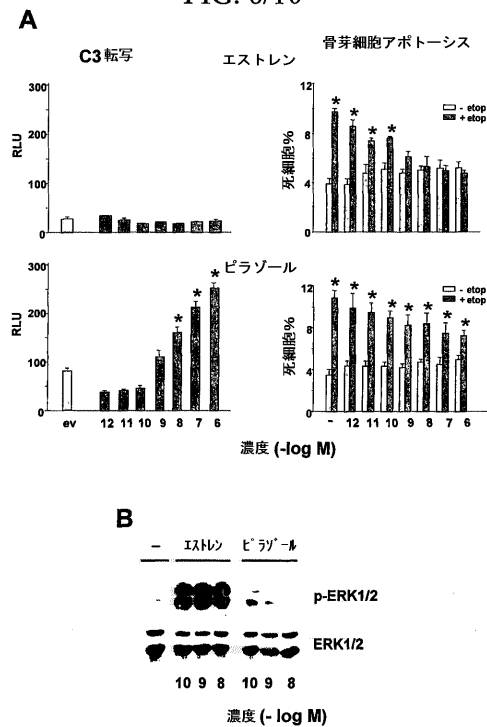
【図 5】

FIG. 5/10



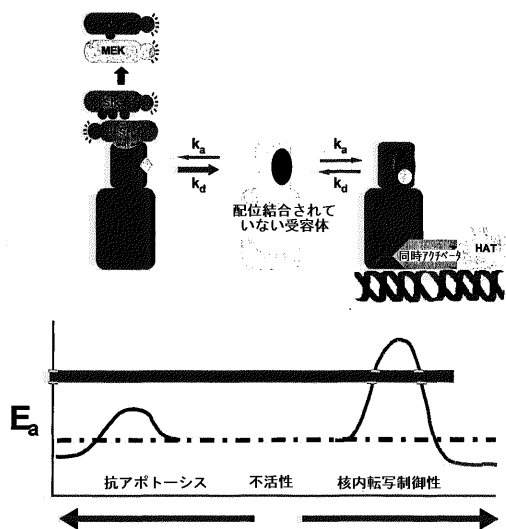
【図 6】

FIG. 6/10



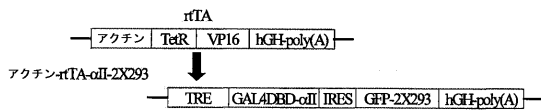
【図 7】

FIG. 7/10



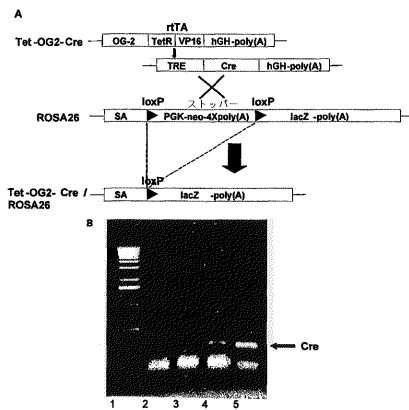
【図 8】

FIG. 8/10



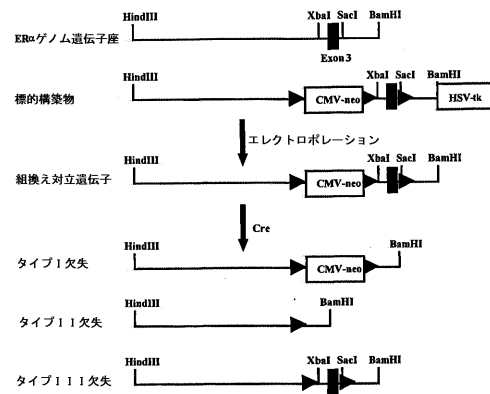
【図 9】

FIG. 9/10



【図 10】

FIG. 10/10



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
20 December 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/96605 A2

- (51) International Patent Classification: **C12Q 1/68**
- (21) International Application Number: PCT/US01/18950
- (22) International Filing Date: 13 June 2001 (13.06.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
60/211,287 13 June 2000 (13.06.2000) US
60/274,373 8 March 2001 (08.03.2001) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): **THE BOARD OF TRUSTEES FOR THE UNIVERSITY OF ARKANSAS** [US/US], 2801 South University Avenue, Little Rock, AR 72204 (US).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): **MANOLAGAS, Stavros, C.** [US/US], 35 River Ridge Circle, Little Rock, AR 72227 (US); **KOUSTENI, Stavroula** [GR/US], 14715 Chambery Dr., Little Rock, AR 72211 (US).
- (74) Agent: **KNOWLES, Sherry, M.**, King & Spalding, 191 Peachtree St., Atlanta, GA 30303-1763 (US).
- (81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published:**
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 01/96605 A2

- (54) Title: METHODS OF DISSOCIATING NONGENOTROPIC FROM GENOTROPIC ACTIVITY OF STEROID RECEPTORS
- (57) Abstract: This invention concerns the fundamental discovery of the understanding of the mechanism of action of steroidal nongenotropic effects and their relation to steroidal genotropic effects. It has been discovered that (i) steroidal nongenotropic effects and genotropic effects can be mediated by the same steroid receptor, (ii) both effects are ligand-induced; (iii) the nongenotropic effect occurs due to a ligand-induced activation of the ligand binding domain, which can be fast and loose fitting, (iv) the genotropic effect occurs due to a ligand-induced activation of the DNA-binding domain of the steroid receptor, which is typically a result of a slower, stronger interaction; and (v) the nongenotropic effect of a ligand interaction can be associated from the genotropic effect of a ligand interaction, in such a manner to effect a selective response. This invention also describes, for the first time, that certain steroids are capable of inducing a nongenotropic effect via binding to an unrelated steroid receptor.

WO 01/96605

PCT/US01/18950

**METHODS OF DISSOCIATING NONGENOTROPIC FROM GENOTROPIC
ACTIVITY OF STEROID RECEPTORS**Federal Funding

5 This invention was funded in part through a grant from the U.S. National
Institutes of Health. Therefore, the U.S. federal government has certain rights in this
invention.

This application claims priority to U.S.S.N. 60/211,287, entitled, "Sex Non-
Specific Methods and Compositions for Increasing Bone Mass", filed on June 13,
10 2000 and U.S.S.N. 60/274,373, entitled "Methods of Dissociating Nongenotropic
from Transcriptional Activity of Steroid Receptors", filed on March 8, 2001.

Field of the Invention

This invention is in the field of steroid signalling, and in particular describes a
15 method of dissociating a steroidal nongenotropic effect from the steroidal genotropic
effect, and a method for screening compounds that are capable of inducing a steroidal
nongenotropic effect without substantially inducing a steroidal genotropic effect or
are capable of inducing a steroidal genotropic effect without substantially inducing a
steroidal nongenotropic effect. This invention also describes, for the first time, that
20 certain steroids are capable of inducing a nongenotropic effect via binding to an
unrelated steroid receptor.

BACKGROUND OF THE INVENTION

Due to similarities in molecular structure and homologies in protein sequence,
25 a number of proteins have been classified into a superfamily of steroid nuclear
receptors. The steroid protein receptor family includes at least sixty four known
receptors (Cell, Vol 97, 161-163, April 16, 1999), including the α and β form of the
estrogen receptors (ER α and ER β), the estrogen receptor related receptor-1 and
receptor-2 (ERR-1 and ERR-2), the androgen receptor (AR), the progesterone
30 receptor (PR), the retinoic acid receptor (and related orphan receptors ROR α , ROR β ,
and ROR γ); the glucocorticoid receptor (GR), the mineralcorticoid receptor (MR), the
Vitamin D receptor, the neuroactive receptor, the farnesoid X receptor (FXR), the
liver X receptor (LXR α and LXR β), the thyroid hormone receptors A and B (which
bind triiodothyronine (T3) and thyroxine (T4)), the COUP-TF receptor, the ecdysone

WO 01/96605

PCT/US01/18950

receptor, the peroxisome proliferator activated protein receptors (PPAR, including PPAR α , PPAR γ , and PPAR δ), pregnane X (PXR), the bile acid binding family, as well as chimeric receptors and orphan receptors.

It has traditionally been accepted that steroids bind to intracellular receptors and subsequently modulate transcription and protein synthesis typically via a steroid/receptor complex that induces gene activity. Even though the steroid receptors are primarily known as ligand-activated transcription factors, recently, a number of very rapid (e.g., seconds to approximately fifteen minutes) effects of steroids have been identified that are inconsistent with a genotropic effect by virtue of the rapidity of action. These observed nongenotropic effects of steroid hormones were recently reviewed by Falkenstein, et al., in "Multiple Actions of Steroid Hormones-A Focus on Rapid, Nongenotropic Effects," *Pharmacol. Rev* 52:513-555, 2000. See also McEwen, B.S. and Alves, S.E., *Endocr. Rev.* 20, 279-307, 1999. Many of these rapid actions have been attributed to the ability of estrogens or other steroids to interact with putative membrane-associated receptors (Watson, et al., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 220, 9-19, 1999). However, heretofore it was unknown whether these nongenotropic effects are mediated by proteins that are the same as or distinct from those that mediate the transcriptional effects of the steroids. Moreover, the relationship of nongenotropic effects of steroids to the transcriptional activity of the classical receptors is completely unknown. For example, Falkenstein et al. made the following observations in their 2000 review article.

(i) Evidence for nongenotropic steroid effects and distinct receptors involved is presented for all steroid groups including related compounds like vitamin D, and thyroid hormones. The physiological and clinical relevance of these rapid effects is still largely unclear.... Falkenstein, et al., page 514, abstract.

(ii) In contrast to genotropic steroid action, nongenotropic steroid effects are principally characterized by their insensitivity to inhibitors of transcription and protein synthesis, and-representing the most obvious experimental evidence-by their rapid onset of action (within seconds to minutes). These rapid effects are likely to be mediated through receptors with pharmacological properties distinct from those of the intracellular steroid receptors...Discrepancies in pharmacological properties alone are not sufficient to support the hypothesis of separate receptor proteins for nongenotropic action; however, this important issue is addressed in Section III.B., and various evidence for the involvement of both classic and nonclassic receptor proteins in nongenotropic signaling is given. Falkenstein, et al., page 516.

WO 01/96605

PCT/US01/18950

(iii) A wide array of nongenotropic effects of steroids appear to be mediated through putative nonclassic membrane receptors with pharmacological properties that are clearly distinct from those of the classic intracellular steroid receptors. Falkenstein, page 520.

(iv) In summary, a substantial body of evidence now exists to indicate that at least some of the rapid $1\alpha,25-(OH)_2D_3$ -induced effects are transmitted by a membrane receptor distinct from the intracellular receptors belonging to the steroid and thyroid hormone superfamily. Falkenstein et al, page 521.

(v) It is obvious that many aspects of nongenotropic steroid action still require continuous intensive research, and essential clues for their understanding are still lacking. This also includes the still unaccomplished cloning of the putative membrane receptor initiating rapid steroid signaling. There are preliminary findings on membrane proteins that bind steroids (mPR, annexin II), but none has been definitively proven to represent a steroid membrane receptor responsible for rapid action. Clearly, the cloning of such a receptor would be a major advance, but it should not be forgotten that the definition of the physiological, pathophysiological, and last but not least, clinical relevance of novel aspects of steroid action should be another target of paramount importance. This may even be achieved without the receptors cloned, although the latter would definitively also ease clinically oriented research. Falkenstein et. al., page 546.

In particular, Falkenstein et al, included the following as evidence for putative separate receptors mediating the nongenotropic action of steroids:

(i) the existence of nongenotropic steroid effects in cells or tissues devoid of the respective classic receptor (e.g., in cells from knockout animals as shown for MR and PR) and the insensitivity of rapid steroid effects to classic antagonists (Falkenstein, et al., page 520); and

(ii) the observation that RU-28318 blocks rapid signaling does not necessarily imply that rapid effects of aldosterone are mediated by the classic receptor, an unlikely assumption given the fact that in MR knockout mice aldosterone is still nongenotropically active (Falkenstein, et al., page 535).

As a nonlimiting example of this, sex steroids have been used to treat bone loss but the underlying mechanism of action is unclear. The genotropic effects of sex steroids are mediated through nuclear receptor proteins, which by and large, discriminate between estrogen and androgen signaling and are distributed in a sex specific pattern among female and male target organs, respectively. Besides the classical estrogen receptor ($ER\alpha$), many tissues express a second form of the estrogen

WO 01/96605

PCT/US01/18950

receptor (ER β). Binding of the steroids to their respective cognate receptors leads to conformational changes of the protein which allow it to interact with the transcriptional machinery directly, or indirectly via protein-protein interactions with other transcription factors. Numerous effects of estrogen have been documented over the last few years in a variety of cell types that exhibit such a fast action that it makes a genotropic mechanism of action unlikely (Lieberherr, M., B. et al. (1993) *J. Bone Miner. Res.* 8:1365-1376; Aronica, S.M. et al. (1994) *Proc Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91:8517-8521; Endoh, H., H. et al. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 235:99-102; McEwen, B.S. and S.E. Alves. (1999) *Endocr. Rev.* 20:279-307; Chen, Z., et al. (1999) *J. Clin. Invest.* 103:401-406; Castoria, G. et al. (1999) *EMBO J.* 18:2500-2510; Toran-Allerand, C.D. et al. (1999) *Front. Neuroendocrinol.* 20:97-121; Norfleet, A.M. et al. (1999) *Endocrinology* 140:3805-3814). Many of these rapid actions have been attributed to the ability of estrogen to interact with a membrane-associated form of ER (Collins, P. and C. Webb. (1999) *Nat. Med.* 5:1130-1131; Pietras, R.J. and C.M. Szego. (1999) *Nat. Med.* 5:1330; Razandi, M. et al. (1999) *Mol. Endocrinol.* 13:307-319; Norfleet, A.M., et al. (1999) *Endocrinology* 140:3805-3814; Watson, C.S. and B. Gametchu (1999) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 220:9-19). However, the precise identity and subcellular localization of this site, including whether it is the classical receptor or whether it is localized in the membrane bilayer, or the membrane structures called caveolae (Okamoto, T., A. et al. (1998) *J. Biol. Chem.* 273:5419-5422; Schlegel, A., et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274:33551-33556), or the cytosol, has not been determined.

The Role of the ER and AR in Adult Bone Homeostasis

Receptors for ER α and ER β or AR (androgen receptor) have been convincingly demonstrated in proliferating chondrocytes, osteoblasts, bone marrow stromal cells (Eriksen, E.F. et al. (1988) *Science* 241:84-86; Komm, B.S. et al. (1988) *Science* 241:81-84; Ernst, M. et al. (1991) *Mol. Endocrinol.* 5:1597-1606; Benz, D.J. et al. (1991) *J. Bone Miner. Res.* 6:531-541; Benz, D.J., et al. (1991) *Endocrinology* 128:2723-2730; Monaghan, B.A. et al. (1992) *Clin. Orthop.* 277-280; Bellido, T., G. et al. (1993) *Endocrinology* 133:553-562; Ben-Hur, H., G. et al. (1993) *Calcif. Tissue Int.* 53:91-96; Kusec, V., et al. (1998) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83:2421-2428; Kennedy, J. et al. (1999) *Bone* 24:9-16; Nilsson, L.O. et al. (1999) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84:370-373), as well as in osteoclasts and their progenitors (Oursler, M.J. et al. (1993) *Ann. Med.* 25:361-371). Remarkably, the level of

WO 01/96605

PCT/US01/18950

expression of ER α , ER β and AR in osteoblasts and osteoclasts is at least 10-fold lower compared to reproductive tissues. In addition, there is no gender specific distribution of the receptors in bone cells, as similar levels of ER or AR compared to female and male reproductive organs, have been found in cells from males and

5 females (Benz, D.J. et al. (1991) *J.BoneMiner.Res.* 6:531-541; Benz, D.J., et al. (1991) *Endocrinology* 128:2723-2730; Komm, B.S. et al. (1988) *Science* 241:81-84; Braidman, I. et al. (2000) *Bone* 26:423-427). Moreover, there is seemingly conflicting evidence suggesting on one hand that estrogen is the bone active sex steroid in both the male and the female adult skeleton, while on the other hand non-

10 aromatizable androgen can protect the female skeleton against the adverse effects of estrogen deficiency (Riggs, B.L. et al. (1998) *J.Bone Miner.Res.* 13:763-776; Vanderschueren, D. et al. (1998) *Bone* 23:391-394). Indeed, clinical observations of decreased bone mass in a male with mutant estrogen receptor (Smith, E.P. et al. (1994) *N.Engl.J.Med.* 331:1056-1061) and increased bone mass after treatment with

15 estrogen in two males with P-450 aromatase deficiency (Carani, C. et al. (1997) *N.Engl.J Med.* 337:91-95; Bilezikian, J.P. et al. (1998) *N.Engl.J Med.* 339:599-603) have suggested that estrogen derived by peripheral aromatization of androgens are critical for the maintenance of bone mass in men as well (Riggs, B.L. et al. (1998) *J.Bone Miner.Res.* 13:763-776). However, in all three cases, the decreased bone mass

20 and the increased levels of bone markers in young males with estrogen-deficiency, in the face of androgen sufficiency, could well be the result of failure to achieve peak bone mass because of defective skeletal growth during development as well as the fact that these individuals never underwent puberty -- not to loss of bone mass, as it is the case with the common forms of osteoporosis. In support of this contention,

25 humans with complete androgen insensitivity, due to mutations in the androgen receptor gene on the X-chromosome, have decreased bone mass, in spite of the elevated estrogen levels Schwartz, B.D. et al. (1999) *Endocrine Society 81st Annual Meeting* 93(Abstr)). Moreover, androgens, including non-aromatizable ones, like DHT, have identical effects to those of estrogen on the biosynthetic activity and the

30 birth as well as the death of bone cells in vitro and in vivo, at least in rodents (Bellido, T. et al. (1995) *J. Clin. Invest.* 95:2886-2895; Weinstein, R.S. et al. (1997) *Endocrinology* 138:4013-4021; Weinstein, R.S. and S.C. Manolagas (2000) *Am J.Med.* 108:153-164; Weinstein, R.S. et al. (1997) *Endocrinology* 138:4013-4021; Weinstein, R.S., et al. (1999) *J.Bone.Minor.Res.* 14:S451(Abstr)); and even more

WO 01/96605

PCT/US01/18950

important, can prevent bone loss in ovariectomized females (Vanderschueren, D., E. et al. (1992) *Endocrinology* 130:2906-2916; Tobias, J.H. et al. (1994) *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.* 267:E853-E859; Coxam, V. et al. (1996) *Bone* 19:107-114, Lea, C.K. and A.M. Flanagan. (1999) *J.Endocrinol.* 160:111-117). To
 5 date, there is no explanation for why bone cells express only small levels of the ER and AR compared to reproductive tissues, or for the lack of gender distribution of ER and AR between male and female bone cells, or the puzzling efficacy of either class of sex steroids in females and males.

This state of misunderstanding regarding the sex-non-specific efficacy of
 10 either class of sex steroids in females and males and the role of sex steroid receptors in these effects has been further confused by the ambiguous skeletal phenotype of knockouts of the ER α or ER β in mice, designated α ERKO and β ERKO, respectively (Couse, J.F. and K.S. Korach (1999) *Endocr.Rev.* 20:358-417). α ERKO or both ER α and ER β (Double-ER-Knockout mice, DERKO) exhibit a weak bone phenotype
 15 characterized by a decrease in the length and diameter of the femur in both females and males, but only a purported minor and localized decrease of bone mineral density in the femur. ER β knockout (β ERKO) mice on the other hand exhibit longer femora and increased cortical periosteal circumference in females, but no change in males (Windahl, S.H. et al (1999) *J Clin.Invest.* 104:895-901). Nonetheless, volumetric
 20 pQCT or histomorphometry failed to reveal any changes in these knockout mice as compared to wild type controls, indicating that the purported changes in bone mineral density (by DEXA) are most likely the result of smaller bones. Importantly, the decreased length of the femur in the α ERKO and DERKO mice is diametrically
 25 opposite to the increased length of long bones of patients with hypogonadism (including the aforementioned cases (Smith, E.P., et al. (1994) *N.Engl.J.Med.* 331:1056-1061; Carani, C. et al. (1997) *N.Engl.J Med.* 337:91-95; Bilezikian, J.P. et al. (1998) *N.Engl.J Med.* 339:599-603), which results from delayed epiphyseal closure. Therefore, the minor phenotypic changes in the ERKO mice, if any, may be
 30 relevant to loss of estrogenic effects on skeletal growth, but they are not informative in respect to the effects of estrogen on pubertal or adult bone remodeling. An equivocal bone phenotype has been also observed in aromatase-deficient (ArKO) mice (Oz, O.K. et al. (2000) *J Bone Miner.Res* 15:507-514). ArKO males, but not females, have decreased long bone growth. On the other hand, there is increased turnover in the females, but decreased turnover in the males. This result strongly

WO 01/96605

PCT/US01/18950

argues against the contention that estrogen is the bone active sex steroid in either sex. Importantly, wall thickness, a surrogate for osteoblast number or survival, in one of the two male patients (that a bone biopsy was performed) as well as in male and female mice with aromatase deficiency is estrogen-dependent and can be corrected following treatment with estrogen (Vanderschueren, D. et al. (1998) Bone 23:391-394). On the other hand, turnover, as reflected by changes in osteoclastogenesis and osteoblastogenesis and thereby cell number, are estrogen-dependent in the females (exhibiting the expected increase secondary to estrogen deficiency), but androgen-dependent in the male (exhibiting the expected suppression secondary to androgen excess). Likewise, androgen-resistant male rats and mice (a model of testicular feminization, Tfm) have decreased bone length but normal trabecular bone volume, in spite of the fact that they have higher estrogen concentrations (resulting from aromatization of their nonfunctional androgens) (Young, C.Y. et al. (1989) Endocrinology 124:771-775; Gaspar, M.L. et al. (1991) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 88:8606-8610; Murphy, L. and P.J. O'Shaughnessy (1991) J.Endocrinol. 131:443-449; Ucsugi, Y. et al. (1992) Anat.Rec. 234:541-548; Vanderschueren, D. et al. (1993) J.Bone Miner.Res. 8:801-809).

WO 00/20007 filed by the Board of Trustees for the University of Arkansas discloses a method for increasing bone mass in a host by administering a compound that binds to the estrogen α or β receptor (and in one aspect of that embodiment, wherein the compound is not an estrogen) or the androgen receptor (and in one aspect of that embodiment, wherein the compound is not an androgen) with an association constant of at least 10^8 M^{-1} and induces gene transcriptional activity at a level of no greater than 5% that of 17β -estradiol while inducing an increase in extracellular signal regulated kinase (ERK) activity. WO 00/20007 emphasizes that one method to preserve the ability of an estrogen or androgen to increase ERK activity without increasing transcriptional activity of the estrogen or androgen is to attach a substituent or moiety to the estrogen or androgen to prevent it from penetrating the cell, and thus traveling to the nucleus to activate gene activity.

McDonnell and co-workers have isolated several classes of small (11-19 amino acids) peptides that bind distinct sites of the ER, and can selectively block ER α but not ER β -mediated transcription, and vice versa, when tested on a consensus ERE

WO 01/96605

PCT/US01/18950

(Estrogen Response Element) (Norris, J.D. et al. (1999) Science 285:744-746; Chang, C. et al. (1999) Mol.Cell Biol. 19:8226-8239).

Screening Methods

5 Several methods for screening for agents that act as or through steroid receptors are known in the art. For example, U.S. Pat. No. 5,071,773 to Evans et al. discloses and claims methods for determining whether a protein suspected of being a hormone receptor stimulates transcription and also for determining whether a compound is a functional ligand for receptor proteins.

10 U.S. Pat. No. 5,298,429 also to Evans et al. discloses a bioassay for determining whether compounds are functional ligands of hormone receptor proteins by assaying the effect of a compound on transcription in cultured cells expressing non-endogenous DNA encoding a hormone receptor protein or a variant thereof and DNA encoding an operative hormone response element linked to a reporter gene.

15 General bioassays include U.S. Pat. No. 5,877,007 to Housey which discloses a bioassay for compounds that activate a protein expressed in cells at a higher level than control cells such that the compound-activated protein induces a phenotypic change in the cells.

20 WO 00/37681 in the name of American Home Products Corp. discloses bioassays for identifying receptor modulators specific for either ER α or ER β . The disclosed assays use two sets of cells in which the first set contains DNA encoding a functional ER α and a responsive reporter gene construct, and the second set of cells contains and ERE reporter construct and ER β . Compounds can be screened for selective activation or inhibition of transcription in cells expressing ER α or ER β .

25 U.S. Pat. No. 5,643,720 discloses methods for screening for ligands that bind to the retinoid receptor to form a complex which binds AP-1 and prevents DNA binding. US Pat. No. 5,702,914 discloses bioassays for determining whether a compound is a functional ligand of a retinoid receptor by assaying for transcription of a reporter gene construct in genetically modified cells.

30 U.S. Pat. No. 5,863,733 discloses methods for determining whether a chemical specifically modulates the transcriptional activity of a gene of interest using a reporter gene construct in genetically altered cells.

U.S. Pat. No. 5,563,036 discloses methods for screening for compounds that inhibit the binding of transcription factors to nucleic acids by detecting the presence

WO 01/96605

PCT/US01/18950

or absence of labeled transcription factors on a solid substrate when treated with a test compound.

U.S. Pat. No. 5,854,004 discloses methods for screening for compounds that modulate a receptor-dependent signal transduction pathway by monitoring the transcription of a reporter gene in cells genetically modified to contain a reporter gene and a DNA regulatory sequence responsive to changes in concentration of inositol-1, 4,5-triphosphate (IP₃) and diacylglycerol.

U.S. Pat. No. 5,639,597 top Lauffer et al. discloses a cell-free assay to determine whether a compound is a ligand of a receptor.

U.S. Pat. No. 6,060,238 to Dixit discloses a method for screening for agents that inhibit apoptosis as compared with cowpox cytokine response modified A.

U.S. Patent No. 5,506,102 filed by McDonnell et al., describes methods of using the A form of the progesterone receptor to screen for antagonists of steroid intracellular-mediated transcription.

U.S. Patent No. 5,834,213 discloses a tissue culture screening system to monitor a transcriptional response treated by a chemical signal interacting with a plasma membrane receptor. The tissue culture screening system includes a cell line containing a membrane receptor, a target gene and a specific receptor selected from the group consisting of a steroid receptor, a vitamin receptor and an orphan receptor.

WO 99/54728 filed by Novalon Pharmaceutical Corporation describes a method to predict whether a test compound will modulate the biological activity of a receptor in a multicellular organism on the basis of its interaction with peptide or nucleic acid ligands that modify the conformation of the receptor. The data is compared to the fingerprints for reference compounds with known biological activities.

Other references of interest

U.S. Pat. Nos. 5,362,720; 5,545,634; 5,846,960 and 5,567,695 to Labrie disclose a method for the treatment or prevention of breast and endometrial cancer, osteoporosis and endometriosis in susceptible warm-blooded animals comprising administering a low dose of a progestin or other steroid derivative having androgenic activity and low masculinizing activity. In a primary embodiment, the method involves activating the androgen receptor by administering at least one androgenic steroid having a K_i value of less than 2x10⁻⁸ for the androgen receptor, an androgen

WO 01/96605

PCT/US01/18950

receptor-mediated inhibitory effect on the growth of human breast cancer ZR-75-1 cells which reaches half-maximal value at a concentration below 3.0 nanomoles per liter, and no visible masculinizing activity at blood serum concentrations below 50 nM, wherein every such androgenic steroid is administered at a dosage sufficiently
5 low to maintain a cumulative serum concentration of below 50 nanomoles per liter.

U.S. Patent No. 5,843,934 to Simpkins claims that an estrogen having insubstantial sex-related activity can be administered to a patient to retard the adverse effects of osteoporosis in a male or female. The '934 patent does not address how to select a compound to increase bone mass, but instead teaches how to retard the effect
10 of bone loss. In a preferred embodiment, the estrogen used is 17 α -estradiol. The '934 patent states that the inventors do not understand the mechanism of how 17 α -estradiol exerts a cytoprotective effect, but suggests that it exerts a direct protective effect (assumably as opposed to through a receptor action). One example given of a direct protective effect is the modulation of the regulation of glucose (see columns 7 and 8
15 of the '934 patent).

WO 98/22113 filed by the University of Florida Research Foundation, Inc. discloses methods to utilize an α or β -isomer of an estrogen compound to confer cytoprotection on a population of cells associated with an ischemic event.

U.S. Patent No. 5,859,001 discloses the use of non-estrogen compounds
20 having a terminal phenol group in a four-ring cyclopentanophenanthrene compound structure to confer neuroprotection to cells.

WO 98/31381 filed by the University of Florida Research Foundation, Inc. discloses a method for enhancing the cytoprotective effect of polycyclic phenolic compounds on a population of cells that involves the steps of administering a
25 combination of polycyclic phenolic compounds and anti-oxidants to achieve an enhanced effect. One disclosed combination is glutathione and estrogen.

WO 99/61044 filed by the Board of Trustees for the University of Arkansas discloses the use of noggin or antagonists of noggin as therapeutic agents in the regulation of osteoblastogenesis and osteoclastogenesis to control bone remodeling.
30 WO 22/20625 also to the Board of Trustees of the University of Arkansas discloses that glucocorticoid-induced bone disease is due to changes in the birth and death rate of bone cells and that glucocorticoid administration increases apoptosis of mature

WO 01/96605

PCT/US01/18950

osteoblasts and osteocytes and decreases bone formation rate and bone mineral density.

Furthermore, WO 00/19823 to the Board of Trustees of the University of Arkansas discloses that human parathyroid hormone 1-34 [hPTH(1-34)] exerts anti-apoptotic effects on osteoblasts when administered in an intermittent fashion to mice in vivo. That same application also provides evidence that bovine PTH(1-34) [bPTH(1-34)] prevents glucocorticoid-induced apoptosis of osteoblastic and osteocytic cells in vitro.

WO 00/20625 also to the Board of Trustees of the University of Arkansas discloses that glucocorticoid administration increases apoptosis of mature osteoblasts and osteocytes and decreases bone formation rate and bone mineral density accompanied by defective osteoblastogenesis and osteoclastogenesis in the bone marrow.

From the above discussion, it is apparent that in spite of considerable progress toward an understanding of the steroid signaling, there is a lack of understanding of how steroids mediate nongenotropic and genotropic effects.

It is an object of the present invention to induce selective steroidal effects.

It is also an object of the present invention to provide a method to treat steroid and or steroid receptor related disorders or diseases.

It is yet another object of the present invention to provide a transgenic animal to screen for compounds that can induce a selective steroidal response.

It is yet another object of the present invention to provide a method to select compounds that are useful to induce a selective steroidal response.

SUMMARY OF THE INVENTION

This invention concerns the fundamental discovery of the understanding of the mechanism of action of steroidal nongenotropic effects and their relation to steroidal genotropic effects. It has been discovered that (i) steroidal nongenotropic effects and genotropic effects can be mediated by the same steroid receptor; (ii) both effects are ligand-induced; (iii) the nongenotropic effect occurs due to a ligand interaction in the ligand binding domain of the steroid receptor, which can be fast and loose fitting; (iv) the genotropic effect occurs due to a ligand interaction with the ligand-binding domain but requires the DNA-binding domain of the steroid receptor, which is typically a result of a slower, stronger interaction; and (v) the nongenotropic effect of

WO 01/96605

PCT/US01/18950

a ligand interaction can be dissociated from the genotropic effect of a ligand interaction, in such a manner to effect a selective response.

Based on this pioneering discovery, a method is provided of dissociating a steroidal nongenotropic effect from the steroidal genotropic effect of a steroid receptor. In one embodiment, the invention includes a method for selectively inducing a steroidal nongenotropic effect, that includes contacting the receptor with a compound that sufficiently interacts with the ligand binding domain of the receptor in a manner that causes the receptor to mediate a nongenotropic effect, while not activating the DNA-binding domain such that a significant genotropic effect is not produced. In an alternative embodiment, a method is provided for selectively inducing a steroidal genotropic effect, that includes contacting the receptor with a compound that sufficiently activates the DNA-binding domain of the receptor in a manner that causes the receptor to mediate a genotropic effect, while not causing a significant nongenotropic effect. It is considered that a ligand does not induce a "significant" or "substantial" effect if the effect is less than 10% that of the natural steroidal effect, and in a preferred embodiment, less than 5, 1, or 0.1 percent that of the natural steroidal effect.

Exemplary forms of nongenotropic activities include but are not limited to activation of intracellular second messenger systems, signal transduction pathways, protein kinase signal transduction pathways, MAP kinase signal transduction pathways, Src/Shc/ERK signal transduction pathways; regulation of intracellular calcium concentration; secretion; changes in cellular morphology; cell motility; cytoskeletal rearrangements; and apoptosis.

In another aspect of the invention, a selectivity inducing compound (including but not limited to a peptide or protein or a ligand antagonist) can be administered that competes with an endogenous or exogenous ligand of a steroid receptor for a binding site on the receptor as a means to mask the activity of that ligand-binding interaction. As one example, a peptide or ligand antagonist can be administered that binds with the ligand binding domain in a way that prevents a ligand from inducing a nongenotropic effect. In an alternative embodiment, a peptide or ligand antagonist can be administered that binds with the ligand-binding domain of the receptor in a way that prevents a ligand from inducing a genotropic effect. The selectivity-inducing compound can inhibit the transcriptional activity of the steroid receptor directly by interfering with DNA-receptor interactions or indirectly by preventing the receptor

WO 01/96605

PCT/US01/18950

from forming a protein-protein interaction with other transcriptional regulators. Additionally, the selectivity inducing compound can exist as a complex having at least two components such that when the components combine, the complex inactivates the genotropic activity and activates the nongenotropic activity of a steroid receptor.

In a still another aspect, a method for inducing a selective effect of a steroid receptor is provided that includes administering an effective amount of a compound that inactivates the DNA binding region of the receptor by inducing a conformational or configurational change in the receptor. In yet another aspect of the invention, a method for inducing a selective effect of a steroid receptor is provided that includes administering an effective amount of a compound that inactivates functions mediated only by the ligand binding region of the receptor by inducing a conformational or configurational change in the protein.

In an alternative embodiment, a method is provided for screening compounds that are capable of inducing a steroidal nongenotropic effect without substantially inducing a steroidal genotropic effect or are capable of inducing a steroidal genotropic effect without substantially inducing a steroidal nongenotropic effect. The method can be carried out in a number of ways, including:

- (1) assessing the ability of the compound to appropriately bind to the ligand-binding domain of the steroid receptor without substantially activating the DNA-binding domain of the steroid receptor or to appropriately activate the DNA-binding domain of the steroid receptor without substantially activating functions that are mediated only by the ligand-binding domain of the steroid receptor; and then
- (2) measuring the biological activity of the test compound to assess its ability to induce a target nongenotropic effect without substantially inducing a genotropic effect or its ability to induce a target genotropic effect without inducing a substantial nongenotropic effect.

The first step can be accomplished via molecular modeling, preferably with the aid of a computer. Alternatively, modified forms of the receptor consisting only of the ligand-binding domain and lacking a functional DNA binding domain can be used to determine whether the test compound activates the ligand binding domain or DNA binding domain. The modified form can be expressed, for example, in a transformed cell. Cells cultured in vitro can be genetically altered to express a steroid receptor or a genetic variant thereof. Genotropic activity can be quantified using

WO 01/96605

PCT/US01/18950

known techniques such as measuring the amount of total mRNA generated in response to a test compound or the mRNA specific for one or more steroid regulated genes. Screening can be done in vivo or in vitro.

Alternatively, steps 1 and 2 can be combined by simply assaying for compounds that selectively induce either a nongenotropic or genotropic effect without substantially inducing the other effect in an in vitro cell-based assay.

This invention can be used to selectively effect a response in any of the family of steroid receptors, including the α or β form of the estrogen receptors (ER α and ER β), the estrogen receptor related receptor-1 and receptor-2 (ERR-1 and ERR-2), the androgen receptor (AR), the progesterone receptor (PR), retinoic acid receptor (and related orphan receptors ROR α , ROR β , and ROR γ); glucocorticoid receptor (GR), mineralocorticoid receptor (MR), Vitamin D receptor, neuroactive receptor, farnesoid X receptor (FXR), liver X receptor (LXR α and LXR β), thyroid hormone receptors A and B (which bind triiodothyronine (T3) and thyroxine (T4)), COUP-TF, ecdysone, the PPAR family (peroxisome proliferator activated protein, including PPAR α , PPAR γ , and PPAR δ), pregnane X ("PXR"), bile acid binding family, and chimeric and orphan receptors thereof.

In another embodiment of the invention, it has been discovered that steroids can induce a nongenotropic effect via an interaction with a steroid receptor other than its typical binding receptor. In one nonlimiting illustration of this aspect of the invention, it has been discovered that the estrogen receptors (ER α and ER β) and the androgen receptor (AR) can transmit anti-apoptotic signals to osteoblasts and osteocytes with similar efficiency irrespective of whether the binding ligand is an estrogen or an androgen. Further, it has been discovered that the nongenotropic receptor-dependent anti-apoptotic mechanism of action of estrogens and androgens, which in the case of osteoblasts/osteocytes involves activation of extracellular signal regulated kinases (ERKs) are mechanistically dissociable from the transcriptional activity of the receptors.

The fact that a steroid can use a previously considered unrelated steroid receptor to induce a nongenotropic effect now explains the anomaly described in the Background of the Invention that nongenotropic steroid effects occur in cells or tissues devoid of the respective classic receptor. In such a case, the steroid is using an unrelated steroid receptor to mediate that nongenotropic effect.

WO 01/96605

PCT/US01/18950

As one illustration, by testing human estrogen receptor clones that have mutations in various domains of the protein, the area of the receptor responsible for nongenotropic effects (for example, an anti-apoptotic effect) has been located. The term anti-apoptotic domain as used herein refers to that location on the protein that
5 mediates an anti-apoptotic effect on osteoblasts and osteocytes when bound to an anti-apoptosis-inducing ligand, such as an estrogen or an androgen. It has been discovered that the anti-apoptotic domain of the estrogen receptor is in the ligand binding region (domain E). It has specifically been found that when a synthetic peptide (α II) binds to the ligand bound-estrogen receptor at domain E, which is known to effectively
10 blockade the transcriptional activity of the estrogen receptor, there is no effect on the subsequent anti-apoptotic effect of that ligand bound estrogen receptor.

Using the ER α as a prototype, it was next investigated whether the anti-apoptotic activity of the receptors for sex steroids requires the same or different domains than those required for transcriptional activity (**Figure 3A**). To do this, the effects of several mutants of the ER α on prevention of apoptosis were compared.
15 These mutants have been shown to produce the expected proteins when transiently transfected into human cells (Schodin et al., 1995; Kraus et al., 1997; Ekena et al., 1996). It was shown that the mutants comprising the dimerization (D) and the ligand-binding domain (E) or only the E domain also produced the expected proteins and
20 lacked transcriptional activity.

Like ER α , mutant Δ A/B which lacks the entire N-terminal transcription activation function (AF-1) domain, or a mutant in which serines were substituted with alanine (S104,106,118A), or mutant Δ F, which lacks the F domain, or mutant Δ DBD which lacks most of the DNA binding domain (amino acids 185-251), were able to convey
25 the anti-apoptotic signal of the E₂-bound ER. Yet, all these mutants exhibit reduced or no ERE-mediated gene transcriptional activity. Le Goff, et al, J. Biol. Chem. 269, 4458-4466; mcInerney, et al., J. Biol. Chem., 271, 24172-24178; Katzenellebogen. More striking, the ability of the ligand to convey the anti-apoptotic signal was preserved in a deletion mutant which is missing the entire AF-1 and DNA binding
30 domain (DE); as well as in a deletion mutant consisting solely of the AF-2/ligand binding domain (E). In contrast, the ER mutant L525A which lacks hormone binding ability and S554fs which is deficient in the C-terminal transcription activation

WO 01/96605

PCT/US01/18950

function (AF-2), lost the ability to convey both the anti-apoptotic signal and the transcriptional activity of the protein.

It was next determined whether the anti-apoptotic activity of the E domain was dependent on its localization to a particular subcellular compartment (Figure 3B).

5 This domain was targeted to the plasma membrane or to the nucleus of HeLa cells, by fusing it to enhanced cyan fluorescent protein containing plasma membrane or nuclear localization sequences, respectively. As revealed by epifluorescence microscopy, the non-targeted ER α and the non-targeted E exhibited similar distribution of cyan fluorescence in the nucleus and cytoplasm, indicating that elimination of all but the
10 ligand binding domain of the ER does not alter the subcellular distribution. However, incorporation of the appropriate targeting sequences accomplished the expected subcellular localization of the membrane or the nuclear ECFP fusion proteins, respectively, as can be seen from the distribution of cyan and red fluorescence in the same cell(s). Targeting the E domain predominantly to the plasma membrane did not
15 alter its ability to convey the ligand-induced anti-apoptotic signal, as evidenced by identical anti-apoptotic activity of this fusion protein to that of the E domain or the full length ER α . But in sharp contrast, targeting the E domain exclusively to the cell nucleus resulted in complete loss of its anti-apoptotic activity.

20 BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

The Figures provided herein illustrate embodiments of the invention and are not intended to limit the scope of the invention.

Figure 1 is a series of graphs demonstrating the control of osteoblast and osteocyte apoptosis by sex steroids *in vivo* and *in vitro*. **A.** Prevalence of
25 osteoblast and osteocyte apoptosis following ovariectomy or orchidectomy in mice. Bars are means $\pm$ SD of 4-5 animals per group. * $p < 0.05$. **B.** Calvarial osteoblasts were treated for 1 hour with 10^{-11} M to 10^{-6} M of E $_2$ or DHT followed by 6 hours treatment with the pro-apoptotic agent etoposide (50 μ M). The percentage of dead cells was quantified by trypan blue staining. Etoposide-induced apoptosis in the
30 absence of steroids was set at 100%. Bars indicate means $\pm$ SD of triplicate determinations, * $p < 0.05$ for E $_2$ - or DHT-treated cultures *versus* vehicle using separate one-way ANOVAs for each treatment. **C and D.** Calvaria-derived osteoblasts or MLO-Y4 osteocytic cells were treated with 10^{-8} M E $_2$ or DHT, and apoptosis was

WO 01/96605

PCT/US01/18950

induced by addition of etoposide, dexamethasone (10^{-7} M), or TNF α (1 nM). The percentage of dead cells was quantified as in **B**. Results were analyzed by two-way ANOVA. * $p < 0.05$ when comparing pretreatments within each agent group and each agent *versus* vehicle for a given pretreatment. **E**. OB-6 osteoblastic cells incorporated into collagen gels were treated with different concentrations of E_2 or DHT for 24 hours. A total of 200 cells were evaluated in randomly selected fields. In vehicle controls, 32.3 ± 2.5 % of the cells were apoptotic. * $p < 0.05$ for E_2 - or DHT-treated cultures *versus* vehicle using separate one way ANOVAs for each treatment.

Figure 2 is a series of graphs showing that the anti-apoptotic effects of E_2 or DHT are inhibited by both ER or AR antagonists and can be mediated via either the ER (α or β) or the AR. **A**. Calvarial osteoblasts were pre-treated with the ER antagonist ICI 182,780 (10^{-7} M) or with the AR antagonist flutamide (10^{-7} M) for 30 min, followed by incubation with 10^{-8} M E_2 or DHT for 1 hour. Subsequently, etoposide was added and apoptotic cells were quantified after 6 hours as in **Figure 1B**. Results are expressed as percentage of etoposide-induced apoptosis in the absence of steroids which was set at 100%. Bars indicate means $\pm$ SD of triplicate determinations, * $p < 0.05$ *versus* vehicle, by ANOVA. **B**. HeLa cells were transiently transfected with either ER α , ER β , AR, VDR, or RXR expression vectors or with the empty vector (ev), along with a Nuc-EGFP expression vector. Sixteen hours after transfection, cells were treated with the indicated concentrations of E_2 , DHT, or 1,25-dihydroxy-Vitamin D $_3$ (1,25D $_3$) for 1 hour followed by 6 hours treatment with etoposide. Apoptotic cells were identified by examining the nuclear morphology of 200-500 transfected (fluorescent) cells. Etoposide-induced apoptosis in cells cultured in the absence of steroids (-) was set at 100%. Results are expressed as percentage of etoposide-induced apoptosis (mean $\pm$ SD). * $p < 0.05$ *versus* cells treated with etoposide in the absence of steroids by ANOVA.

Figure 3 shows the localization of the anti-apoptotic activity of the ER α to the E (ligand binding) domain and elimination by nuclear targeting. **A**. HeLa cells were co-transfected with expression vectors for Nuc-EGFP and various ER α mutants, and then treated for 1 hour with 10^{-8} M E_2 followed by 6 hours treatment with etoposide. **B**. The full length ER α was fused to the non-targeted ECFP (ER α -ECFP). The E domain of the ER α was fused to either non-targeted ECFP (E-ECFP), membrane targeted ECFP (E-Mem-ECFP) or nuclear targeted ECFP (E-Nuc-ECFP). Each of

WO 01/96605

PCT/US01/18950

these fusion proteins was expressed in HeLa cells along with a nuclear targeted red fluorescent protein (Nuc-ERFP) and their subcellular distribution was analyzed by epifluorescence microscopy. Left and middle panels depict photomicrographs of the same cell(s) obtained with either cyan or red filter sets, respectively; bar = 15 μ m.

5 Nuc-ERFP was used in this experiment to quantify apoptosis because its emission can be readily distinguished from that of the cyan fusion proteins. Transfected cells were treated for 1 hour with 10^{-8} M E_2 or vehicle followed by 6 hours treatment with etoposide. Apoptosis in both 3A and 3B was quantified as in Figure 2. Bars indicate means $\pm$ SD of triplicate determinations. * $p < 0.05$ versus cells not treated with

10 etoposide by ANOVA.

Figure 4 shows that the anti-apoptotic activity of the ER and AR is mediated via a Src/Shc/ERK signaling pathway. A. MLO-Y4 cells were incubated for 2, 5, or 15 min with E_2 or DHT or for 25 min with PD98059 (50 μ M) or PP1 (10 μ M) followed by 5 min with E_2 or DHT. Cell lysates were obtained and proteins were

15 analyzed by Western blot analysis using anti-ERK1/2 or anti-phospho-ERK1/2 (p-ERK1/2) antibodies. For the determination of apoptosis, cells were incubated with vehicle, PD98059 or PP1 30 min prior to the addition of E_2 or DHT. After 30 min, etoposide was added and apoptosis was assayed 6 hours later as in Figure 1B. B. The effect of E_2 or DHT on apoptosis was compared in embryonic fibroblasts from Src+/+

20 versus Src-/- mice, as described in Figure 1B. RT-PCR was performed as described in the experimental procedures. C - E. HeLa cells were transfected with Nuc-EGFP and with expression vectors encoding the full length ER α or its E domain, or the AR alone (C, left panel) or together with a dn MEK (C, right panel); a Src mutant lacking the kinase activity (Src K⁻), a Src mutant lacking the SH2 domain (Src Δ SH2), or a Src mutant lacking the SH3 domain (Src Δ SH3) (D); or with ER α

25 together with wt Shc, or the dn Shc mutants Y239F/Y240F/Y317F (Shc FFF), Y317F (Shc YYF) or Y239F/Y240F (Shc FFY) (E). Bars represent means $\pm$ SD of triplicate determinations. * $p < 0.05$ versus cells cultured without steroids, by ANOVA.

Figure 5 demonstrates the dissociation of ER α -mediated transcriptional versus

30 anti-apoptotic actions and ER α -mediated versus ER β -mediated effects using peptides. A. HeLa cells were transiently transfected with the ER α expression vector alone or together with a vector carrying a fusion of the α -II peptide with the GAL4 DNA binding domain driven by the SV40 promoter. In addition, cells were transfected with

WO 01/96605

PCT/US01/18950

ERE-luc or IL-6-luc for the transcription studies; or with EGFP-nuc for the apoptosis experiments. Bars represent the mean $\pm$ SD of triplicate determinations and indicate fold-stimulation of ERE-luc, or fold-inhibition of IL-6-luc, or % of transfected cells with apoptotic features in vehicle (E_2^-) or 10^{-8} M E_2 (E_2^+). * $p < 0.05$ versus vehicle treated cells, by ANOVA. **B.** HeLa cells were transfected with ER α or ER β alone or together with expression vectors carrying 2X293 or 2XF6 peptides. Bars represent mean $\pm$ SD of triplicate determinations of the activity (ERE-luc, IL-6-luc, or anti-apoptosis) in response to E_2 (10^{-8} M) in cells transfected with the indicated receptor and peptide versus cells transfected with the receptor alone. E_2 -induced activity in cells carrying the receptor, but not the peptide, was designated as 100%. * $p < 0.05$ versus cells transfected with the receptor alone, by ANOVA. **C.** HeLa cells were transfected with a vector carrying the GRIP peptide alone or together with ER α . Bars represent the mean $\pm$ SD of triplicate determinations. * $p < 0.05$ versus vehicle treated cells, by ANOVA.

Figure 6 demonstrates the dissociation of nongenotropic from genotropic activity of the ER with synthetic ligands. **A.** For C3-mediated transcription, HeLa cells were transfected with C3-luc and ER α , and were treated with the indicated concentrations of an estren or a pyrazole. Bars represent the mean $\pm$ SD of the relative luciferase units (RLU) normalized for β -galactosidase activity. $p < 0.05$ versus cells transfected with empty vector (ev), by ANOVA. The anti-apoptotic activity of the estren and the pyrazole was evaluated in calvaria-derived osteoblasts as described in **Figure 1B**. * $p < 0.05$ versus cells not treated with etoposide by ANOVA. **B.** MLOY4 cells were incubated for 5, min with the indicated concentrations of the different ligands and ERK phosphorylation was assessed as in **Figure 4A**.

Figure 7 shows a proposed model for ligand-induced dissociation of anti-apoptotic from classical genotropic activity of sex steroid receptors. The three cartoons depict conformational states of the receptor protein prior to and following interaction with the ligands, that are required to effect either the genotropic or the anti-apoptotic responses. The inactive unligated receptor is depicted in the middle in gray. The change in conformation induced by interaction with a ligand that preferentially triggers transcriptional activity (e.g., the pyrazole of **Figure 6**) is depicted in the right in blue. The change in conformation induced by interaction with a ligand that preferentially triggers the anti-apoptotic activity of the receptor (e.g., the

WO 01/96605

PCT/US01/18950

estren of Figure 6) is depicted in the left in magenta. Green circle and green diamond represent the two ligands; please note the perfect and imperfect fit within the binding pocket, respectively. Association (k_a) and dissociation (k_d) rates of the two different types of ligands for the receptor are depicted by different width and length arrows.

5 Ligands such as E₂ will of course induce both conformations. Although in the anti-apoptotic model a direct contact between the receptor and Src is shown, it is possible that adapter protein(s) may bridge the interaction between the two molecules. Corresponding energy levels of the receptor protein in the inactive unligated state (broken line), progressing either to the genotropic conformation (blue line) or the anti-

10 apoptotic conformation (magenta line) are shown in the bottom. The discontinuous vertical axis in the energy diagram is meant to indicate a larger than scale difference in energy requirements between the two activities.

Figure 8 is a diagram of two transgene constructs that are co-introduced into the same mouse for Dox-induced expression of the α II and 293 peptides.

15 Figure 9A is a diagram illustrating the generation and functional characterization of the Dox-inducible system for osteoblast-specific expression of Cre recombinase. Activation of the ROSA26 locus by Cre under the control of the OG-2 promoter. "SA" indicates a splice acceptor site of the original ROSA26 locus. Figure 9B is gel showing Dox-induced activation of Cre expression in vitro. Ob-6 cells were

20 transiently transfected with the Tet-OG2-Cre constructs and were then treated with 0.5mg/ml Dox or vehicle for 24 hours. Cells were harvested and Cre expression was assessed by RT-PCR analysis. Lane 1 contains size markers. Lane 2 represents cells treated with Empty Vehicle plus Dox. Lane 3 represents cells containing OG-2-rtA-Cre without Dox. Lane 4 represents cells containing OG-2-rtA-Cre with Dox. Lane 4

25 contains the OG-2rtA-Cre plasmid induced with Dox.

Figure 10 is a diagram illustrating the targeting of floxed exon 3 into a 86 Kb genotropic locus containing exons 3 and 4 of the mouse ER α gene.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

30 This invention concerns the fundamental discovery of the understanding of the mechanism of action of steroidal nongenotropic effects and their relation to steroidal genotropic effects. It has been discovered that (i) steroidal nongenotropic effects and genotropic effects can be mediated by the same steroid receptor; (ii) both effects are

WO 01/96605

PCT/US01/18950

ligand-induced; (iii) the nongenotropic effect occurs due to a ligand-induced activation of the ligand binding domain, which can be fast and loose fitting; (iv) the genotropic effect occurs due to a ligand-induced activation of the DNA-binding domain of the steroid receptor, which is typically a result of a slower, stronger interaction; and (v) the nongenotropic effect of a ligand interaction can be dissociated from the genotropic effect of a ligand interaction, in such a manner to effect a selective response.

Based on this pioneering discovery, a method is provided of dissociating a steroidal nongenotropic effect from the steroidal genotropic effect of a steroid receptor. In one embodiment, the invention includes a method for selectively inducing a steroidal nongenotropic effect, that includes contacting the receptor with a compound that sufficiently interacts with the ligand binding domain of the receptor in a manner that causes the receptor to mediate a nongenotropic effect, while not activating the DNA-binding domain in a manner that induces a genotropic effect. In an alternative embodiment, a method is provided for selectively inducing a steroidal genotropic effect, that includes contacting the receptor with a compound that sufficiently activates the DNA-binding domain of the receptor in a manner that causes the receptor to mediate a genotropic effect, while not activating the ligand-binding domain in a manner that induces a nongenotropic effect. In one aspect of all of the inventions disclosed herein, the receptor is not an estrogen receptor, or alternatively, is not a progesterone receptor.

I. Definitions

An estrogen compound, as used herein, refers to a four ring steroidal compound which possesses the biological activity of an estrus-producing hormone, or its conjugated and esterified derivative, or a derivative thereof of same chemical composition and structure but which does not possess the biological activity of the active form because it exhibits a different stereochemistry from the active form. Nonlimiting examples of estrogens include broparestrol, chlorotrianisene, dienolestrol, epimestrol, equilin, estrapronicate, estropipate, ethinylestradiol, fosfestrol, hydroxyesetrone, mestranol, estradiol, estriol, conjugated and esterified estrogens, estrone, polyestradiol, promestriene, quinestradol, quinestronol, stilbestrol, and zeranol.

An androgen compound, as used herein, refers to a four ring steroidal compound which can be produced in the testis or adrenal cortex, or is a synthetic

WO 01/96605

PCT/US01/18950

hormone, which acts to regulate masculine secondary sexual characteristics, or a derivative thereof of same chemical composition and structure but which does not possess the biological activity of the active form because it exhibits a different stereochemistry from the active form. Nonlimiting examples include boldenone, clostebol, danazol, drosstanolone, epitostanol, ethylestrenol, fluoxymesterone, formebolone, furazabol, mepitiostane, mesterolone, methandienone, methenolone, methyltestosterone, nandrolone, norethandrolone, oxabolone, oxymetholone, prasterone, quinbolone, stanolone, stanozolol, testosterone, and trenbolone.

As known, estrogens and androgens have chiral carbons, and thus can exist in a number of stereochemical configurations. Typically, for example, the 17 β hydroxy estrogens have biological activity while the 17 α hydroxy estrogens have very little effect on sexual characteristics (and induce little hormone-like gene transcriptional activation). For the purpose of this specification, any stereochemical configuration, including either the biologically active or the biologically inactive or less active structure, can be used, as long as the compound satisfies the specifically itemized criteria of the invention.

The catalogue entitled "Steroids" from Steraloids Inc., Wilton H.H., provides a list of over 3000 steroids, with numerous estrogen and androgen derivatives. The catalog can be obtained by contacting the company and is also currently available on the internet at <http://www.steraloids.com>. One can select and purchase compounds from this library, which are all commercially available and thus easy to obtain and evaluate, for use in this invention.

The term "steroid" as used herein refers to any ligand that will bind to one of the traditionally referred to "nuclear hormone receptor family of proteins." Based on the discovery herein, it is now known that these receptors are not necessarily nuclear, and in fact can induce nongenotropic effects when located outside the nucleus or on the membrane, and perhaps in the nucleus as well. The names of the individual members of the family of the nuclear receptor family is published in *Cell*, 97:161-163, 1999, and reproduced in the Table below. This article was authored by the Nuclear Receptors Nomenclature Committee. It is now known that there are at least sixty members of the protein family in humans as shown by analysis of the human genome and proteome, and published in *Nature* 409:860-921, 2001. This article was authored by the International Human Genome Sequencing Consortium. In one embodiment, the receptor has a zinc finger and a ligand-binding domain, as mentioned in the

WO 01/96605

PCT/US01/18950

Table 1. A Proposed Nomenclature for Nuclear Receptors

Subfamily and Group	NR/Gene	Trivial Names	Accession Number
1A	NR1A1	TR α , c-erbA-1, THRA	M24748
	NR1A2	TR β , c-erbA-2, THRB	X04707
1B	NR1B1	RAR α	X06538
	NR1B2	RAR β , HAP	Y00291
1C	NR1B3	RAR γ , RARD	M57707
	NR1C1	PPAR α	L02952
1D	NR1C2	PPAR β , NUC1, PPAR δ , PAAR	L07592
	NR1C3	PPAR γ	L40904
1E	NR1D1	REVERB α , EAR1, EAR1A	M24898
	NR1D2	REVERB β , EAR1 β , BD73, RVR, HZF2	L31785
1F	NR1D3	ET5	X51548
	NR1E1	ET8, DR-78	U01087
1G	NR1F1	ROR α , RZR α	U04897
	NR1F2	ROR β , RZR β	Y08639
1H	NR1F3	ROR γ , TOR	U16997
	NR1F4	HR23, DHR3, MHR3, GHR3, CNR3, CHB3	M98066
1I	NR1G1	CNR14	U13074
	NR1H1	ECR	M74078
1J	NR1H2	UR, OR-1, NER1, RFP15, LXR β	U07132
	NR1H3	RLD1, LXR, LXR α	U22662
1K	NR1H4	FXR, RFP14, HRR1	U09416
	NR1I1	VDR	J03258
1L	NR1I2	ONR1, PXR, SXR, BXR	X75163
	NR1I3	MRN7, CAR1, CAR α	Z30425
1M	NR1I4	CAR2, CAR β	AF00932
	NR1J1	DHR96	U36792
1N	NR1K1	MHR1	U19360
	NR2A1	HNFA4G	X16950
2A	NR2A2	HNFA4G	Z49826
	NR2A3	HNFA4B	Z49827
2B	NR2A4	DHNF4, HNF4D	U70874
	NR2B1	TLL, TLL α	X52773
2C	NR2B2	RXR β , H-2RIBP, RCoR-1	M84820
	NR2B3	RXR γ	X66225
2D	NR2B4	USF, Ultraspinoche, 2C1, CF1	X52591
	NR2C1	TR2, TR2-11	M22960
2E	NR2C2	TRA, TAK1	L27586
	NR2D1	DHR78	U36791
2F	NR2E1	TLL, TLX, XTLL	S72373
	NR2E2	TLL, Tailless	M34639
2G	NR2F1	COUP-TF1, COUPTEA, EAR3, SVP44	X12795
	NR2F2	COUP-TF1, COUPTEB, ARP1, SVP40	M64497
2H	NR2F3	SVP, COUP-TF	M28863
	NR2F4	COUP-TF1, COUPTEG	X63992
2I	NR2F5	SVP46	X70300
	NR2F6	EAR2	X12794
2J	NR3A1	ER α	X05635
	NR3A2	ER β	U57459
2K	NR3B1	ERR1, ERR α	X51416
	NR3B2	ERR2, ERR β	X51417
2L	NR3C1	GR	X03225
	NR3C2	MR	M16801
2M	NR3C3	PR	M15716
	NR3C4	AR	M20132
2N	NR4A1	NGFIB, TR3, N10, NUR77, NAK1	L13740
	NR4A2	NURR1, NOT, NRK1, HZF-3, TENOR	X75918
2O	NR4A3	NOR1, MDNOR	D38530
	NR4A4	DHR38, NGFIB	U36762
2P	NR5A1	CNR8, C48D5	U13076
	NR5A2	SFI, ELP, FTZ-F1, AD4BP	D88155
2Q	NR5A3	LRH1, jFF1A, jFF1B, PFLR, PHR, FTF	D93553
	NR5B1	FTZ-F1	M63711
2R	NR5B2	DHR39, FTZF1B	L06423
	NR6A1	GCNF1, RTR	U14666
2S	NR6A2	KNR1, Knirps related	X13331
	NR6A3	EGON, Embryonic gonad, EAGLE	X14153
2T	NR6A4	ODR7	X16631
	NR6A5	Tollonax	U16708
2U	NR6B1	DAX1, AHCH	M31617
	NR6B2	SHP	L76571

Note: The groups contain highly related genes with often paralogous relationship in vertebrates (e.g., RARA, RARB, and RARG). The term isoform is reserved for different gene products originating from the same gene due to alternative promoter usage or splicing, or alternative initiation of translation.

WO 01/96605

PCT/US01/18950

Nature article. Generally, steroid receptors have a highly variable N-terminal trans-activation domain (NT-TAD), followed by a highly conserved DNA-binding domain (DBD) consisting of two zinc fingers, a hinge region, and a moderately conserved C-terminal ligand-binding domain (CT-LBD). These regions either have already been mapped for a target steroid receptor, or are easily mapped using known techniques.

The term "bone mass" refers to the mass of bone mineral and is typically determined by Dual-Energy X-Ray Absorptiometry (DEXA).

The term "bone strength" refers to resistance to mechanical forces and can be measured by any known method, including vertebrae compression strength or three point -bending of long bones.

The term "bone quality" refers to normal collagen orientation without excessive accumulation of unmineralized bone matrix, and can be measured by any known method, including undecalcified bone histomorphometry.

The term "bone anti-resorption agent" refers to a compound that blocks bone resorption by suppressing remodeling or the activity and/or lifespan of osteoclasts.

The term "osteopenia" refers to decreased bone mass below a threshold which compromises structural integrity.

The term chimera as used herein means a strand of DNA formed by fusion of the genetic sequence of two different receptors. Steroid receptors are composed of both a DNA binding domain and a ligand binding domain. In the chimeric receptor the DNA binding domain is composed of the genetic code from one receptor and the ligand binding domain of another receptor. These two domains are fused to form a chimeric receptor. The domains can be from different species or from different receptors within the same species.

The term orphan receptor as used herein refers to a family of approximately 69 receptors which have been identified by amino acid sequence homologies. The orphan receptor has an amino acid sequence that is highly conserved in the DNA binding domain, and has consensus regions located in the ligand binding domain of the receptor. They are called orphan receptors because no ligand has been identified that directly activates any of the members of the family. An example of an orphan receptor is the chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor (COUP-TF).

As used herein, the terms "metabolic bone disease", "orthopedic bone disease" or "dental disease" are defined as conditions characterized by decreased bone mass and/or structural deterioration of the skeleton and/or teeth.

WO 01/96605

PCT/US01/18950

As used herein, the term "apoptosis" refers to programmed cell death characterized by nuclear fragmentation and cell shrinkage as detected by morphological criteria and Terminal Uridine Deoxynucleotidyl Transferase Nick End Labeling (TUNEL) staining.

5 The term "host", as used herein, refers to any steroid receptor containing cell or animal.

The term "transgene" is used herein to describe genetic material which has been or is about to be artificially inserted into the genome of a mammal, particularly a mammalian cell of a living animal.

10 "Transgenic animal" means a non-human animal, usually a mammal (e.g., mouse, rat, rabbit, hamster, etc.), having a non-endogenous (i.e., heterologous) nucleic acid sequence present as an extrachromosomal element in a portion of its cells or stably integrated into its germ line DNA (i.e., in the genotrophic sequence of most or all of its cells). Heterologous nucleic acid is introduced into the germ line of such
15 transgenic animals by genetic manipulation of, for example, embryos or embryonic stem cells of the host animal.

"Construct" means a recombinant nucleic acid, generally recombinant DNA, that has been generated for the purpose of the expression of a specific nucleotide sequence(s), or is to be used in the construction of other recombinant nucleotide
20 sequences.

"Operably linked" means a DNA sequence and a regulatory sequence(s) are connected in such a way as to permit gene expression when the appropriate molecules (e.g., transcriptional activator proteins) are bound to the regulatory sequence(s).

25 "Operatively inserted" means a nucleotide sequence of interest is positioned adjacent a nucleotide sequence that directs transcription and translation of the introduced nucleotide sequence of interest (i.e., facilitates the production of, e.g., a polypeptide encoded by an APP sequence).

"Signal transduction pathway responsive transcriptional control unit" means a regulatory DNA sequence that permits gene expression when transcriptional activator
30 proteins are bound to the regulatory sequences in response to the activation of a signal transduction pathway including but not limited to MAPK, nuclear factor of κ B cells (NF κ B), JNK, AP-1, p38K, PKA, PKC, PI3-K, or NFAT signal transduction pathways. The transcriptional activator proteins of signal transduction pathway responsive transcriptional control units can be phosphorylated by a protein kinase in

WO 01/96605

PCT/US01/18950

the signal transduction pathway such that the activator proteins can then bind to the DNA regulatory sequence. Exemplary Signal transduction pathway responsive transcriptional control unit include but are not limited to serum response element, Activator protein 1, cAMP response element, E-box DNA binding element, E2F DNA binding element, glucocorticoid response element, heat shock response element, 5 interferon γ activation sequence, interferon stimulated response element, nuclear factor of activated T cells, nuclear factor of κ B cells, p53 response element, Rb response element, and STAT3 response element.

The term "reporter gene" as used herein refers to any of the variety of genes 10 which produce a protein when transcription is activated by a test compound or chemical signal. This protein is measured to determine the effect on transcription. Reporter genes are operably linked to a promoter under the control of steroid response element such as the estrogen response element or the like.

"Nongenotropic activity of steroid receptors" means rapid activation only of 15 the ligand-binding domain of the receptor without the need for activation of the DNA-binding domain of the receptor or interaction with accessory transcriptional regulators.

"Genotropic activity of steroid receptors" means ligand dependent modulation of transcription which is sensitive to inhibitors of transcription and translation.

20 A "steroid receptor related disorder" is meant to mean any human or animal disorder, condition, or disease caused by or characterized by abnormally high or low concentrations, availability, mutations or other imbalance of a steroid or steroid receptor. By "abnormally high" is meant any difference above normal sufficient to be manifested by physiological, biochemical, physical, mental, or psychological effects. 25 By "abnormally low" is meant any difference below normal sufficient to be manifested by physiological, biochemical, physical, mental, or psychological effects. In a preferred embodiment, the steroid receptor related disorder is one wherein additional steroid transcriptional activity is not desired such as with disorders in postmenopausal women. Steroid receptor related disorders can be associated with any 30 cell, tissue, organ, or system that expresses steroid hormone receptors.

II. Method for Selectively Inducing a Steroidal Response

Based on this pioneering discovery, a method is provided of dissociating a steroidal nongenotropic effect from the steroidal genotropic effect of a steroid

WO 01/96605

PCT/US01/18950

receptor. In one embodiment, the invention includes a method for selectively inducing a steroidal nongenotropic effect, that includes contacting the receptor with a compound that sufficiently interacts with the ligand binding domain of the receptor in a manner that causes the receptor to mediate a nongenotropic effect, while not activating the DNA-binding domain in a manner that induces a significant genotropic effect. In an alternative embodiment, a method is provided for selectively inducing a steroidal genotropic effect, that includes contacting the receptor with a compound that sufficiently activates the DNA-binding domain of the receptor in a manner that causes the receptor to mediate a genotropic effect, while not inducing a significant nongenotropic effect. It is considered that a ligand does not induce a "significant" or "substantial" effect if the effect is less than 10% that of the natural steroidal effect, and in a preferred embodiment, less than 5, 1, or 0.1 percent that of the natural steroidal effect.

Exemplary forms of nongenotropic activity include but are not limited to intracellular second messenger systems, signal transduction pathways, preferably protein kinase signal transduction pathways, MAP kinase signal transduction pathways, Src/Shc/ERK signal transduction pathways; regulation of intracellular calcium concentration; secretion; changes in cellular morphology; cell motility; cytoskeletal rearrangements; and apoptosis.

In another aspect of the invention, a selectivity inducing compound (including but not limited to a peptide or protein or a ligand antagonist) can be administered that competes with an endogenous or exogenous ligand of a steroid receptor for a binding site on the receptor as a means to mask the activity of that ligand-binding interaction. As one example, a peptide or ligand antagonist can be administered that binds with the ligand binding domain in a way that prevents a ligand from inducing a nongenotropic effect. In an alternative embodiment, a peptide or ligand antagonist can

WO 01/96605

PCT/US01/18950

complex inactivates the genotropic activity and activates the nongenotropic activity of a steroid receptor.

In a still another aspect, a method for inducing a selective effect of a steroid receptor is provided that includes administering an effective amount of a compound that inactivates the DNA binding region of the receptor by inducing a conformational or configurational change in the receptor. In yet another aspect of the invention, a method for inducing a selective effect of a steroid receptor is provided that includes administering an effective amount of a compound that inactivates functions mediated only by the ligand binding region of the receptor by inducing a conformational or configurational change in the receptor. As used herein, the term conformational change refers to a change in the three dimensional structure of the receptor. The term configurational change refers to a chemical change in the protein structure.

This invention can be used to selectively effect a response in any of the family of steroid receptors, including those set out in Table 1 herein, and in particular, the α or β form of the estrogen receptors (ER α and ER β), the estrogen receptor related receptor-1 and receptor-2 (ERR-1 and ERR-2), the androgen receptor (AR), the progesterone receptor (PR), retinoic acid receptor (and related orphan receptors ROR α , ROR β , and ROR γ), glucocorticoid receptor (GR), mineralcorticoid receptor (MR), Vitamin D receptor, neuroactive receptor, farnesoid X receptor (FXR), liver X receptor (LXR α and LXR β), thyroid hormone receptors A and B (which bind triiodothyronine (T3) and thyroxine (T4)), COUP-TF, ecdysone, the PPAR family (peroxisome proliferator activated protein, including PPAR α , PPAR γ , and PPAR δ), pregnane X ("PXR"), bile acid binding family, and chimeric and orphan receptors thereof.

III. Induction of Nongenotropic Effect by Steroid through Non-related Receptor

In another embodiment of the invention, it has been discovered that steroids can induce a nongenotropic effect via an interaction with a steroid receptor other than its typical binding receptor. As used herein, the term "non related receptor" refers to one through which the steroid does not induce a genotropic effect. It was heretofor unknown that a steroid can act through an unrelated receptor, because it by definition does not induce a genotropic effect through an unrelated receptor, and the cellular

WO 01/96605

PCT/US01/18950

nongenotropic effects were unclear at best. This invention thus includes a method to selectively induce a nongenotropic effect of a steroid receptor, comprising contacting the receptor with an unrelated steroid that sufficiently binds to and activates a function of the steroid ligand-binding domain to accomplish the desired effect. Any
5 of the method of screening methods presented herein can be used to determine whether a selected steroid can induce a target nongenotropic effect via a previously considered unrelated steroid receptor.

In one nonlimiting illustration of this aspect of the invention, it has been discovered that the estrogen receptors (ER α and ER β) and the androgen receptor (AR)
10 can transmit anti-apoptotic signals to osteoblasts and osteocytes with similar efficiency irrespective of whether the binding ligand is an estrogen or an androgen. Further, it has been discovered that the nongenotropic receptor-dependent mechanism of action of estrogens and androgens, which in the case of osteoblasts/osteocytes involves activation of extracellular signal regulated kinases (ERKs) are
15 mechanistically dissociable from the transcriptional activity of the receptors.

The fact that a steroid can use a previously considered unrelated steroid receptor to induce a nongenotropic effect now explains the anomaly described in the Background of the Invention that nongenotropic steroid effects occur in cells or tissues devoid of the respective classic receptor. In such a case, the steroid is using an
20 unrelated steroid receptor to mediate that nongenotropic effect (with the exception of course of the event in which the effect is not receptor mediated at all).

IV. Method for Screening a Compound for its Ability to Selectively Induce a Steroidal Response

25 A method is provided for screening compounds that are capable of inducing a steroidal nongenotropic effect without substantially inducing a steroidal genotropic effect or are capable of inducing a steroidal genotropic effect without substantially inducing a steroidal nongenotropic effect. The method can be carried out in a number
30 of ways, including:

- (1) assessing the ability of the compound to appropriately bind to the ligand-binding domain of the steroid receptor without substantially activating the DNA-binding domain of the steroid receptor, or to appropriately activate the DNA-binding domain of the steroid receptor without substantially activating functions mediated by
35 the ligand-binding domain of the steroid receptor; and then

WO 01/96605

PCT/US01/18950

(2) measuring the biological activity of the test compound to assess its ability to induce a target nongenotropic effect without substantially inducing a genotropic effect, or its ability to induce a target genotropic effect without substantially inducing a genotropic effect.

5 The first step can be accomplished via molecular modeling, preferably with the aid of a computer. Alternatively, modified forms of the receptor lacking a functional DNA binding domain can be used to determine whether the test compound activates only the ligand binding domain or only the DNA binding domain. The modified form can be expressed, for example, in a transformed cell. Cells cultured in
10 vitro can be genetically altered to express a steroid receptor or a genetic variant thereof. Genotropic activity can be quantified using known techniques such as measuring the amount of total mRNA generated in response to a test compound or the mRNA specific for one or more steroid regulated genes. Screening can be done in vivo or in vitro

15 Alternatively, steps 1 and 2 can be combined by simply assaying for compounds that selectively induce either a nongenotropic or genotropic effect without substantially inducing the other effect in an in vitro cell-based assay.

An additional embodiment of the present invention is a method of making a tissue culture screening system comprising the steps of growing a tissue culture cell
20 line until cell growth has reached appropriate confluence, typically approximately 50% confluence; transfecting the tissue culture with an appropriate expression plasmid of a specific receptor and an expression plasmid for a target gene responsive to the selected receptor; contacting the transfected cells with a test compound; and then determining the effect of the test compound on the expression of the target gene
25 to determine whether the compound induces a genotropic effect. In an aspect of this embodiment, it is also assessed whether the compound has induced a desired nongenotropic response. As a nonlimiting example of this embodiment, cells are contacted with a pro-apoptotic agent; the number of apoptotic transfected cells contacted with the test compound is determined; and the compounds that inhibit
30 apoptosis and do not substantially induce the transcription of the target gene are selected.

In the screening methods described herein a tissue culture cell line can be devoid of the receptor whose biological activity is being tested. In this case the missing receptor is added to the cell line by transfection of a plasmid carrying the

WO 01/96605

PCT/US01/18950

cDNA for the missing receptor or a chimera for the deficient receptor. The response element for that receptor can also be added via transfection.

The receptor responsive enhancer DNA element is selected from the responsive elements corresponding to the specific receptor used in the system.

5 The basal promoter consists of a minimal promoter sequence that contains a "TATA" element capable of binding RNA polymerase II and is selected from any of the commonly used elements. For example, thymidine kinase promoter, ovalbumin promoter and MMTV LTR.

10 The reporter gene can be selected from any of the variety of genes in which the protein product is easily assayed or detected. One skilled in the art readily recognizes that the protein can be easily assayed by calorimetric, fluorescent; immunochemical, chemical or radiochemical methods. Further, the reporter gene can be a chimera. Examples of various reporter genes which can be used include the bacterial enzyme chloramphenicol acetyl transferase (CAT), β -galactosidase, alkaline
15 phosphatase, luciferase, peptide hormones, growth factors and chimeric proteins. In the preferred embodiment genes producing non-native proteins are used. For example, CAT is used in mammalian systems because it is not a normally occurring enzyme in mammalian cells and is easy to assay. Thus, the receptor dependent activation of CAT in tissue culture cells can be used to identify compounds which directly or indirectly
20 interact with the receptor to activate transcription of a gene.

In another embodiment, a method for screening compounds for the treatment of steroid receptor related diseases or disorders is provided comprising: (i) contacting a cell expressing a natural or artificial steroid receptor with a test compound; (ii) assessing whether the compound activates a nongestropic activity of the steroid
25 receptor, including but not limited to an intracellular second messenger system, signal transduction pathway, protein kinase signal transduction pathway, MAP kinase signal transduction pathway, Src/Shc/ERK signal transduction pathway; regulation of intracellular calcium concentration; secretion; changes in cellular morphology; cell motility; cytoskeletal rearrangements; or apoptosis; (iii) determining the level of
30 transcription induced by the test compound; and (iv) selecting the compound or compounds that activate the nongestropic activity of the steroid receptor without substantially activating the gestropic activity of the steroid receptor. "Substantially activating" the gestropic activity of a steroid receptor means activating transcription

WO 01/96605

PCT/US01/18950

more than 10% that induced by the natural steroid receptors, and preferably, less than 5, 2, 1 or 0.1 %.

In another embodiment, a method for screening compounds for treatment of a sex steroid receptor related diseases or disorder is provided comprising: (i) contacting a cell expressing a natural or artificial sex steroid receptor with a test compound alone or in combination with a pro-apoptotic agent; (ii) assessing whether the compound activates a nongentropic activity of the steroid receptor, for example, a signal transduction pathway such as a protein kinase signal transduction pathway, a MAP kinase signal transduction pathway, or in general a mechanism that prevents apoptosis; (iii) determining the level of transcription induced by the test compound; (iv) determining whether the test compound inhibits apoptosis in cells contacted with a test compound alone or in combination with a pro-apoptotic agent; and (v) selecting the compound or compounds that activate the nongentropic activity of the steroid receptor without substantially activating the genotropic activity of the steroid receptor.

In yet another embodiment, a method for the selection of a compound useful in the treatment of bone disease or to increase bone mass is provided that includes assessing whether a compound activates the anti-apoptotic domain of the estrogen or androgen receptor without substantially activating the DNA binding domain of the receptor, using methods as described further herein or otherwise known. In a preferred embodiment, the steroid hormone receptor protein is expressed from endogenous DNA. In another embodiment the receptor sequence can be human, non-human, or chimeric. By chimeric it is meant, a resulting sequence comprised of a mixture of sequences from at least two different sources. Alternatively, the receptor can be genetically altered such that specific sequences are deleted, added, or modified.

In another embodiment, the activation of the DNA binding domain of a steroid hormone receptor is determined by using a non-endogenous DNA sequence encoding an operable hormone response element operably linked to a reporter gene. Methods of measuring transcription levels are known in the art and include physical isolation and quantification of mRNA as well as more complex procedures. For example, the production of mRNA can be quantified using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). When optimally performed, RT-PCR can be used to detect transcripts produced at very low levels and can identify RNAs in minute quantities of

WO 01/96605

PCT/US01/18950

starting material. Reagents and RT-PCR kits are commercially available. Thus, endogenous mRNA levels can be readily monitored to assess the effect of a compound on transcription levels. In other embodiments of the present invention, compounds are not screened by assaying changes in the appearance or physical characteristics of a compound in response to a test compound interacting with the steroid receptor.

Alternatively, the expression of genes can be determined using DNA microarray assays. Briefly, nucleic acid, in the form of long double stranded complementary DNAs or oligonucleotides, is applied to glass microscope slides, either using robot controlled pins or solid phase chemical synthesis. Tens to hundreds of thousands of unique spots of nucleic acid can be applied to each slide. Radioactively or fluorescently labeled sample (probe) DNA is then applied to the slide and after an appropriate period of time, and several washing steps, the hybridized probe nucleic acid is detected using a microscope or scanner. If the nucleic acid identity of each spot on the slide is known, the corresponding nucleic acid in the sample can be detected by the presence of a signal at that spot's location on the slide. Using this method the expression level of thousands of genes can be simultaneously measured in just a few hours.

In still another embodiment, activators of selective nongentropic signalling can be selected by (i) contacting cells expressing a natural or artificial steroid receptor(s) with a test compound; (ii) determining the amount of ERK activation in the cells contacted with the test compound; (iii) determining the amount of transcription in the cells contacted with the test compound; (iv) selecting the cells contacted with the test compound that exhibit ERK activation and minimal transcription levels as compared to transcriptions levels in cells contacted with the natural steroid. In a preferred embodiment, the compounds are identified using a high throughput combination screening which simultaneously detects ERK activation using a SRE-SEAP construct (positive readout) and C3 (complement 3) transcription (negative readout).

The SRE-SEAP assay detects activation of the MAPK/JNK signalling pathways by means of assaying transcription factor (Elk-1/SRF) – induced activation of a Serum Response Element (SRE) placed upstream of the herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-tk) promoter that drives the expression of secreted alkaline phosphatase (SEAP). This assay is commercially available as are kits for in vivo

WO 01/96605

PCT/US01/18950

assays for MEK1 or MEKK1. In general, 24 hrs after transfection serum - containing medium is replaced with medium that contains about 0.2% serum. Cells are cultured for 24 hrs in about 0.2% serum and then assayed. Control samples are treated with vehicle alone.

5 A further embodiment of the present invention is an assay for identifying a test compound or chemical signal that activates nongentropic receptor activity without substantially activating genotropic receptor activity, comprising the steps of growing a tissue culture screening system in appropriate media, wherein the cell line of the tissue culture screening system contains a steroid receptor having at least one
10 identified nongentropic activity; adding a test compound or chemical signal to the media and measuring the amount of transcription and the amount of nongentropic activity. One skilled in the art will readily recognize that the media chosen depends on the cell line chosen and can be any of the chemically defined culture media known in the art and suitable for the cell line. The receptors and reporter genes can be added by
15 either transient or stable transfection.

In another embodiment, a method for screening for a selective ligand of a steroid receptors is provided comprising the steps of: (i) culturing cells in cell culture media wherein the cells naturally or artificially express a steroid receptor; (ii) contacting the cells with a test compound; (iii) determining whether the test
20 compound activates nongentropic activity of the steroid receptor; (iv) determining whether the test compound activates genotropic activity of the steroid receptor; (v) selecting the compound that activates nongentropic activity but does not substantially activate genotropic activity of the steroid receptor.

In one embodiment, the cell line is OB-6 and the nongentropic activity can be
25 determined by assessing whether the test compound inhibits apoptosis. Apoptosis can be assessed using techniques known in the art. For example, cells can be transfected with Green Fluorescent Protein localized to the nucleus to assist in assessing changes in nuclear morphology correlating to apoptosis. Apoptosis can also be determined using Terminal Uridine Deoxynucleotidyl Transferase Nick End Labeling, In Situ End
30 Labeling, Hoechst staining, or assessing caspase-3 activity. Additionally, nongentropic activity can be assessed by determining whether a signal transduction pathway has been activated, preferably the Src/Shc/ERK signal transduction pathway. Cells can be transfected with a nongentropic activity marker, preferably the serum response element/secreted alkaline phosphatase (SRE-SEAP) construct such that the

WO 01/96605

PCT/US01/18950

induced activation of the serum response element drives the expression of secreted alkaline phosphatase. The SRE-SEAP construct detects the activation of the MAPK/JNK signalling pathways by means of assaying transcription factor (Elk-1/SRF). The degree of genotropic activity can be assessed using techniques known in the art. In preferred embodiments, steroid receptors contacted with a test compound

5 can be isolated and combined with a nucleic acid sequences corresponding to the steroid response element associated with the particular steroid receptor. Lack of binding of the steroid-test compound complex to the response element sequence indicates that the test compound does not affect genotropic activity. One of ordinary

10 skill in the art will appreciate that the either the unlabeled steroid or the unlabeled response element can be immobilized on a solid phase and a labeled steroid or labeled response element as needed can then be added to the solid phase. Detection of the label on the solid phase in the presence of the test compound indicates that the test compound-receptor complex does not bind nucleic acid and therefore, does not affect

15 genotropic activity. Alternatively, the steroid receptor-test compound complex can be used in binding assays with known nuclear transcription factors including but not limited to AP-1, NFkB, SRC-1 and the like. Lack of binding of the steroid receptor-test compound with transcription factors indicates that the test compound does not inhibit genotropic activity.

20 Additional embodiments of the present invention include screening methods using multiple transfectants such that cells can be optionally transfected with steroid receptors, inducible reporter gene plasmids for detecting genotropic activity; or inducible reporter gene plasmids for detecting nongentropic activity. The steroid receptor is transcriptionally active such that it can induce the expression of one or

25 more reporter genes. Compounds can be screened for desired effects on genotropic or nongentropic activity by monitoring the change in reporter gene expression when transfected cells are treated with a test compound. For example, a first reporter gene construct can have a response element upstream of a reporter gene such that the transfected steroid receptor encodes a protein that interacts with the steroid response

30 element to induce the expression of the reporter gene. The cells can be single, double, or triple transfectants, or any other multiple of transfectants. In another embodiment, a method of screening for ligands of steroid receptors that induce nongentropic activity without substantially inducing genotropic activity is provided comprising the steps of: (a) contacting a cell with a test compound wherein the cell has been

WO 01/96605

PCT/US01/18950

transfected with : i) a DNA sequence encoding a functional steroid receptor or genetic variant of a steroid receptor wherein the steroid receptor is transcriptionally active; ii) an response element-reporter gene construct; and iii) serum response element-reporter gene construct; (b) determining the effect of the test compound on the transcription of the response element-reporter gene construct; (c) determining the effect of the test compound on the transcription of the serum response element-reporter gene construct; and (d) selecting the compound that activates the transcription of the serum response element-reporter gene construct without substantially effecting the transcription of the ERE-reporter gene construct.

Those of ordinary skill in the art will recognize that the invention can be practiced using multiple cell lines rather than a single cell line containing multiple transfectants. In one embodiment, a method of screening for compounds to treat steroid receptor related disorders is provided comprising; providing a first cell line transfected with a transcriptionally active steroid receptor and first reporter-gene construct transcriptionally responsive to the steroid receptor; providing a second cell line transfected with the transcriptionally active steroid receptor and a second reporter gene construct wherein transcription of the second reporter gene construct indicates the activation of nongenotropic activity, preferably a signal transduction pathway; determining the effect of a test compound on the transcription of the first and second reporter gene constructs; and selecting the compound that induces the activation of the second reporter gene construct without substantially activating the transcription of the first reporter gene construct.

In yet another embodiment of the present invention, a method of screening for compounds effective for the treatment of steroid receptor related diseases or disorders is provided comprising; administering a test compound to a host, preferably a mammal, most preferably a mouse; determining the effect of the compound on the target nongenotropic action; determining the effect of the compound on transcription of genes regulated by the steroid receptor, and selecting the compound that mediates the nongenotropic effect and does not substantially activate the transcription of steroid regulated genes.

Apoptosis of bone cells can be assessed by obtaining bone cells from the host after administration of the test compound using TUNEL or Hoechst staining. Additionally, bone histomorphometry can be used for directly and precisely analyzing the effect of test compounds on bone tissue. Histology samples are usually obtained

WO 01/96605

PCT/US01/18950

by bone biopsy. The effects of a test compound on the apoptosis of bone cells can also be assessed by determining the effect of the test compound on bone mass or bone strength. Bone mass can be assessed using DEXA or peripheral quantitative computed tomography (pQCT). Bone strength can be measured with biomechanical testing. The activation of transcription of steroid regulated genes can be assessed by determining the effect of a test compound on uterotrophic activity or breast activity.

Those of ordinary skill in the art will appreciate that the screening methods of the present invention can also be utilized to identify compounds that activate genotropic steroid receptor activity without activating nongentropic steroid activity. These compounds can be used when nongentropic activity of steroid receptors is unwanted but genotropic activity is desired. Thus, these compounds can be used to treat steroid or steroid receptor related diseases and disorders where genotropic activity of the steroid is desired but the nongentropic activity is not. Thus, in one embodiment, a method for screening compounds for the treatment of steroid receptor related diseases or disorders, in one embodiment a sex steroid receptor related diseases, is provided comprising: (i) contacting a cell expressing a natural or artificial steroid receptor, in one embodiment a sex steroid receptor, with a test compound; (ii) assessing whether the compound activates a nongentropic activity of the steroid receptor; (iii) determining the level of transcription induced by the test compound; and (iv) selecting the compound or compounds that activate the genotropic activity of the steroid receptor without substantially activating the nongentropic activity of the steroid receptor. Substantially activating the nongentropic activity of a steroid receptor means activating a second messenger system such that the second messenger system induces a nongenotropic biological response in the cell. Exemplary biological responses are chemical cascades, including but not limited to those caused by phosphorylation, changes in morphology, secretion, proliferation, DNA synthesis, protein synthesis, and cytoskeletal rearrangements.

V. Methods for Using Compounds That Induce Selective Steroid Receptor Activity.

The active compounds which satisfy the criteria set out in detail herein can be used to treat a wide variety of medical conditions. Moreover, because steroid receptors including sex steroid receptors are known to be expressed on a variety of tissues in mammals including but not limited to nervous tissue, muscle tissue, bone

WO 01/96605

PCT/US01/18950

tissue, blood, reproductive tissues, the active compounds of the present invention can be used to treat a target disorder of these or other tissues wherein the disorder is related to steroid action, either genotropic or nongenotropic.

In a selected embodiment, the active compounds can be used to treat cardiovascular disease. For example, compounds having the nongenotropic steroid activity of relaxing smooth muscle in large and small arteries can be used to modulate vasoreactivity and sympathetic balance. Active compounds identified by the present invention may be active on multiple steroid receptors and may have different effects on each. For example, an active compound could inhibit the genotropic activity of one steroid receptor without inhibiting the genotropic activity of a different steroid receptor. Similarly, the nongenotropic activity of steroid receptor may be inhibit while the nongenotropic activity of a different steroid hormone receptor is activated.

The active compounds of the present invention may also be used to treat endocrine disorders including non-insulin-dependent diabetes as well as to modulate the immune system. T cells are known to express steroid receptors and the active compounds may be used to treat proliferative and infectious diseases. The active compounds can also be used to treat neurological disorders including epilepsy, anxiety, depression, insomnia, migraine, memory impairment, and drug dependency.

The active compounds can be used as bone anabolic agents in a host, including a human, to strengthen bone for strenuous physical activities such as sports or manual labor, and to strengthen bone in persons or other hosts who do not have osteoporosis but might be subject to osteoporosis in the future because the host is in a risk group for that disease. Other uses for a bone anabolic agent in humans include the treatment of hosts, including persons who are born with naturally thin, small, or unusually fragile bones, including weak teeth, persons who have a genetic predisposition to a bone catabolic disease, or an orthopedic bone disease such as joint degeneration, non-union fractures, orthopedic problems caused by diabetes, periimplantitis, poor responses to bone grafts, implants, or fracture.

These compounds can be used to increase the bone mass in horses and dogs used for labor as well as those used in sports such as racing. The compounds can also be used to increase the bone mass in chickens and turkeys used in meat production to increase the ease of processing.

WO 01/96605

PCT/US01/18950

Representative metabolic bone diseases are postmenopausal osteoporosis, senile osteoporosis in males and females, glucocorticoid-induced osteoporosis, immobilization-induced osteoporosis, weightlessness-induced osteoporosis (as in space flights), post-transplantation osteoporosis, migratory osteoporosis, idiopathic osteoporosis, juvenile osteoporosis, Paget's Disease, osteogenesis imperfecta, chronic hyperparathyroidism, hyperthyroidism, rheumatoid arthritis, Gorham-Stout disease, McCune-Albright syndrome and osteolytic metastases of various cancers or multiple myeloma. Characteristics of the orthopedic bone diseases are loss of bone mass, general bone fragility, joint degeneration, non-union fractures, orthopedic and dental problems caused by diabetes, periimplantitis, poor responses to bone grafts/implants/bone substitute materials, periodontal diseases, and skeletal aging and its consequences.

Compounds selected according to the criteria provided herein can also be used for the augmentation of bone mass and/or fracture prevention in diseases characterized by low bone mass and increased fragility. The compounds can also be used to treat bone disease states in which osteoblastogenesis is decreased, such as senile osteoporosis, and glucocorticoid-induced osteoporosis--especially in growing children and adolescents, during which time in whom interfering with bone remodeling is detrimental. Moreover, those of ordinary skill in the art will recognize that the compounds identified by the present invention can be utilized to treat disease states in which steroid therapy in general, preferably sex steroid therapy, is indicated. Conditions where steroid therapy is indicated include inflammation, arthritis, lupus erythematosus, organ transplants, cancer, epilepsy, anxiety, depression, insomnia, migraine, memory impairment, and drug dependency, immune disorders, and cardiovascular disorders.

The compounds selected by the present invention are advantageous over existing steroid therapies because the selected compounds can initiate the signal transduction mechanism of the steroid hormone receptor pathway and the benefits thereof without inducing transcription thereby preventing adverse side effects associated with current steroid therapy. Examples of side effects associated with current sex steroid therapy include unwanted secondary sexual characteristics including hirsutism in females and gynecomastia in males etc. Compounds exhibiting varying levels of transcriptional activity and anti-apoptotic activity can be useful for the treatment of different conditions or diseases, and those of ordinary skill in the art

WO 01/96605

PCT/US01/18950

can readily determine the level of transcription and anti-apoptotic activity of a compound needed to treat a specific disease using methods commonly known in the art and disclosed herein. In other embodiments, active compounds can be selected that activate the genotropic activity of a steroid receptor but do not activate the nongentropic activity of the steroid receptor. These active compounds are advantageous when nongentropic activity of steroid receptors is undesired.

VI. Kits

An additional embodiment of the present invention is a kit for measuring steroid receptor dependent nongentropic activity comprising: a container having a stable transfected cell line wherein the cell line includes a steroid responsive reporter gene construct, a means for assessing the activation of nongentropic steroid activity, and a steroid receptor. The kit can also include a cell line in which at least one of the steroid receptors, the reporter gene construct is included as an expression plasmid.

In one nonlimiting example, 17 β -estradiol is a positive compound control of ERK activation as well as C3 transcription. Pyrazole can be used as negative control of ERK activation and the estren as a negative control of C3 transcription. Compounds with strong SRE-SEAP activity but weak or absent C3-Luc activity, compared to 17 β -Estradiol are selected. The selection criteria can include classifying compounds of interest based on the ratio of ERK activation over C3 transcription.

VII. Transgenic Animals

In still another embodiment of the present invention, a transgenic non-human animal is provided that includes an inducible transgene encoding at least one steroid receptor antagonist, for example, an ER peptide antagonist such as peptide F6, α II, or 293, and preferably two copies of the peptide are encoded. In one embodiment, induction of the transgene blocks both the genotropic and the nongenotropic of the receptor. In another embodiment, induction of one or two transgenes block the transcriptional activity of a steroid receptor. A transgenic non-human animal, preferably a mouse, having at least one inducible steroid receptor specific antagonist can be used to screen for compounds to treat disease that act specifically through that receptor.

In one embodiment, a method for screening for compounds to selectively induce a receptor response is provided comprising, (i) inducing the expression of at

WO 01/96605

PCT/US01/18950

least one receptor antagonist in a transgenic animal containing at least one inducible receptor antagonist transgene; (ii) administering a test compound to the transgenic animal; (iii) determining the extent of nongenotropic effect in the animal of step (ii); (iv) determining the level of transcription in the animal of step (ii); and (v) selecting the compound that induces the nongenotropic effect without significantly increasing transcription in the transgenic animal administered the test compound. The creation of transgenic animals is known in the art. U.S. Patent No. 6,025,539 to Lee et al. discloses an IL-5 transgenic mouse and method for producing transgenic mice and is incorporated herein in its entirety. One of ordinary skill in the art will appreciate that inducible transgenes can be cell, tissue, or organ specific. In one embodiment, the transgene is under the control of the reverse tetracycline repressor/tetracycline -ON system driven by the actin promoter and as described in Gossen, M. et al. (1993) Trends Biochem Sci 18: 471-475; and Gossen M. et al. (1995) Science 268:1766-1769.

In a more specific embodiment, a method for screening for compounds to selectively induce a receptor response is provided comprising, (i) inducing the expression of at least one ER antagonist in a transgenic animal containing at least one inducible ER antagonist transgene; (ii) administering a test compound to the transgenic animal; (iii) determining the number of osteoblasts or osteocytes undergoing apoptosis in the animal of step (ii); (iv) determining the level of transcription in the animal of step (ii); and (v) selecting the compound that inhibits apoptosis without significantly increasing transcription in the transgenic animal administered the test compound.

The reverse tetracycline repressor (rTetR or TET-ON) system takes advantage of the high specificity of the tetracycline repressor (TetR)-operator-tetracycline (Tc) interaction, the herpes simplex virus (HSV)-VP16 transcription activation domain, and tetracycline (Tc). In the conventional (TET-OFF) system, the Tc-controlled transactivator (tTA), a fusion between *TetR* and the activating domain of the VP16 protein, stimulates gene expression, as has been shown with reporter assays in HeLa cells. Tc can prevent tTA from binding to *tet* operators (*tetO*) upstream of a minimal promoter, and consequently turns off tTA-dependent expression. However, the TET-ON system utilizes a rTA transactivator that has been modified, such as Tc, or its derivative Doxycycline (Dox) that induces rather than abolishes binding of VP16 to

WO 01/96605

PCT/US01/18950

the operator. The TET-ON system circumvents any potential toxic effects that may be conferred to eukaryotic cells following prolonged exposure to tetracycline.

In another embodiment, a transgenic non-human animal is provided that has an inducibly inactivated steroid receptor. In one embodiment, a transgenic animal is disclosed in which the sex steroid receptor is inactivated only in osteoblasts and osteocytes. The Cre/*loxP* binary recombination system is a preferred method for generating these transgenic animals. Identified transgenic animals can be characterized in terms of their ability to switch on Cre expression in response to Dox. In another embodiment, a transgenic animal is provided wherein specific exons of the steroid receptor gene are inducibly spliced creating specific steroid receptor deletions. In one example, exon 3 or exon 4 of the ER α gene is inducibly spliced to generate a transgenic animal having an ER α deletion in exon 3 or exon 4 or both exons.

In still another aspect of the present invention, a non-human transgenic animal model of bone disease is provided. The transgenic animal can be heterozygous or homozygous for the transgene and can have one or more transgenes. The transgene can be operably linked to an inducible promoter. In other aspects of the invention, a transgenic animal is provided that includes a sex steroid receptor that (i) contains a DNA binding domain that does not mediate a genotropic sex effect on exposure to an estrogen or androgen; (ii) contains a ligand binding domain that does not induce an anti-apoptotic effect on osteoblasts or osteocytes on exposure to an estrogen or androgen; or (iii) or contains both (i) and (ii).

In yet another aspect, at least one polynucleotide used as the transgene to block both the genotropic and the anti-apoptotic activity of the estrogen receptor but not the androgen receptor. For example, using 2XF6 as the transgene, the activity of the estrogen receptor can be blocked but the anti-apoptotic activity of estrogen or androgen through the androgen receptor can be retained.

VIII. Combination Therapy

In one aspect of the invention, one of the active compounds described herein can be administered to a host to treat steroid or steroid receptor related diseases or disorders including bone disease in combination with a second pharmaceutical agent.

With respect to bone disease, the second pharmaceutical agent can be a bone anti-resorption agent, a second bone mass anabolizing agent, an antioxidant, a dietary supplement, or any other agent that increases the beneficial effect of the active

WO 01/96605

PCT/US01/18950

compound on bone structure, strength, density, or mass. Any member of the ten classes of drugs that are used in the treatment of osteoporosis can be administered in combination with the primary active agent, including: an anabolic steroid, a bisphosphonate, a calcitonin, an estrogen or progesterone, an anti-estrogens such as raloxifene or tamoxifene, parathyroid hormone ("PTH"), fluoride, Vitamin D or a derivative thereof, or a calcium preparations.

Nonlimiting examples of suitable agents for combination include, but are not limited to, alendronic acid, disodium clodronate, disodium etidronate, disodium medronate, disodium oxidronate, disodium pamidronate, neridronic acid, risedronic acid, teriparatide acetate, tiludronic acid, ipriflavone, potassium bicarbonate, progestogen, a thiazide, gallium nitrate, NSAIDS, plicamycin, aluminum hydroxide, calcium acetate, calcium carbonate, calcium, magnesium carbonate, and sucralfate. Reducing agents, such as glutathione or other antioxidants may also be useful in combination with any of the compounds of the present invention. As used herein, the term antioxidant refers to a substance that prevents the oxidation of an oxidizable compound under physiological conditions. In one embodiment, a compound is considered an antioxidant for purposes of this disclosure if it reduces endogenous oxygen radicals *in vitro*. The antioxidant can be added to a cell extract under oxygenated conditions and the effect on an oxidizable compound evaluated. As nonlimiting examples, antioxidants scavenge oxygen, superoxide anions, hydrogen peroxide, superoxide radicals, lipooxide radicals, hydroxyl radicals, or bind to reactive metals to prevent oxidation damage to lipids, proteins, nucleic acids, etc.

In another aspect of the invention, one of the active compounds described herein can be administered to a host to treat a steroid receptor related disorder in combination with a second pharmaceutical agent. The second pharmaceutical agent can be a steroid, sex steroid, modified steroid, modified sex steroid, antibiotic, antioxidant, dietary supplement, or any other agent that increases the beneficial effect of the active compound on steroid receptor related disorders.

IX. Pharmaceutical Compositions

A compound that induces a selective steroidal effect or its pharmaceutically acceptable salt, selected according to the criteria described in detail herein, can be administered in an effective amount to treat any of the conditions described herein, optionally in a pharmaceutically acceptable carrier or diluent.

WO 01/96605

PCT/US01/18950

The active materials can be administered by any appropriate route for systemic, local or topical delivery, for example, orally, parenterally, intravenously, intradermally, subcutaneously, buccal, intranasal, inhalation, vaginal, rectal or topically, in liquid or solid form. Methods of administering the compound of the invention may be by specific dose or by controlled release vehicles.

A preferred mode of administration of the active compound is oral. Oral compositions will generally include an inert diluent or an edible carrier. The active compound can be enclosed in gelatin capsules or compressed into tablets. For the purpose of oral therapeutic administration, the compound can be incorporated with excipients and used in the form of tablets, troches, or capsules. Pharmaceutically compatible binding agents, and/or adjuvant materials can be included as part of the composition.

The tablets, pills, capsules, troches and the like can contain any of the following ingredients, or compounds of a similar nature: a binder such as microcrystalline cellulose, gum tragacanth or gelatin; an excipient such as starch or lactose, a disintegrating agent such as alginic acid, Primogel, or corn starch; a lubricant such as magnesium stearate or Sterotes; a glidant such as colloidal silicon dioxide; a sweetening agent such as sucrose or saccharin; and/or a flavoring agent such as peppermint, methyl salicylate, or orange flavoring. When the dosage unit form is a capsule, it can contain, in addition to material of the above type, a liquid carrier such as a fatty oil. In addition, dosage unit forms can contain various other materials which modify the physical form of the dosage unit, for example, coatings of sugar, shellac, or other enteric agents.

The compound can be administered as a component of an elixir, suspension, syrup, wafer, chewing gum or the like. A syrup may contain, in addition to the active compounds, sucrose as a sweetening agent and certain preservatives, dyes and colorings and flavors.

The compound or a pharmaceutically acceptable derivative or salts thereof can also be mixed with other active materials that do not impair the desired action, or with materials that supplement the desired action, such as classical estrogen like 17 β -estradiol or ethinyl estradiol; bisphosphonates like alendronate, etidronate, pamidronate, risedronate, tiludronate, zoledronate, cimadronate, clodronate, ibandronate, olpadronate, neridronate, EB-1053; calcitonin of salmon, eel or human

WO 01/96605

PCT/US01/18950

origin; and anti-oxidants like glutathione, ascorbic acid or sodium bisulfite. Solutions or suspensions used for parenteral, intradermal, subcutaneous, or topical application can include the following components: a sterile diluent such as water for injection, saline solution, fixed oils, polyethylene glycols, glycerine, propylene glycol or other synthetic solvents; antibacterial agents such as benzyl alcohol or methyl parabens; chelating agents such as ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA); buffers such as acetates, citrates or phosphates and agents for the adjustment of tonicity such as sodium chloride or dextrose. The parental preparation can be enclosed in ampoules, disposable syringes or multiple dose vials made of glass or plastic.

If administered intravenously, preferred carriers are physiological saline or phosphate buffered saline (PBS).

In a preferred embodiment, the active compounds are prepared with carriers that will protect the compound against rapid elimination from the body, such as a controlled release formulation, including implants and microencapsulated delivery systems. Biodegradable, biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid, collagen, polyorthoesters, and polylactic acid. Methods for preparation of such formulations will be apparent to those skilled in the art.

Liposomal suspensions (including liposomes targeted with monoclonal antibodies to surface antigens of specific cells) are also pharmaceutically acceptable carriers. These may be prepared according to methods known to those skilled in the art, for example, as described in U.S. Patent No. 4,522,811 (which is incorporated herein by reference in its entirety). For example, liposome formulations may be prepared by dissolving appropriate lipid(s) (such as stearyl phosphatidyl ethanolamine, stearyl phosphatidyl choline, arachidoyl phosphatidyl choline, and/or cholesterol) in an inorganic solvent that is then evaporated, leaving behind a thin film of dried lipid on the surface of the container. An aqueous solution of the active compound or its monophosphate, diphosphate, and/or triphosphate derivative(s) is then introduced into the container. The container is then swirled by hand to free lipid material from the sides of the container and to disperse lipid aggregates, thereby forming the liposomal suspension.

The dose and dosage regimen will depend upon the nature of the metabolic bone disease, the characteristics of the particular active compound, *e.g.*, its therapeutic index, the patient, the patient's history and other factors. The amount of an activator

WO 01/96605

PCT/US01/18950

of nongentropic estrogen-like signaling compound administered will typically be in the range of about 1 pg/kg to about 10 mg/kg of patient weight. The schedule will be continued to optimize effectiveness while balanced against negative effects of treatment. See Remington's Pharmaceutical Science, 17th Ed. (1990) Mark
5 Publishing Co., Easton, Penn.; and Goodman and Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics 8th Ed (1990) Pergamon Press.

For parenteral administration, the active compound will most typically be formulated in a unit dosage injectable form (solution, suspension, emulsion) in association with a pharmaceutically acceptable parenteral vehicle. Such vehicles are
10 preferably non-toxic and non-therapeutic. Examples of such vehicles are water, saline, Ringer's solution, dextrose solution, and 5% human serum albumin. Nonaqueous vehicles such as fixed oils and ethyl oleate may also be used. Liposomes may be used as carriers. The vehicle may contain minor amounts of additives such as substances that enhance isotonicity and chemical stability, *e.g.*, buffers and
15 preservatives. An activator of nongentropic estrogen-like signaling compound will typically be formulated in such vehicles at concentrations of about 10 pg/ml to about 10 mg/ml.

The concentration of the compound in the drug composition will depend on absorption, inactivation, and excretion rates of the drug as well as other factors known
20 to those of skill in the art. It is to be noted that dosage values will also vary with the severity of the condition to be alleviated. Additionally, the active ingredient may be administered at once, or may be divided into a number of smaller doses to be administered at varying intervals of time. It is to be further understood that for any particular patient, specific dosage regimens should be adjusted over time according to
25 the individual need and the professional judgment of the person administering or supervising the administration of the compositions, and that the concentration ranges set forth herein are exemplary only and are not intended to limit the scope or practice of the claimed composition.

30 X. Illustrative Examples

The following examples are given for the purpose of illustrating various embodiments of the invention and are not meant to limit the present invention in any fashion.

WO 01/96605

PCT/US01/18950

A. Estrogens and androgens modulate osteoclastogenesis via transcriptional regulation of cytokines; and osteoblastogenesis via attenuation of mesenchymal progenitor self-renewal. Estrogens and androgens also exert effects on the lifespan of mature bone cells: pro-apoptotic effects on osteoclasts, but anti-apoptotic effects on osteoblasts and osteocytes. The latter are mediated by a "nongestropic", yet receptor-dependent, mechanism of action, and are mechanistically dissociable from transcriptional activity.

The potent anti-apoptotic effect of sex steroids on osteoblasts and osteocytes is mediated by a receptor-dependant mechanism and requires phosphorylation of ERKs via activation of Src and Shc kinases. Moreover, results in HeLa cells show that ER α , ER β , or AR can transmit anti-apoptotic signals with the same efficiency irrespective of whether the ligand is an estrogen or an androgen. Using the ER α as a paradigm, it has been discovered that the AF-1 function, DNA binding, the F as well as the dimerization domains of this protein are dispensable for the anti-apoptotic effects of estrogen. Instead, these effects require the portion of the protein that resides within the E domain. Therefore, the anti-apoptotic activity of the estrogen receptor must be localized in a region of the protein that is distinct and dissociable from that which is responsible for the genotropic effects of the ligand-activated receptor. Evidence that the ability of the ER to convey the anti-apoptotic signal is lost by targeting the protein to the nucleus is also disclosed.

Others have reported biologic effects of the nuclear orphan receptor TR3 and ER which were independent of their transcriptional activity in the nucleus (Li, H. et al. (2000). *Science* 289, 1159-1164; Simoncini, T., et al (2000). *Nature* 407, 538-541). In addition, Migliaccio et al. (Migliaccio, A., et al (2000). *EMBO J.* 19, 5406-5417) showed ER or AR co-immunoprecipitate with Src in prostate cancer cells. Consistent with the finding that the anti-apoptotic activity of the ER requires the SH2 domain of Src, while the AR requires the SH3 domain, Migliaccio et al. also showed that ER interacted with SH2 domain and AR with the SH3 domain of Src. The present results (Figures 2 and 4) argue strongly that the cross-talk between antagonists, and more important the cross-talk between the cognate ligands-an issue that was not addressed in the Migliaccio study - is not dependant on the complexing of ER with AR, as prevention of apoptosis by the heterologous ligand could be demonstrated in cells transfected with only one steroid receptor.

WO 01/96605

PCT/US01/18950

Several members of the MAP kinase signaling pathway, including Src and ERKs, are clustered in caveolae - specialized membrane invaginations that are enriched in the scaffolding protein caveolin-1 and compartmentalize signal transduction (Okamoto, T., et al. (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 5419-5422). Caveolae are found in a variety of cell types including human and murine osteoblasts (Solomon, K.R., et al. (2000) *J. Bone Miner. Res.* 15, 2391-2401; Solomon K.R., et al. (2000) *J. Bone Miner. Res.* 15, 2380-2390). ER α has been shown recently to co-immunoprecipitate with caveolin-1 (Schlegel, A., et al. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 33551-33556). A sub-population of ER α has been co-localized in caveolae with both caveolin and eNOS - an enzyme activated by estrogen through a nongenotropic mechanism of action (Chambliss, K.L., et al. (2000) *Circ. Res.* 87, E44-E52). The dependency of the anti-apoptotic effects of estrogen and androgen on sex steroid receptors, along with the evidence that the anti-apoptotic signal of the E domain of the ER is preserved when targeting this protein to the membrane, but it is lost when targeting it to the nucleus, demonstrate that the effect can be mediated via a fraction of the classical receptors that is associated with the plasma membrane, probably within caveolae. This connection is supported by the finding of a co-dependency of the phenomena on Src, Shc and ERKs.

The data disclosed herein is the first demonstration that the nongenotropic activity of a steroid receptor can be functionally dissociated from the genotropic activity of this transcription factor; and that this can be accomplished using synthetic steroidal or non-steroidal compounds. Although the invention has been exemplified using sex steroids, those of ordinary skill in the art will recognize that invention is applicable to all steroid hormones including estrogens, progestins, androgens, glucocorticoids and mineralocorticoids to separate nongenotropic activity from genotropic activity. Similarly, the specification is the first to disclose novel treatments for bone disease using compounds that act through sex steroid receptors to inhibit apoptosis without inducing transcription. In one embodiment, ligand-induced dissociation of the two activities is the result of distinct conformational states, assumed by the receptor proteins following their physical association with the ligand, that are required to effect the genotropic *versus* the anti-apoptotic responses (Figure 7). Because sex steroid receptors are found on many tissues other than reproductive tissues such as bone and brain, the compounds selected with the present invention can be used to treat conditions associated with the tissues or organs expressing sex steroid

WO 01/96605

PCT/US01/18950

receptors. Exemplary tissues where sex steroid receptors have been found include but are not limited to pituitary and hypothalamic tissues, muscle tissue, blood cells, blood vessels, and colonic mucosa.

On the scale of molecular interactions and cellular events, a genotropic response is a relatively long-term one and thus is believed to require the classical ligand-receptor interaction involving a detailed fit to the hormone in the binding pocket to produce a complex of sufficient stability and lifetime to effect the multiple protein-protein and protein-nucleic acid interactions and the enzymatic activations that are required to remodel chromatin architecture and effect changes in the rate of gene transcription (**Figure 7, far right complex**). The need to form such a stable, long-lived ligand-receptor complex places strict demands on ligand structure, leading to the well-known specificity and distinct pharmacology that characterize the classical genotropic effects of estrogens and androgens.

By contrast, ERK activation, which underlies the nongenotropic anti-apoptotic response, is very rapid and may be effected by a less fully developed or broader range of conformations adopted by much more transient ligand-receptor complexes (**Figure 7, far left complex**). The formation of such transient species might require merely that the ligand associates with the receptor briefly, and thus would be dominated by ligand association rates, rather than the ratio of association to dissociation rates that determines the affinity of ligands assessed by classical binding affinity assays. Because ligand association rates are much more comparable than dissociation rates (Bindal R.D., et al. (1987) *J Steroid Biochem.* 28, 361-370; Raynaud JP, et al. (1978) *Cancer Res.* 38, 3044-3050), the formation of such short-term complexes might show greatly relaxed structural specificity and potency/affinity ranking, as is manifest in the anti-apoptotic response.

The idea that a ligand-induced rapid response may exhibit a different potency order than a long-term response has interesting precedents. In the time course of events that follows estrogen stimulation of the uterus of immature rats, short-acting estrogens such as estradiol and dimethylstilbestrol and equipotent with long-acting estrogens such as estradiol and diethylstilbestrol in inducing early responses such as water imbibition and early RNA synthesis, whereas they are far less potent than the long-acting estrogens in inducing the later responses such as DNA synthesis and uterine growth (Katzenellenbogen BS, et al. (1979) *Prog. Horm. Res.* 35, 259-300; Katzenellenbogen BS, et al. (1978). *Mol. Cell Endocrinol.* 10, 103-113). In fact the

WO 01/96605

PCT/US01/18950

term "impeded estrogen was coined to describe this characteristic change in potency between short-term and long-term responses. These differences were attributed to the need for continuous and long-term receptor occupancy by ligand to induce long-term responses, whereas transient occupancy was sufficient to induce the short-term ones.

5 Biologically more distant but more pertinent to the time scale of events described in this work is the concept of enzyme "slow, tight-binding inhibitors" (Szedlaczek, S.E. (1995) *Methods Enzymol.* 249, 144-180.; Morrison, J.F. (1988) *Adv. Enzymol. Relat. Areas. Mol. Biol.* 61, 201-301). In a number of cases, enzymes can be inhibited rapidly and effectively by a rather wide range of ligands, only a few
10 of which then proceed slowly to form much more stable complexes. Thus, the rapidly formed, initial enzyme-inhibitor ("fast-loose") complexes demonstrate the relaxed specificity shown here in the nongentropic responses, whereas the slow-tight complexes have their parallel in the classically recognized sex-specific stable complexes needed for genotropic activity.

15 Consistent with the in vitro anti-apoptotic effects of sex steroids on osteoblasts and osteocytes, the loss of estrogens or androgens shortens the lifespan of osteoblasts and osteocytes in gonadectomized mice from either sex. An increase in osteocyte apoptosis following loss of estrogen has been demonstrated previously in rats as well as in humans (Noble, B.S. and Reeve, J. (2000) *Mol. Cell Endocrinol.* 159, 7-13), and
20 contrasts with pro-apoptotic effects of estrogen on osteoclasts and the prolongation of their lifespan in estrogen deficiency (Hughes, D.E., et al. (1996) *Nat. Med.* 2, 1132-1136; Kameda, T., et al. (1997) *J. Exp. Med.* 186, 489-495). A shortened working life of the bone forming cell and longer working life of the bone resorbing cells could account, in part, for the imbalance between bone resorption and formation that
25 follows loss of sex steroids. Moreover, an increase in osteocyte apoptosis could further weaken the skeleton by impairing the osteocyte/canalicular mechanosensory network (Manolagas, S.C. (2000) *Endocr. Rev.* 21, 115-137). Indeed, it seems likely that the signals of estrogens and those of mechanical strains may be integrated in bone, since, osteocytes which, like endothelial cells, are primarily regulated by shear
30 stress and respond to estrogens, do also respond to stretching with ERK activation.

The dissociation of nongentropic from genotropic activities of the sex steroid receptors with synthetic ligands provide a novel means of separating desirable from undesirable actions of sex steroids, thereby providing improved pharmacotherapeutic agents. Specifically, the mechanism-specific ligands of the ERs or the AR, in

WO 01/96605

PCT/US01/18950

distinction to tissue-specific ligands (SERMs) or classical estrogen or androgen, are an advantageous class of pharmacotherapeutic agents (true anabolic as opposed to anti-resorptive, and gender neutral) for the management of osteopenic states.

5 B.

Mice. Four-month-old female Swiss-Webster mice or five-month-old male SAMRI mice were maintained and used in accordance with NIH guidelines on the care and use of laboratory animals. Mice were subjected to a sham operation or to bilateral ovariectomy or orchidectomy. After 4 or 3 weeks, female or male mice, respectively,

10 were sacrificed and the lumbar vertebrae removed.

Quantification of apoptotic osteoblasts and osteocytes in undecalcified bone sections.

Apoptotic osteoblasts and osteocytes were detected in undecalcified plastic-embedded sections of the vertebrae (L1 to L5) by TUNEL staining using the Klenow FragEL detection kit (Oncogene), as previously described (Weinstein, R.S., et al. (1998) *J. Clin. Invest.* 102, 274-282; Jilka, R.L., et al. (1999) *J. Clin. Invest.* 104, 439-446). TUNEL-positive hypertrophic chondrocytes were observed at the bottom of the growth plates serving as an internal positive control for each bone section.

20 Cell cultures. Osteoblastic cells were obtained from neonatal murine calvaria by collagenase digestion, cultured for 2-3 days in α MEM containing 10% FBS, resuspended using trypsin-EDTA, and frozen until use. Osteocytic MLO-Y4 cells (Kato, Y., et al. (1997). *J. Bone Miner. Res.* 12, 2014-2023) were cultured in phenol red-free α MEM supplemented with 2.5% FBS, 2.5% bovine calf serum, and cultured

25 on collagen type I coated plates. Osteoblastic OB-6 cells (Lecka-Czernik, B. et al. (1999) *J. Cell Biochem.* 74, 357-371) were cultured in phenol red-free α MEM supplemented with 5% FBS. HeLa cells were cultured in phenol red-free MEM supplemented with 10% FBS, 0.1 mM nonessential amino acids, and 1 mM sodium pyruvate.

30

Quantification of apoptotic cells *in vitro*. Apoptotic cells were quantified either by trypan blue staining or by direct visualization of changes in nuclear morphology (in the case of transfected HeLa cells), as previously described (Plotkin, L. et al. (1999). *J. Clin. Invest.* 104, 1363-1374; Jilka, R.L. et al. (1998) *J. Bone Miner. Res.* 13, 793-802;

WO 01/96605

PCT/US01/18950

Jilka, R.L. et al. (1999) *J. Clin. Invest.* 104, 439-446). In the latter method, the visualization of pyknotic or fragmented nuclei was facilitated by co-transfections of cells plated on glass coverslips with the enhanced fluorescent proteins (green or red) containing a nuclear localization sequence (EGFP-nuc or ERFP-nuc). Following
 5 fixation in 3.7% formaldehyde, the percentage of apoptosis was determined by determining the nuclear morphology in 200-500 transfected (fluorescent) cells.

Anoikis assay. Osteoblastic OB-6 cells ($3.3 \times 10^5/\text{ml}$) were cultured in type I collagen gels, essentially as previously described (Klein, C.E., et al. (1991) *J. Cell Biol.* 115,
 10 1427-1436). After gels formed, they were detached from the bottom of the well using a spatula, and overlaid with 0.5 ml of α MEM containing 10% FBS, 200 μM ascorbic acid, and either vehicle (0.1% ethanol) or steroids. After fixation, ten-micron sections were cut and apoptotic cells were quantified by TUNEL staining.

Western blot analysis. The phosphorylation status of ERK1/2 was analyzed by immunoblotting using a mouse monoclonal antibody recognizing tyrosine phosphorylated ERK1/2, or a rabbit polyclonal antibody recognizing total ERK1/2,
 15 followed by incubation with either an anti-mouse or an anti-rabbit antibody conjugated with horseradish peroxidase (Santa Cruz Biotechnology).

DNA constructs. Reporter plasmids carrying the 2.25 Kb of the human IL-6 promoter, 3 copies of the vitellogenin ERE sequences, or the complement 3 promoter driving the firefly luciferase gene (IL-6-luc, ERE-luc, and C3-luc, respectively) were used to assay transcriptional effects of the steroids. The expression plasmids of ER
 20 peptide antagonists carrying either αII , or two copies of 293 (2x293), or two copies of F6 (2xF6) or GRIP fused to the GAL4 DNA binding domain driven by the SV40 promoter have been described previously (Norris, J.D. et al. (1999) *Science* 285, 744-746). The sequences of the peptides are disclosed in Chang et al. (1999) *Mol. Cell. Bio.* 19:8226-8239 which is incorporated herein in its entirety. The sequence for
 25 peptide αII is SSLTSRDFGSWYASR (SEQ ID NO.: 1). The sequence for peptide 293 is SSIKDFPNLISLLSR (SEQ ID NO.: 2). The sequence for peptide F6 is GHEPLTLERLLMDDKQAV (SEQ ID NO.: 3). The sequence for GRIP is HSR LHDSKGGQTKLLQLLTTSKSDQMEPSPLPSSLSDTNKDSTGSLPGSTHGT
 30 SLKEKHKILHRLQLQSSSPVDLAKLTAEATGKELSQESSSTAPGSEVTVKQEP

WO 01/96605

PCT/US01/18950

ASPKKKENALLRYLLDKDDTKDIGLPE (SEQ ID NO.: 4). Similarly, expression plasmids for the ER α mutants Δ A/B; S104,106,118A; Δ F; S554fs; Δ DBD; or L525A have been reported earlier (Schodin, D.J. et al. (1995) *J Biol. Chem.* 270, 31163-31171; Ekena, K., et al. (1996) *J Biol. Chem.* 271, 20053-20059; Montano, M.M., et al. (1995) *Mol. Endocrinol.* 9, 814-825; Montano, M.M. and Katzenellenbogen, B.S. (1997) *Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 2581-2586; McInerney, E.M. and Katzenellenbogen, B.S. (1996) *J Biol. Chem.* 271, 24172-24178; Le Goff et al. (1994) *J Biol. Chem.* 269, 4458-4466; Wrenn, C.K. and Katzenellenbogen, B.S. (1993) *J Biol. Chem.* 268, 24089-24098; Ince, B.A. et al. (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 14026-14032). For the construction of the DE and E mutants of the ER α , nucleotides corresponding to amino acids 263 through 553 and 333 through 553, respectively, were amplified from ER α by PCR. The forward primer contained the restriction site for SalI and the ER α Kozak sequence and the reverse primer contained the BamHI restriction site. Amplified PCR products were subcloned into the SalI/BamHI restriction site of pCMV.

The ER α -ECFP, E-ECFP, E-Nuc-ECFP and E-Mem-ECFP constructs were generated by PCR amplification of ER α using primer pairs 5'-GCCGCTAGCACCATGACCATGACCTCCAC-3' (SEQ ID NO.: 5) and 5'-GCCACCGGTCTGACTGTGGCAGGGAAC-3' (SEQ ID NO.: 6) or 5'-GCCGCTAGCACCATGAAGAAGCAGCCTGGCCTTG-3' (SEQ ID NO.: 7) and 5'-GCCACCGGTCTAGTGGGCGCATGTAGGCG-3' (SEQ ID NO.: 8), respectively. PCR products were digested with NheI and AgeI and inserted into the same sites in the appropriate ECFP vector. To generate E-Mem-ECFP, E was cloned into the Mem-ECFP vector (Clontech) which carries the N-terminal 20 amino acids of neuromodulin containing a signal for post-translational palmitoylation of cysteines 3 and 4 that target the fusion protein to the plasma membrane. To generate E-Nuc-ECFP, E was cloned into the Nuc-ECFP vector (Clontech) which carries three copies of the nuclear localization signal of the simian virus 40 large T-antigen fused to the C-terminus of ECFP. For the generation of ER α -ECFP and E-ECFP, the nuclear localization signal was eliminated from the Nuc-ECFP vector by BglII/BamHI digestion and religation to generate ECFP. ER α or E PCR products were then ligated into the NheI/AgeI sites of ECFP. The complete sequence of all PCR-amplified regions was verified by sequencing. The cDNA for Src ASH3, Src ASH2, and SrcK295M (Src K⁻) were gifts from Dr. William C. Home, Yale University (Zhang,

WO 01/96605

PCT/US01/18950

Z. et al. (2000) J. Biol.Chem 275:479-486). Wt or Shc mutants were provided by Dr K.S. Ravichandran, University of Virginia (Walk, S.F. et al. (1998) Eur. J. Immunol. 28, 2265-2275). dn MEK was provided by Dr N.G. Ahn, University of Colorado (Mansour, S.J. et al. (1994) Science 265, 966-970).

5 Transient transfections. HeLa cells were plated at $5 \times 10^4/\text{cm}^2$ and after 16-24 hours were transfected with a total amount of 3 μg of DNA using Lipofectamine (Life Technologies Inc). Following a 4-6 hours of incubation, the transfection mix was replaced with fresh medium containing 10% charcoal-stripped serum and treatments were initiated. The IL-6 transcriptional analysis was performed as before (Potttratz, 10 S.T. et al. (1994) J. Clin. Invest. 93, 944-950). For ERE- or C3-mediated transcription, transfected cells were treated with E_2 and luciferase and β -galactosidase activities were measured 24h later.

15 RT-PCR analysis of the ERs and AR in embryonic fibroblasts. The primers used were: for ER α (350 bp) 5'-TCTGCCAAGGAGACTCGCTACTGT-3' (SEQ ID NO.: 9) and 5'-CTTGCCAAAGGTTGGCAGC-3' (SEQ ID NO.: 10); for ER β (162 bp) 5'-GAAGTGCCAGCGAGCAGGTG-3' (SEQ ID NO.: 11) and 5'-TGCTGGGACGGCTCACTAGCACAT-3' (SEQ ID NO.: 12); for AR (615 bp) 5'-TGTGTGGAAATAGATGGG-3' (SEQ ID NO.: 13) and 5'-TACATGTGGTCAAGTGGG-3' (SEQ ID NO.: 14); and for β -actin (200 bp) 5'-TGGAGAAGAGCTATGAGCTGCCTG-3' (SEQ ID NO.: 15) and 5'-GTGCCACCAGACGCACTGTGTTG-3' (SEQ ID NO.: 16).

25 Statistical analysis. The Student's *t* test was used to evaluate the *in vivo* changes in bone cell apoptosis to assess for significant differences between means of the groups ($n=4-5$), after establishing equivalence of variances and normal distribution of data. The data of the *in vitro* apoptosis assays were analyzed by ANOVA, and the Student-Neuman-Keuls method was used to estimate the level of significance of differences 30 between means. In order to establish whether the steroid effect was dependent on the pro-apoptotic agent used, data of Figures 1C and 1D were analyzed by two-way ANOVA, in which the two variables were the proapoptotic agents (vehicle, dexamethasone, ctoposide, and TNF α) and the pretreatments (vehicle, E_2 , and DHT).

WO 01/96605

PCT/US01/18950

Subsequently, the Bonferroni method was used to estimate the significance of the differences among pretreatment-agent combinations.

EXAMPLE 1

5 Regulation of osteoblast and osteocyte apoptosis by estrogen or androgen *in vivo* and
in vitro

Ovariectomy or orchidectomy in mice increased vertebral osteoblast apoptosis by 10- and 8.3-fold and osteocyte apoptosis by 4- and 3.5-fold, respectively, compared to sham-operated controls (**Figure 1A**). These changes were prevented in ovariectomized mice receiving 17 β -estradiol (E₂).(data not shown). To elucidate the mechanism of these effects, primary clavaria cell cultures and an osteocytic cell line were used as *in vitro* models. Either E₂ or 5 α -dihydrotestosterone (DHT) inhibited etoposide-induced apoptosis in calavaria cells in a dose-dependent fashion with a maximal effect seen at 10⁻⁹ to 10⁻⁸ M (**Figure 1B**); identical results were obtained with MLO-Y4 cells (not shown). E₂ or DHT prevented apoptosis of clavaria-derived murine osteoblastic cells (**Figure 1C**) or the osteocytic cell line MLO-Y4 (**Figure 1D**) when induced by any of three different pro-apoptotic stimuli: etoposide, dexamethasone, or TNF α , as well as Fas-Fas ligand (not shown).

20 The signals that control the prevalence of apoptosis of osteoblasts and osteocytes *in vivo* are unknown. However, there is extensive evidence to suggest that interactions of cells with their matrix, in particular collagen-integrin interactions, are important *in vivo* cues for the decision of a cell to survive or initiate the process of suicide by apoptosis. This phenomenon has been termed anoikis (Frisch, S.M. and Ruoslahti, E. (1997) Curr. Opin. Cell Biol. 9, 701-706). Therefore the effects of sex steroids on anoikis using a bone marrow derived osteoblastic cell line (OB-6), which was cultured inside Type I collagen gels were studied (**Figure 1E**). In this system, apoptosis results from loss of integrin signaling during contraction of the collagen lattice. As in the case of the other pro-apoptotic signals, either E₂ or DHT does-
 30 dependently attenuated anoikis at concentrations as low as 10⁻¹¹M.

WO 01/96605

PCT/US01/18950

EXAMPLE 2

ER (α or β) or the AR transmit anti-apoptotic signals with the same efficiency
irrespective of whether the ligand is an estrogen or an androgen

5 The estrogen receptor antagonist ICI 182,780 or the androgen receptor antagonist flutamide blocked the anti-apoptotic effect of E_2 and DHT in calvaria cells, indicating strongly that the effects of the sex steroids were mediated by the ER and AR. Surprisingly, however, the anti-apoptotic effect of E_2 was also abrogated by flutamide, and the effect of DHT by ICI 182,780 (Figure 2A). Consistent with this
10 unexpected result, others have shown previously that anti-hormones including ICI 182,780 interact with multiple classes of steroid receptors (Nawaz, Z. (1999) Cancer Res. 59, 372-376).

To establish the dependency of the anti-apoptotic effect of E_2 and DHT on the ER and AR and dissect the role of each receptor in the unexpected results with the
15 antagonists, studies with HeLa cells, which do not express ER or AR were performed. In these experiments, HeLa cells were transiently transfected with enhanced green fluorescent protein containing a nuclear localization sequence (EGFP-nuc) and either $ER\alpha$, $ER\beta$ or the AR expression constructs, or empty vector controls (Figure 2B). Neither E_2 nor DHT (10^{-12} M to 10^{-8} M) had an effect on etoposide-induced apoptosis
20 in cells transfected with the vector without receptor (empty vector, ev). However, in HeLa cells transfected with either the ER (α or β) or the AR, but not the vitamin D receptor (VDR) or the retinoid X receptor (RXR), both E_2 or DHT prevented apoptosis in a dose-dependent manner over the same range of concentrations. Interestingly, $1,25(OH)_2D_3$ prevented apoptosis in HeLa cells transfected with the
25 VDR or RXR, but not the ERs or the AR. Identical results were obtained using dexamethasone to induce apoptosis.

As in the experiments with the primary cultures of osteoblastic cells, either ICI 182,780 or flutamide abrogated the effect of E_2 or DHT in HeLa cells, irrespective of whether the HeLa cells were transfected with the $ER\alpha$ or the AR (data not shown).
30 These results clearly establish the requirement of the ER (α or β) or AR for the anti-apoptotic effects of estrogen. Moreover, the data suggests that the receptors responsible for nongentropic effects of sex steroids are indeed the classical receptor proteins, i.e. the ones that mediate the reproductive functions of estrogen or androgen, rather than alternative proteins. More important, these findings indicate that some

WO 01/96605

PCT/US01/18950

actions of the classical ERs and AR are sex non-specific. Transcriptional regulation of the ER by androgen and the AR by estrogen have been noted recently in breast cancer cells (Maggiolini, M. et al. (1999) Cancer Res 59:4864-4869,), but this phenomenon could be explained by the expression of specific receptor coactivators in some cells (Yeh, S. et al. (1998) Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A. 95:5527-5532,). The results presented herein represent the first demonstration that a non-transcriptional action of the classical ERs and AR is sex non-specific. Sex non-specific signaling by estrogen or androgen through the ER or the AR appears to account for the efficacy of either class of sex steroids in the adult skeleton of females and males and the equivocal skeletal phenotype of ER or aromatase deletions or mutations in rodents and humans.

EXAMPLE 3

The anti-apoptotic activity of the ER α is located within the E (ligand binding) domain and requires extra-nuclear localization of the protein

Using the ER α as a prototype, whether the anti-apoptotic activity of the receptors for sex steroids require the same or different domains than those required for transcriptional activity was determined (Figure 3A). The effects of several mutants of the ER α on prevention of apoptosis were compared. Some of these mutants have been described previously and have been shown to produce the expected proteins when transiently transfected into human cells, such as the HeLa cells used in the present study (Schodin, D.J. et al. (1995) J Biol. Chem. 270, 31163-31171; Kraus, W.L. et al. (1997) J Steroid Biochem. Mol. Biol. 63, 175-188.; Ekena, K. et al. (1996) J Biol. Chem. 271, 20053-20059; Ekena, K., et al. (1997) J Biol. Chem. 272, 5069-5075; Montano et al., (1995) Mol. Endocrinol. 9, 814-825). In experiments not shown, it was established that the mutants comprising the DE or E domains also produced the expected proteins and lacked transcriptional activity.

Like ER α , mutant $\Delta A/B$ which lacks the entire N-terminal transcription activation function (AF-1) domain, or a mutant in which serines 104, 106, and 118 were substituted with alanine (S104,106,118A), or a mutant ΔF , which lacks the entire F domain of the carboxy terminus, or mutant ΔDBD which lacks part of the DNA binding domain (amino acids 185-251), were able to convey the anti-apoptotic signal of the E₂-bound ER. Yet, all these mutants exhibit reduced or no ERE-mediated gene transcriptional activity (Montano, M.M. and Katzenellenbogen, B.S. (1997) Proc Natl.

WO 01/96605

PCT/US01/18950

Acad. Sci. U. S. A. 94, 2581-2586; Le Goff, P. et al. (1994) J Biol. Chem. 269, 4458-4466; McInerney, E.M. and Katzenellenbogen, B.S. (1996) J Biol. Chem. 271, 24172-24178; Montano et al., (1995) Mol. Endocrinol. 9, 814-825). More striking, the ability of the ligand to convey the anti-apoptotic signal was preserved in a deletion mutant which is missing the entire AF-1 and DNA binding domain (DE); as well as in a deletion mutant consisting solely of the AF-2/ligand binding domain (E). In contrast, the ER mutant L525A which lacks hormone binding ability (Ekena et al., (1997) J Biol. Chem. 272, 5069-5075) and the mutant S554fs which is deficient in the C-terminal transcription activation function (AF-2) (Schodin et al. (1995) J Biol. Chem. 270, 31163-31171; Ince et al. (1993) J. Biol. Chem. 268, 14026-14032; Wrenn and Katzenellenbogen (1993) J Biol. Chem. 268, 24089-24098), lost the ability to convey both the anti-apoptotic signal and the transcriptional activity of the protein (Ekena, K. et al. (1996) J Biol. Chem. 271, 20053-20059; Schodin et al., (1995) J Biol. Chem. 270, 31163-31171). These results indicate that the "anti-apoptotic" domain of the ER resides within the ligand binding region (domain E) of the protein and its anti-apoptotic activity may not require phosphorylation of certain N-terminal A/B domain sites important for the transcriptional activity of the ER.

Next whether the anti-apoptotic activity of the E domain was dependent on its localization to a particular subcellular compartment was determined (**Figure 3B**). The E domain was targeted either to the plasma membrane or to the nucleus of HeLa cells, by fusing it to enhanced cyan fluorescent protein containing plasma membrane or nuclear localization sequences, respectively. As revealed by epifluorescence microscopy, the non-targeted ER α and the non-targeted E exhibited similar distribution of cyan fluorescence in the nucleus of the cytoplasm, indicating that elimination of all but the ligand binding domain of the ER does not alter the subcellular distribution of the protein. However, incorporation of the appropriate targeting sequence accomplished the expected subcellular localization of the membrane or the nuclear ECFP fusion proteins, respectively, as can be seen by comparing and contrasting the distribution of cyan and red fluorescence in the same cell(s). Targeting the E domain predominantly to the plasma membrane did not alter its ability to convey the ligand-induced anti-apoptotic signal, as evidenced by identical anti-apoptotic activity of this fusion protein to that of the E domain or the full length ER α . But in sharp contrast, targeting the E domain exclusively to the cell nucleus resulted in complete loss of its anti-apoptotic activity.

WO 01/96605

PCT/US01/18950

EXAMPLE 4

The anti-apoptotic activity of the ER and R is mediated via a Src/Shc/ERK signaling pathway

5 E₂ or DHT rapidly and transiently increased the phosphorylation of ERKs in MLO-Y4 cells, with a maximal effect seen at 5 min and a return to baseline by 15 min (Figure 4A). Identical results were reproduced using the murine calvaria osteoblastic cells (not shown). The induction of ERK phosphorylation by E₂ or DHT was blocked by the specific inhibitors of the phosphorylation of ERKs, PD9809 and UO 126 (not shown); as well as the Src family tyrosine kinase inhibitor PP1. Moreover, both PD98059 and PP1 completely abrogated the anti-apoptotic effect of E₂ and DHT, indicating that ERK phosphorylation and Src kinase activity are required for the anti-apoptotic effects of both sex steroids. Confirmatory evidence for the essential role of Src kinase in the anti-apoptotic effects of sex steroid was provided by the finding ER- and AR- expressing embryonic fibroblasts derived from Src^{-/-} mice that also lack yes and Fyn (Sorinao et al. (1991) Cell 64:693-702), unlike the Src^{+/+} wild type controls, were unresponsive to the anti-apoptotic effect of E₂ or DHT (Figure 4B).

The co-dependency of the anti-apoptotic effect of E₂ and DHT on the sex steroid receptors (either the ER or AR) as well as on the activation of Src/ERK signaling pathway was demonstrated in HeLa cells (Figures 4C and D). PD98059 or co-transfection of a dominant negative (dn) MEK, a kinase responsible for the phosphorylation of ERKs, abrogated the effects of E₂ or DHT in HeLa cells transfected with ER α or AR (Figure 4C). Likewise, the effect of E₂ or DHT was abrogated in HeLa cells transfected with the ER α or AR and co-transfected with a Src mutant lacking the kinase activity (Src K) (Figure 4D). More strikingly, a Src mutant lacking the SH2 domain (Src ASH2) abrogated the anti-apoptotic activity of ligand-activated ER α but not that of the AR. Conversely, a Src mutant lacking the SH3 domain (Src ASH3) abrogated the anti-apoptotic activity of the AR but not of the ER. Likewise, the anti-apoptotic activity of the E₂ or DHT activated ER α was abrogated by dominant negative Shc mutants in which all three, or only the third of the three tyrosines (Y239, Y240, and Y317) which are the primary sites of Shc phosphorylation were substituted by phenylalanine. However, when tyrosines 239 and 240, but not 317, were mutated the anti-apoptotic activity of the receptor was unaffected (Figure 4E).

WO 01/96605

PCT/US01/18950

Consistent with the evidence that the E domain of the ER is sufficient for its anti-apoptotic activity (**Figure 3**), in HeLa cells transfected with this domain, PD098059, the dn MEK, the Src K; Src ASH2 or Src ASH3 had exactly the same effects as they did in HeLa cells transfected with the full length ER α (**Figure 4C and D**).

EXAMPLE 5

Dissociation of the transcriptional from the anti-apoptotic activity of the ER α using peptide antagonists

McDonnell and co-workers have previously isolated several classes of small (11-19 amino acid) peptides that bind distal site of the ligand-activated ER, and can selectively block ER α but not ER β -mediated transcription, and vice versa, when tested on a consensus ERE (estrogen response element) (Norris et al. (1999) Science 285:744-746; Chang et al. (1999) Mol. Cell Biol. 19:8226-8239). The ability of these peptides to block the anti-apoptotic effects of E₂ was examined (**Figure 5**). In parallel experiments, the ability of these peptides to block transcription was examined using HeLa cells transfected with an ERE driven luciferase construct (ERE-Luc) or an IL-6 promoter-driven luciferase (IL-6-Luc). The peptide designated α II, having sequence SSLTSRDFGSWYASR (SEQ ID NO.: 1) which binds to the ligand binding domain ER α , blocked the E₂-induced increase in ERE-Luc transcription (**Figure 5A**). Likewise, the peptide blocked an E₂-induced decrease in the transcription of IL-6- a paradigm of transcriptional regulation mediated via protein-protein interaction between the ER and other transcription factors. Nonetheless, the α II peptide did not influence the anti-apoptotic effect of E₂. Identical results were obtained in experiments using HEK293, instead of HeLa cells (not shown).

An ER β - specific peptide (293), and a peptide which interacts with both the ER α and ER β (F6) (**Figure 5B**) were investigated. For these experiments, HeLa cells were transfected with the ERE- or IL-6 luciferase constructs and either the ER α or the ER β . 293 blocked the effect of E₂ on transcription from both the ERE and the IL-6 promoters in the ER β carrying cells, but not in the ER α carrying cells. F6, on the other hand, blocked the effect of E₂ on transcription from ERE or IL-6 in both ER α and ER β carrying cells. More importantly, unlike α II, which did not affect the anti-apoptotic activity of ER α (and as expected of ER β , as α II is specific for ER α), 293 did

WO 01/96605

PCT/US01/18950

block the anti-apoptotic activity of the ER β , but it did not have an effect on the anti-apoptotic activity of the ER α . F6 blocked the anti-apoptotic activity of both ER α and ER β , as well as transcription from ERE and IL-6. These results confirm the evidence that each peptide binds to and blocks different sites of the AF-2 binding pocket (Norris, J.D. et al. (1999) *Science* 285:744-746; Chang, C. et al. (1999) *Mol. Cell Biol.* 19:8226-8239). Moreover, the data also indicates that blocking the site to which α II binds, and only this site, does not affect the "anti-apoptotic" activity, even though it effectively blockades the transcriptional activity of the ER α . The demonstration of the specificity of these peptides in blocking transcriptional or/and anti-apoptotic activity from the ER α or ER β supports the contention that the anti-apoptotic activity of the ligand activated receptor depends on a distinct site of the region of the receptor protein, which has been conveniently termed "anti-apoptotic" domain.

The transcriptional activity of the ER is dramatically influenced by its interaction with specific co-activators, most of which contain the conserved LXXLL motif termed the nuclear receptor box (McKenna et al. (1999) *Endocr. Rev.* 20, 321-344). Peptide GRIP prevents the interaction of the ER with GRIP-1, one of these co-activators (Chang, C. et al. (1999) *Mol. Cell Biol.* 19:8226-8239). The GRIP peptide contains the center three copies of the LXXLL motifs from the co-activator GRIP-1. The nucleotide sequence for that region is:

```

20 CAC AGCCGGCTGC ATGACAGCAA AGGGCAGACC AAACCTCTGC
   AGCTGCTGAC CACCAAGTCC GACCAGATGG AGCCTTCACC
   CTTGCCCAGC TCCTTGTCGG ACACAAACAA GGACTCAACA
   GGGAGCTTGC CTGGGCCTGG GTCCACGCAT GGCACCTCGC
   TCAAGGAGAA GCATAAGATT TTGCACAGAC TCTTACAGGA
25 CAGCAGTTCC CCTGTGGACT TGGCCAAGCT GACAGCAGAA
   GCCACAGGCA AAGAGCTGAG CCAGGAGTCC AGCAGCACAG
   CTCTGGGTC GGAAGTGA CTCAACAGG AGCCAGCGAG
   CCCCAGAAG AAAGAGAATG CACTACTGCG CTATTGCTC
   GACAAAGATG ATACTAAAGA TATTGTTTA CCGGAA (SEQ ID NO.: 17).

```

30 When this peptide was co-transfected with ER α into HeLa cells, it did not influence the anti-apoptotic activity of the ER (**Figure 5C**), arguing further that the anti-apoptotic activity of the ligand-activated receptor is independent of the function of this protein as a nuclear transcription factor.

WO 01/96605

PCT/US01/18950

EXAMPLE 6

The transcriptional activity of the ER α can be dissociated from its nongenotropic activity with synthetic ligands.

5 A comparison of the effects of various ligands on the transcription of the C3 gene, which contains an ERE in its promoter and is regulated by estrogen in a classical manner, with their anti-apoptotic effect on primary calvaria cells was conducted. As depicted in **Figure 6A**, an estren was found that had no transcriptional activity, exhibited potent anti-apoptotic efficacy. On the other hand, a pyrazole with potent transcriptional activity, had minimal anti-apoptotic efficacy. The relative anti-
10 apoptotic potency of these two compounds correlated with their ability to induce ERK phosphorylation (**Figure 6B**).

EXAMPLE 7

Transgenic animals using the peptide F6 as the transgene.

15

To dissect *in vivo* the relative contribution of the actions of the ERs versus the actions of the AR to the bone protective effects of estrogen or androgen can be accomplished by comparing osteoblastogenesis and osteoclastogenesis, osteoblast and osteoclast apoptosis, bone mass and bone strength in wild type ovariectomized mice and mice carrying a tetracycline-inducible transgene encoding the ERs-peptide
20 antagonist 2XF6. Estrogen can exert anti-apoptotic effects as effectively and with identical potency through the ER α or ER β or AR. Additionally, the ER α or ER β -mediated effects can be blocked using the selective ER peptide antagonist 2XF6 (**Fig. 5B**). The activity of estrogen or androgen through the AR can be retained while
25 simultaneously blocking the activity of these steroids through ER α and ER β by using 2XF6 as the transgene. Developmental problems like the ones that are most likely confounding the results of the ERKO mice, can be avoided by placing the transgene under the control of the TET ON system driven by the actin promoter and as described in Gossen, M., et al. (1993) Trends.Biochem.Sci. 18:471-475, and Gossen,
30 M. et al. (1995) Science 268:1766-1769.

The reverse tetracycline repressor (*rTetR* or TET-ON) system takes advantage of the high specificity of the TetR-operator-Tc interaction, the herpes simplex virus (HSV)-VP16 transcription activation domain, and the tetracycline (Tc). In the

WO 01/96605

PCT/US01/18950

convention (TET-OFF) system, the Tc-controlled transactivator (tTA, a fusion between *TetR* and the activating domain of the VP16 protein) stimulated the gene expression, as has been shown with reporter assays in HeLa cells. The efficiency of stimulation was proven by a 10^5 -fold increase in the reporter gene expression levels.

5 Tc can prevent tTA from binding to *tet* operators (*tetO*) upstream of a minimal promoter, and consequently turns off tTA-dependent expression. However, the TET-ON system utilizes a rtTA transactivator that has been modified such as Tc, or its derivative Doxycycline (Dox) induces rather than abolishes binding of VP16 to the operator. The TET-ON system circumvents any potential toxic effects that may be

10 conferred to eukaryotic cells following prolonged exposure to tetracycline.

Two constructs are introduced into the same mouse for Dox-induced expression of the peptides. In the first construct, the gene encoding rtTA (composed of *rTETR* and VP16 activation domain) is placed under the control of the actin promoter for ubiquitous expression. This promoter has been successfully used to

15 direct ubiquitous expression of the human placental alkaline phosphatase gene in transgenic mice (DePrimo, S.E. et al. (1996) Transgenic.Res. 5:459-466). A human Growth Hormone (hGH) first intronic region with its nuclear localization signal (NLS) and polyadenylation site (polyA) is cloned downstream of the actin-rtTA construct to confer transcript stability and optimal protein expression levels. In the

20 second construct, a tetracycline response element (TRE) that carries the *tetO* sequences and a minimal promoter, is placed upstream of a GAL4DBD2XF6-hGh-poly (a) cassette.

Two copies of the 2XF6 peptide are used in the GAL4 DNA binding domain-2XF6 peptide fusion because they are more efficient than just a single copy in

25 suppressing both the transcriptional and anti-apoptotic activity of the ERs. Transgenic mice carrying the co-integrated constructs are grown to adulthood and then treated with Dox in the drinking water. In the absence of Doxycycline (DOX) the transactivator in the first construct is blocked from binding to the *tetO* sequences. Once Doxycycline is added the transactivator will recognize its target *tetO* sequences

30 in the TRE and under the control of the actin promoter will drive transcriptional activation of the peptide sequences.

WO 01/96605

PCT/US01/18950

Generation of DNA constructs for microinjection:

The actin-rtTA- poly (A) and TREGAL4DBD2XF6-hGH-poly(A) DNA constructs are generated following standard subcloning techniques. Each one of the two constructs requires multiple steps of cloning. Every step of the final constructs is verified with sequence analysis and their function established in transient transfectants of HeLa cells by monitoring their ability to block the activity of both ERs in response to Dox treatment.

Generation and identification of transgenic mice:

The actin-rtTA- poly (A) and TREGAL4DBD2XF6-hGH-poly (A) DNA constructs are excised from their respective vectors and are microinjected into fertilized mouse eggs. Eggs are allowed to reach the two-cell stage and reimplanted into the oviducts of pseudopregnant foster mice. The derived litters are screened by tail DNA PCR for co-integration of the actin-rtTA-poly(A) and the TREGAL4DBD2XF6-hGH-poly(A) transgenes. To investigate whether the two DNA cassettes have integrated in the same or similar location of the host genome, founders are mated with C57BL6 mice and the offspring screened for transgene transmission. Transgenic litter positive for both constructs, after tail DNA screening with PCR as described above, is selected for further characterization. The DNA sequence integrity of each integrated transgene is confirmed by Southern blot analysis of tail genotrophic DNA and hybridization against probes homologous to the 5' or the 3' end of each transgene.

Characterization of transgene expression in mice:

Identified transgenic animals (referred to as Tet-F6) are characterized in terms of their ability to switch on F6 peptide expression in response to Dox. Dual transgenic litter is maintained on normal water or water supplemented with 0.5 mg/ml Dpox., as it has been reported in the literature (Ray, P. et al. (1997) J Clin. Invest. 100:2501-2511), for varying periods of time. This approach evaluates the minimum amount of time required for the mice to be treated with Dox in order to inducibly express the F6 peptide. Mice are sacrificed before and at 2,4,6 days after the addition of Dox and tissues harvested. Total mRNA is extracted from calvaria, femur, vertebrae, uterus, mammary gland, and a number of soft tissues such as liver, lung, kidney, spleen, brain and F6 peptide expression are evaluated with Northern

WO 01/96605

PCT/US01/18950

blot analysis. The same approach is followed to confirm that removal of Dox from the drinking water of the double transgenic animals results in cessation of peptide production.

5 Evaluation of the ability of the peptides to block estrogen-induced transcription:

Double transgenic mice are crossed with ERE-lacZ transgenic mice. When the triple transgenic litter reaches adulthood Dox is added to the drinking water to induce and maintain peptide expression for at least 48 hours. To confirm that ER-mediated transcription has been blocked, animals are sacrificed following 24 hours
10 treatment with 20 ng/g body weight of E₂ and LacZ activity are measured in the uterus, mammary gland, femur and vertebrae. Once peptide expression and blockade of ER transcription in the ERE-lacZ transgenic mice is confirmed, direct confirmation of the blocked is determined using WT mice and Tet-F6 mice induced to express F6 in adulthood for at least 28 days in either sham operated or
15 ovariectomized mice. After surgery all groups are treated with E₂ for 28 days at doses of 20 ng/g body weight. Following the 28 day treatment period, mice are sacrificed and uteri and uteri and mammary glands isolated. Total RNA is extracted from these tissues and screened for the expression of lactoferrin, a gene that is transcriptionally regulated by estrogen via classical ERE binding. It is known that in
20 WT mice, lactoferrin mRNA increases approximately 5-fold in the uterus, under these same experimental conditions. The functional efficacy of the ER peptide antagonist is established directly by the lack of lactoferrin expression in the Tet-F6 animals, but not in the ovariectomized WT controls receiving estradiol.

25 Analysis of the Skeletal Phenotype

The transgene is turned on for a period of 4-6 weeks in female Tet-F6 mice four month of age treated with either E₂ (20ng/g body weight) or DHT (20ng/g body weight) or vehicle. The skeletal phenotype of vehicle-or steroid-treated Tet-F6 mice is compared to that of wild type animals ovariectomized at four months of age and
30 maintained for another 4-6 weeks post-ovariectomy without or with E₂ or DHT treatment. Tet-F6 and wild type animals are assessed for bone mass by *in vivo* DEXA analysis at weekly intervals following the turning on of the transgene or the ovariectomy. At the end of the 4-6 week period, both groups of animals are sacrificed and the following determinations made: a) whole body and uterine and

WO 01/96605

PCT/US01/18950

mammary gland weights, b) length of the long bones and the width between the periosteal and endosteal bone, c) osteoblastogenesis and osteoclastogenesis *ex vivo* cultures of bone marrow cells, d) prevalence of osteoblast/osteocyte and osteoclast apoptosis in sections of vertebrae, e) rate of bone formation and resorption by dynamic histomorphometry and f) compression strength of the vertebrae. An intraperitoneal injection of 30ng/ g body weight of oxytetracycline-hydrochloride is administered 8 days and 2 days before sacrificing the animals for the dynamic histomorphometry analysis. It is important to note that the TET ON system is 100-1000 fold less sensitive to tetracycline than it is to doxycycline. In addition, it is established that administration of doxycycline (0.5 mg/ml in drinking water) has no effect on bone remodeling and does not interfere with visualization of tetracycline labels formed in cancellous bone after injection (s.c) of 0.5 mg tetracycline. Therefore, this maneuver should not influence the expression of the transgene, which at this stage will have been turned on with doxycycline.

15

EXAMPLE 8

Transgenic animals using α II and 293 as transgenes.

Transgenic mice carrying a tetracycline-inducible transgene encoding two ER peptide antagonists, α II + 2X293 (from here onward referred to as Tet-peptides) can be generated using similar methods. Using α II + 2X293 as the transgenes nongentropic activity through the ER α can be retained but transcriptional activity through both ER α and ER β and the nongentropic activity of ER β can be blocked. The 293 peptide blocks the transcriptional and non-transcriptional activity of ER β , but has no effect on either the transcriptional or non-transcriptional activity of ER α .

Two constructs are built and co-introduced into the same mouse for Dox-induced expression of the peptides (Figure 8). In the first construct, the gene encoding rtTA (composed of rTetR and VP16 activation domain) is placed under the control of the actin promoter for ubiquitous expression. A human Growth Hormone (hGH) first intronic region with its nuclear localization signal (NLS) and polyadenylation site (poly(A)) is cloned downstream of the actin-rtTA construct to confer transcript stability and optimal protein expression levels. In the second construct, a tetracycline response element (TRE) that carries the *tetO* sequences and a minimal promoter, is placed upstream of a GAL4DBD α II-IRES-GFP2X293-hGh-poly(A) cassette. In this cassette, the GAL4 DNA binding domain- α II peptide fusion will be linked with an

WO 01/96605

PCT/US01/18950

internal ribosome entry site (IRES, which permits the translation of two open reading frames from one mRNA) to two copies of the 293 peptide that will be fused to the green fluorescent protein gene (GFP).

The reason for using two copies of the 293 peptide is that preliminary experiments have indicated that they are more efficient than just a single copy in suppressing both the transcriptional and anti-apoptotic activity of the ER β . Each of the α II and 2X293 peptides are fused to a different protein instead of the same GAL4DBD to avoid the possibility of recombination events occurring between the two identical GAL4DBD regions. Furthermore, the GFP is incorporated in the GAL4DBD α II-IRES-GFP2X293-hGh-poly(A) cassette to provide an easy means of screening for peptide expression. Transgenic mice carrying the co-integrated constructs are grown to adulthood and then treated with Dox in the drinking water. In the absence of Dox the transactivator in the first construct is blocked from binding to the *tetO* sequences. Once Dox is added, the transactivator can recognize its target *tetO* sequences in the TRE and, under the control of the actin promoter, will drive transcriptional activation of the peptide sequences.

Generation of DNA Constructs for Microinjection: The actin-rtTA- poly(A) and TRE-GAL4DBD α II-IRES-GFP2X293-hGh-poly(A) DNA constructs are generated following standard subcloning techniques. The integrity of the final constructs are verified with sequence analysis and function will be established in transient transfectants of HeLa cells by monitoring its ability to block the transcriptional activity of both ER α and ER β and the anti-apoptotic activity of ER β .

Generation and Identification of Transgenic Mice: The actin-rtTA- poly(A) and TRE-GAL4DBD α II-IRES-GFP2X293-hGh-poly(A) DNA constructs are excised from their respective vectors and microinjected into fertilized mouse eggs. Eggs are allowed to reach the two-cell stage and are re-implanted into the oviducts of pseudopregnant foster mice. Tail DNA is screened by PCR for co-integration of the actin-rtTA-poly(A) and the TRE-GAL4DBD α II-IRES-GFP2X293-hGh-poly(A) transgenes. To investigate whether the two DNA cassettes have integrated in the same or a similar location of the host genome, founders are mated with C57BL/6 mice and the offspring will be screened for transgene transmission. Transgenic litter that will

WO 01/96605

PCT/US01/18950

prove positive for both constructs, after tail DNA screening with PCR as described above, are selected for further characterization. The DNA sequence integrity of each integrated transgene is confirmed by Southern blot analysis of tail genotyped DNA and hybridization against probes homologous to the 5' or the 3' end of each transgene.

Characterization of Transgene Expression in Mice: Identified transgenic animals are characterized in terms of their ability to switch on α II and 293 peptide expression in response to Dox. Dual transgenic litters are maintained on normal water or water supplemented with 0.5 mg/ml Dox, for varying periods of time. This approach evaluates the minimum amount of time that is required for the mice to be treated with Dox in order to induce expression of the α II and 293 peptides. Mice are sacrificed before and at 2, 4, and 6 days after the addition of Dox, and tissues are harvested. Total mRNA is extracted from calvaria, femur, vertebrae, uterus, mammary gland, and a number of soft tissues such as liver, lung, kidney, spleen, brain, and α II and 293 peptide expression is evaluated with Northern blot analysis. The same approach will be followed in order to confirm that removal of Dox from the drinking water of the double transgenic animals will result in cessation of peptide production.

Evaluation of the Ability of the Peptides to Block Estrogen-Induced Transcription: To determine the selective inhibition of estrogenic transcriptional activity in the Tet peptide animals, two approaches are followed. First, double transgenic mice are crossed with ERE-lacZ transgenic. When the triple transgenic litter reach adulthood, Dox is added to the drinking water to induce and maintain peptide expression for at least 48 hours. To confirm that ER-mediated transcription has been blocked, animals are sacrificed following 24 hours treatment with 20 ng/g body weight of E₂, and lacZ activity is measured in the uterus, mammary gland, femur and vertebrae. For direct confirmation of the blockade of ER-mediated transcription. WT mice and Tet-peptides mice induced to express the peptides in adulthood for at least 28 days are either sham-operated or ovariectomized. After surgery, all groups are treated with E₂ for 28 days at doses of 20 ng/g body weight. Following the 28-day treatment period, mice are sacrificed and uteri and mammary glands is isolated. Total RNA is extracted from these tissues and screened for the expression of lactoferrin, a gene that is

WO 01/96605

PCT/US01/18950

transcriptionally regulated by estrogens via classical ERE binding. Lack of lactoferrin expression in the Tet-peptides animals, but not in the ovariectomized WT controls receiving estradiol, establishes directly the functional efficacy of the ER peptide antagonists.

5

Analysis of the Skeletal Phenotype: Once the Tet-peptides mice are established and characterized as described above, females are grown to 4 months of age. At this time, the transgene is turned on for a period of 4-6 weeks and the skeletal phenotype will be compared with wild type animals ovariectomized at 4 months of age and maintained for another 4-6 weeks post-ovariectomy. At weekly intervals following the turning on of the transgene or the ovariectomy of the wild type mice, both animals are assessed for bone mass by *in vivo* DEXA analysis. The animals are sacrificed when the percent change in spinal BMD is at least -3% for the ovariectomized wild type group, or 6 weeks, whichever comes first. This difference requires 8 animals per group to exceed 80% power. At the end of the 4-6 week period, both groups of animals are sacrificed and the following determinations are made: a) whole body and uterine and mammary gland weights, b) length of the long bones and the width between the periosteal and endosteal bone, c) osteoblastogenesis and osteoclastogenesis in *ex vivo* cultures of bone marrow cells, d) prevalence of osteoblast/osteocyte and osteoclast apoptosis in sections of vertebrae, e) rate of bone formation and resorption by dynamic histomorphometry and f) compression strength of the vertebrae. An intraperitoneal injection of 30 $\mu\text{g/g}$ body weight of oxytetracycline-HCl is administered 8 days and 2 days before sacrificing the animals for the dynamic histomorphometry analysis. It is important to note that the TET ON system is 100-1000 fold less sensitive to tetracycline than it is to Dox. In addition, administration of Dox (0.5 mg/ml in drinking water) has no effect on bone remodeling and does not interfere with visualization of tetracycline labels formed in cancellous bone after injection (s.c) of 0.5 mg tetracycline.

30

WO 01/96605

PCT/US01/18950

EXAMPLE 9

Transgenic animals with inducibly inactivated sex steroid receptors.

A true and informative model of postmenopausal or postcastration requires
 5 deleting each one of the sex steroid receptors, both in a cell specific manner
 (osteoblasts, osteoclasts and both) as well as ubiquitously. The Cre/loxP binary
 recombination system of bacteriophage P1 has been shown to efficiently mediate
 loxP site-specific recombination in both ES cells (Zou, Y.R. et al. (1994) Curr.Biol.
 4:1099-1103; Gu, H. et al. (1993) Cell 73:1155-1164) and transgenic mice (Lakso, M.
 10 et al. (1992) Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A. 89:6232-6236; Orban, P.C. et al. (1992) Proc
 Natl.Acad.Sci.U.S.A. 89:6861-6865).

Generation of DNA Constructs for Microinjection

Conditional expression is achieved with the reverse tetracycline repressor
 15 (rtTetR or TET-ON) system. In the first construct, the gene encoding rtTA was placed
 under the control of the osteocalcin (OG-2) promoter for osteoblast-specific
 expression. A human Growth Hormone (hGH) first intronic region with its nuclear
 localization signal (NLS) and polyadenylation site (poly(A)) was cloned downstream
 of the OG-2-rtTA construct to confer transcript stability and optimal protein
 20 expression levels. In the second construct, a tetracycline response element (TRE) was
 placed upstream of a Cre-hGh-poly(A) cassette. Each one of the two constructs
 required multiple steps of cloning (**Figure 9A**). Every step was checked with
 appropriate restriction enzyme digestions and PCR reactions and the final constructs
 were sequenced. Furthermore, the specificity and efficiency of the Dox-induced Cre
 25 expression, was confirmed in an *in vitro* system using the Ob-6 osteoblastic cell line.
 These cells have been characterized in and were found to express osteocalcin and to
 express both the ER α and the ER β . Ob-6 cells were transiently transfected with either
 the OG-2-rtTA-poly(A) and TRE-Cre-hGh-poly(A) constructs or the empty vectors
 and treated them with 1.5 μ g/ml Dox or with vehicle for 48 hours. Cells were
 30 harvested and used to extract total RNA. Semiquantitative RT-PCR analysis using
 Cre-specific primers indicated specific expression of Cre only in cell populations that
 had been treated with Dox (**Figure 9B**).

WO 01/96605

PCT/US01/18950

Generation and Identification of Transgenic Mice:

The OG-2-rtTA- poly(A) and TRE-Cre-hGh-poly(A) DNA constructs were exercised from their respective vectors with the appropriate restriction endonucleases and were microinjected into the pronuclei of fertilized C57Bl/6 mouse eggs. Eggs are allowed to reach the two-cell state and are reimplanted into the oviducts of pseudopregnant foster mice. Founders are identified by screening them for co-integration of the OG-2-rtTA and TRE-Cre transgenes. Mice transgenic for both the OG-2-rtTA and the TRE-Cre constructs (from here onwards referred to as Tet-OG2-Cre) are identified by PCR analysis of tail DNA with two sets of primers each of which has been designed to amplify part of the OG-2-rt-TA and the Cre DNA sequences. To investigate whether the two DNA cassettes have integrated in the same site of the mouse genome, founders are mated with C57Bl/6 mice and the offspring are screened for transgene transmission. Transgenic litter positive for both constructs, after tail DNA screening with PCR as described above, are selected for further characterization. The DNA sequence integrity of each integrated transgene is confirmed by Southern blot analysis of tail genotrophic DNA and hybridization against probes homologous to the 5' or the 3' end of each transgene.

Functional Characterization of the Transgene

Identified transgenic animals are characterized in terms of their ability to switch on Cre expression in response to Dox. The dual transgenic litter is maintained on normal water or water supplemented with 0.5 mg/ml Dox, as it has been reported in the literature (Ray, P. et al. (1997) J Clin. Invest. 100:2501-2511), for varying periods of time. This approach evaluates the minimum required amount of time that is required for the mice to be treated with Dox. In order to confirm inducible expression of Cre, mice are sacrificed before and at 2, 4, 6 days after the addition of Dox and tissues are harvested. Total mRNA is extracted from calvaria, femur, vertebrae, uterus, mammary gland, and a number of soft tissues such as liver, lung, kidney, spleen, and brain and Cre expression is evaluated with Northern blot analysis. The same approach is followed in order to confirm that removal of Dox from the drinking water of the double transgenic animals results in cessation of Cre production.

To monitor Cre-mediated recombination Tet-OG2-Cre mice are crossed with the ROSA26 reporter mouse (Mao, X. et al. (1999) Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A.

WO 01/96605

PCT/US01/18950

96:5037-5042) that is now available from Jackson Laboratories. In these mice, a floxed stopper fragment and the β -galactosidase-neomycin phosphotransferase fusion gene (β geo) have been integrated into the ROSA26 locus. After Cre-mediated excision of the stopper fragment, expression of β geo is driven by exon 1 of the ROSA26 allele and is ubiquitous during embryonic development and adulthood. Interbreeding the ROSA26 mouse with the functional Tet-OG2-Cre transgenic lines result in β -galactosidase expression in osteoblastic cells. Tissues such as calvaria, femur, and vertebrae are stained for β -galactosidase expression. A similar approach has been used to evaluate T-cell specific expression (Mao, X. et al. (1999) Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A. 96:5037-5042).

A mutant mouse strain which carries the floxed exon 3 of ER α

The second mouse strain (Ind- α ERKO) carries exon 3 (653 - 845bp) which contains 96 kb of the 0.249 Kb mouse ER α DNA binding domain (740-989 bp) (White, R., et al. (1987) Mol.Endocrinol. 1:735-744) flanked by two loxP sites, each of which consists of a series of 34 bp of tandem repeats that are recognized by the Cre recombinase. Any DNA region flanked by two loxP sites (floxed) with the same orientation are excised following action of the Cre recombinase. Inactivation of ER α by deleting the DNA binding sequences and the weak dimerization domain that are contained in exon 3 abolishes the transcriptional activity of the receptor. Moreover, exon 3 contains several potential acceptor sequences that could result in the generation of an alternative splicing variant in case a region upstream of exon 3 was chosen for elimination. Finally, Cre-mediated deletion of exon 3 disrupts the reading frame of downstream ER α DNA sequences and inactivates the anti-apoptotic or any remaining activity of the receptor that requires the dimerization, and/or ligand binding domains.

Generation of ER α Mutant Mice

A 86 Kb genotrophic locus containing exons 3 and 4 of the mouse ER α gene (Fig. 10), isolated from C57B1/6 mouse genotrophic library and subcloned into a BAC vector, has been kindly provided by Dr. Ken Korach (NIH). This genotrophic locus has been further characterized in terms of restriction mapping and sequence analysis and a HindIII/BamHI fragment containing exon 3 (0.2 Kb) flanked by a 5 kb left and a 3 kb right arm has been subcloned. The targeting construct is constructed in the

WO 01/96605

PCT/US01/18950

pEasy-Flox vector, which contains 3 loxP sites, 2 of which are flanking a neomycin resistance (neo¹) gene under the control of the cytomegalovirus (CMV) promoter, and a HSV-thymidine kinase (HSV-tk) cassette. Depicted in Fig. 10 is the two step strategy for generating and targeting the floxed exon 3 in ES cells *in vitro*. In the first step the targeting construct which carries the floxed HSV - neo¹ selection marker upstream of the left arm, floxed exon 3 and the right arm and a subsequent HSV-tk cassette, is electroporated into C57Bl/6 ES cells (obtained from Eurogentec, Belgium and tested positive by diploid aggregation and tetraploid aggregation for germline transmission) and introduced into the flanking regions of the target genotrophic locus through homologous recombination.

Transfected ES cells are grown on a single layer of mitomycin C and LIF-treated, neo-resistant mouse embryonic fibroblasts from Swiss/129/Balb/c mice (also obtained from Eurogentec). Electroporation and selection of positive ES clones with G418 and ganciclovir is performed according to established protocols (Robertson et al. (1986) Nature 323: 445-448). Homologous recombination of the targeted construct into G418-positive clones is confirmed with Southern blot analysis of genotrophic DNA. The frequency of homologous recombination has been reported to vary between 1 in 18 (Gu, H., Jet al. (1994) Science 265:103-106) and 1 in 50 (Pasparakis, M. et al. (1996) J Exp.Med. 184:1397-1411) double drug resistant colonies. In the second step, a plasmid carrying Cre under the control of the CMV promoter is electroporated in the genetically modified ES cells. Because the expression of Cre is transient, the recombination event occurs only once between two of the three loxP sites, generating three possible types of deletion. Type I deletion results in the deletion of the complete exon 3-loxP - HSV - neo¹ selection marker from the genome of ES cells and animals derived from the corresponding ES cells carry the floxed exon 3 in the germ line. Type III deletion is identified with Southern blot analysis. This approach has been described and successfully used for T-cell-specific deletion of the DNA polymerase β gene segment (Gu, H., Jet al. (1994) Science 265:103-106). Targeted ES cells are microinjected into BALB/C blastocysts. Male chimeras are mated to C57Bl/6 females. Germ line transmission in the progeny is confirmed by Southern blot analysis. Finally, the functional integrity of the floxed gene is determined using classical receptor binding studies, as well as transcription assays using cells isolated from classical target tissues such as the ovaries and the uterus.

WO 01/96605

PCT/US01/18950

To obtain osteoblast or osteoclast-specific inactivation of ER α , Ind- α ERKO mice are mated with the Tet-OG2-Cre transgenic mice or with TRAP-Cre transgenic mice. The derived offspring are grown to adulthood and, in the case of Tet-OG2-Cre, are then treated with Dox for a predetermined time period that allows for maximum
5 Cre expression. Mice are then sacrificed, and tissues including calvariae, femurs, vertebrae, uteri, mammary glands, lungs, livers, kidneys, and brains are harvested, and genotrophic DNA extracted. The efficiency of Cre-mediated cell specific deletion of exon 3 is evaluated by means of Southern blot analysis of the genotrophic DNA extracted from the different tissues. Demonstration of osteoblast-specific inactivation
10 of the ER α is accomplished by transfecting calvaria cells isolated from the ER α knockout mice with a multiple ERE-luciferase reporter construct. The specificity of ER α inactivation in osteoblastic, but not other cells, is established by performing the same study using, instead of calvaria osteoblasts, breast or uterine cells from the same mice. This approach has been successfully used previously by Ernst and colleagues to
15 demonstrate the presence of low levels of functional endogenous ERs in osteoblastic cells (Ernst, M., M.G. Parker, and G.A. Rodan. (1991) Mol. Endocrinol. 11:1597-1606). In these experiments, potential effects on ERE transcription through the ER β are eliminated by utilizing, instead of 17 β -E₂, the ER α -specific ligand Propyl Pyrazole Triol, a synthetic compound developed by Dr. John Katzenellenbogen, University of
20 Illinois, Urbana-Champaign. Propyl Pyrazole Triol is a structurally diverse ER ligand that is related to a group of compounds that have been reported by the Katzenellenbogen group (Sun, J., et al. (1999) Endocrinology 140:800-804). This compound has pronounced ER α -selective binding affinity (RBAs to 17 β -E₂ are 63 for ER α versus 0.095 for ER β) and high ER α transcriptional potency in transiently
25 transfected human endometrial cancer (HEC-1) cells but no ER β -mediated transcriptional activity even at the highest concentrations of treatment (personal communication). As an additional approach for demonstrating ER α inactivation in an osteoblast-specific manner in the knockout mouse, the knockout mouse is crossed with a ERE-lacZ reporter mouse. The derived litter and wild type animals are
30 ovariectomized to remove endogenous estrogens. A week following ovariectomy, either type of mice is treated with Propyl Pyrazole Triol for 24 hours. Following the 24-hour treatment period, mice are sacrificed and transcriptional activity of ER α or lack thereof, is assayed with β -galactosidase staining of uterine, breast and bone sections.

WO 01/96605

PCT/US01/18950

In addition to generating a mouse in which the ER α inactivation is targeted only to osteoblasts and osteoclasts, a different mouse in which ER α is inactivated in all cell types that express this gene is accomplished by crossing the Ind- α ERKO mice with an existing transgenic mouse that carries the Mx-Cre transgene (Kuhn, Ret al. 5 (1995) Science 269:1427-1429). In this mouse, the Cre recombinase is under the control of the Mx1 gene promoter. This gene is silent in healthy mice, but it is turned on upon viral infection. Experimentally, the activity of the Mx1 promoter can be stimulated to very high levels by administration of IFN- α or - β or a synthetic double-stranded RNA polyinosinic-polycytidylic acid (pI-pC), which is itself an IFN inducer, 10 in mice. Mice harboring both the floxed ER α and the Mx-Cre acquire an inactive mutation in ER α upon treatment with IFN or pI-pC.

EXAMPLE 10

Method for Screening for nongenotropic estrogen like signalling

15

Activators of nongenotropic estrogen like signalling which lack transcriptional activity are identified with a high throughput combination screening which simultaneously detects ERK activation using the SRE-SEAP detection system (positive readout) and C3 (complement 3) transcription (negative readout). To this 20 end, HeLa cells are stably transfected using retroviruses with the hER α and/or hAR, an SRE-SEAP as well as a C3-Luc plasmid. In another aspect of the invention, stable transfectants in which the hER α or hAR gene are conditionally expressed under the control of the TET-OFF (tetracycline – OFF) system.

The SRE-SEAP assay detects activation of the MAPK/JNK signalling 25 pathways by means of assaying transcription factor (Elk-1/SRF) – induced activation of a Serum Response Element (SRE) placed upstream of the herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-tk) promoter that drives the expression of secreted alkaline phosphatase (SEAP). This assay is commercially available. Kits for in vivo assays for MEK1 or MEKK1 kinases are also commercially available. In general, 24 hrs after 30 transfection serum - containing medium is replaced with medium that contains about 0.2% serum. Cells are culture for 24 hrs in about 0.2% serum and then assayed. Control samples are treated with vehicle alone.

Generally, HeLa cells are plated in 48-well plates at a concentration of 4-5 x 10⁴ per well and cultured overnight in phenol red-free MEM medium containing 10%

WO 01/96605

PCT/US01/18950

charcoal-stripped FBS (fetal bovine serum), antibiotics (penicillin and streptomycin) and glutamine. The medium is removed, cells are washed twice in PBS and overlaid with serum-free and antibiotic-free medium that contains a transfection mix (lipofectamine, Lipofectamine plus and up to 0.6 mg of total amount of DNA to be transfected). Cells are incubated with the transfection mix for 2-3 hours. The transfection mix is removed and replaced with fresh phenol red-free MEM medium containing 10% charcoal-stripped FBS antibiotics and glutamine, and the cells are left to recover for 24 hours. The 10% FBS -containing medium is replaced with fresh phenol red-free MEM medium containing 0.2% charcoal-stripped FBS antibiotics and glutamine. Cells are cultured in 0.2% FBS-containing medium for 24 hours. Cells are treated with steroids at the desired concentration for 24 hours. SRE-SEAP activity is measured in 50 ml of the 0.2% FBS-containing cell culture medium with the commercially supplied kit and according to the manufacturer's instructions. In the case of transient transfections, data are corrected for transfection efficiency by assaying Renilla-luciferase activity in cell lysates.

17 β -Estradiol is a positive compound control of ERK activation as well as C3 transcription. Pyrazole can be used as negative control of ERK activation and estren as a negative control of C3 transcription. Compounds with strong SRE-SEAP activity but weak or absent C3-Luc activity, compared to 17 β -Estradiol are selected. The selection criteria can include classifying compounds of interest based on the ratio of ERK activation over C3 transcription. Compounds of interest are screened further for osteoblast/osteocyte anti-apoptotic activity.

Additionally, novel ligands using combinatorial chemistry and 3-D modeling of the binding pocket of the ER can be synthesized.

One skilled in the art will readily appreciate that the present invention is well adapted to carry out the objects and obtain the ends and advantages mentioned, as well as those objects, ends and advantages inherent herein. The present examples, along with the methods, procedures, treatments, molecules, and specific compounds described herein are presently representative of preferred embodiments, are exemplary, and are not intended as limitations on the scope of the invention. Changes therein and other uses will occur to those skilled in the art which are encompassed within the spirit of the invention as defined by the scope of the claims.

WO 01/96605

PCT/US01/18950

WHAT IS CLAIMED IS:

1. Use of a compound to induce a selective effect of a receptor comprising contacting the receptor with a compound that induces a nongenotropic effect without substantially inducing a genotropic effect, wherein the receptor is selected from the group consisting of a progesterone receptor, a glucocorticoid receptor, a mineralcorticoid receptor, a retinoic acid receptor, vitamin D receptor, PPAR receptor, pregnane X receptor, bile acid receptor, thyroid receptor, farnesoid X receptor, liver X receptor, ecdysone receptor, and COUP-TF receptor.
2. The use of claim 1, wherein the nongenotropic effect occurs due to the interaction of the compound with the ligand binding domain of the receptor.
3. The use of claim 1, wherein the nongenotropic effect occurs due to the activation by the compound of a region of the receptor which is the functional equivalent of the ligand binding domain of the estrogen receptor.
4. The use of claim 1, wherein the genotropic effect is mediated by the DNA-binding domain of the receptor.
5. The use of a compound to induce a selective effect of a receptor comprising contacting the receptor with the compound that induces a genotropic effect without substantially inducing a nongenotropic effect.
6. The use of claim 5, wherein the receptor is selected from the group consisting of a progesterone receptor, a glucocorticoid receptor, a mineralcorticoid receptor, a retinoic acid receptor, vitamin D receptor, PPAR receptor, pregnane X receptor, bile acid receptor, thyroid receptor, farnesoid X receptor, liver X receptor, ecdysone receptor, and COUP-TF receptor.

WO 01/96605

PCT/US01/18950

7. The use of claim 5, wherein the genotropic effect is protein synthesis.
8. A method for screening a compound that will induce a selective nongenotropic effect of a steroid receptor comprising
- 5 assessing the ability of the compound to activate a pathway mediated by the ligand-binding domain of the steroid receptor without substantially activating the DNA-binding domain of the steroid receptor or to activate the DNA-binding domain of the steroid receptor without substantially activating functions mediated by the ligand-binding domain of the steroid receptor; and then
- 10 measuring the biological activity of the test compound to assess its ability to induce a target nongenotropic effect without substantially inducing a genotropic effect or its ability to induce a target genotropic effect without inducing a substantial nongenotropic effect.
- 15 9. The method of claim 8, wherein the steroid receptor is not the estrogen or progesterone receptor.
10. The method of claim 8, wherein the steroid receptor is selected from the group comprising a progesterone receptor, a glucocorticoid receptor, a mineralcorticoid
- 20 receptor, a retinoic acid receptor, vitamin D receptor, PPAR receptor, pregnane X receptor, bile acid receptor, thyroid receptor, farnesoid X receptor, liver X receptor, ecdysone receptor, and COUP-TF receptor.
11. The use of a compound to induce a selective effect of an estrogen receptor
- 25 comprising contacting the estrogen receptor with a compound that induces a nongenotropic effect other than those mediated by the activation of extracellular regulated kinase without substantially inducing a genotropic effect.
12. The use of a compound to induce a selective effect of an estrogen receptor
- 30 comprising contacting the estrogen receptor with a compound that induces a

WO 01/96605

PCT/US01/18950

nongenotropic effect for other than the treatment of bone loss or to increase bone mass without substantially inducing a genotropic effect.

13. The use of a compound to induce a selective effect of an androgen receptor comprising contacting the androgen receptor with said compound that induces a nongenotropic effect other than those mediated by the activation of extracellular regulated kinase without substantially inducing a genotropic effect.
14. The use of a compound to induce a selective effect of an androgen receptor comprising contacting the androgen receptor with a compound that induces a nongenotropic effect for other than the treatment of bone loss or to increase bone mass or for the treatment of an estrogen-related cancer or endometriosis without substantially inducing a genotropic effect.
15. The use of a compound to induce a nongenotropic effect of a steroid receptor, comprising administering a compound other than an estrogen or androgen containing a cyclopentanoperhydrophenanthrene nucleus which binds to the steroid receptor and induces a desired nongenotropic effect while not inducing a steroid-induced genotropic effect.
16. A method for screening a compound to select a compound that induces a selective steroidal response comprising:
- contacting a steroid receptor with a test compound;
 - determining whether a test compound activates the nongenotropic activity of a receptor;
 - determining the level of transcriptional activity of the receptor-test compound complex; and
 - selecting the compound that activates the nongenotropic activity of the receptor and induces transcriptional activity of the receptor less than 10% of endogenous steroid receptor ligands.

WO 01/96605

PCT/US01/18950

17. The method of claim 16, wherein the nongentropic activity is preventing apoptosis.
18. The method of claim 16, wherein the nongentropic activity is a signal
5 transduction pathway.
19. The method of claim 16, wherein the nongentropic activity is a second messenger system.
- 10 20. The method of claim 18, wherein the signal transduction pathway is a protein kinase signal transduction pathway.
21. The method of claim 20, wherein the protein kinase signal transduction pathway is a MAP kinase signal transduction pathway.
- 15 22. The method of claim 21, wherein the MAP kinase signal transduction pathway is the Src/Shc/extracellular regulated kinase signal transduction pathways.
23. A method of evaluating a compound comprising the steps of:
20 growing a tissue culture cell line until cell growth has reached appropriate confluence;
transfecting the tissue culture with an expression plasmid of a specific receptor and an expression plasmid for a target gene responsive to the selected receptor;
25 contacting the transfected cells with a test compound;
determining whether the compound induces a nongenotropic effect without substantially inducing a genotropic effect.
24. The method of claim 23, wherein the receptor is not an estrogen or
30 progesterone receptor.
25. The method of claim 23, wherein the target gene is selected from the group consisting of chloramphenicol acetyl transferase (CAT), β -galactosidase, alkaline phosphatase, luciferase, peptide hormones, growth factors and chimeric proteins.

WO 01/96605

PCT/US01/18950

26. The method of claim 23, wherein the level of transcription of the target gene is determined using a method selected from the group consisting of calorimetric, fluorescent, immunochemical, chemical or radiochemical methods.
- 5 27. A method for screening compounds for the treatment of steroid receptor related diseases or disorders comprising:
- contacting a cell expressing a selected natural or artificial steroid receptor with a test compound;
 - assessing whether the compound activates a nongentropic activity of
 - 10 the steroid receptor;
 - determining the level of transcription induced by the test compound;
 - and
 - selecting the compound or compounds that activate the nongentropic activity of the steroid receptor without substantially activating the genotropic activity
 - 15 of the steroid receptor.
28. A method for screening compounds for the treatment of steroid receptor related diseases or disorders comprising:
- contacting a cell expressing a natural or artificial sex steroid receptor
 - 20 with a test compound alone or in combination with a pro-apoptotic agent;
 - assessing whether the compound activates a nongentropic activity of the steroid receptor;
 - determining the level of transcription induced by the test compound;
 - determining whether the test compound inhibited apoptosis in cells
 - 25 contacted with a test compound alone or in combination with a pro-apoptotic agent;
 - selecting the compound or compounds that activate the nongentropic activity of the steroid receptor without substantially activating the genotropic activity of the steroid receptor.
- 30 29. A method for screening for compounds that modulate the nongentropic activity of a steroid receptor without modulating the genotropic activity of the steroid receptor comprising the steps of:
- contacting cells expressing a natural or artificial steroid receptor(s)
 - with a test compound;

WO 01/96605

PCT/US01/18950

determining the amount of extracellular regulated kinase activation in the cells contacted with the test compound;

determining the amount of transcription in the cells contacted with the test compound;

- 5 selecting the cells contacted with the test compound that exhibit extracellular regulated kinase activation and minimal transcription levels as compared to transcriptions levels in cells contacted with an androgen or estrogen.

30. A method for screening for compounds that modulate the nongentropic activity of a steroid receptor without modulating the genotropic activity of the steroid receptor comprising the steps of:

contacting cells with at least one test compound wherein the cells contain:

- 15 (a) non-endogenous DNA which expresses a steroid receptor protein, or functional engineered or modified forms thereof;

(b) DNA which encodes an operative hormone response element linked to a first reporter gene; and

- 20 (c) DNA which encodes a second reporter gene operably linked to a signal transduction pathway responsive transcriptional control unit such that transcription of the second reporter gene is activated in response to activating a signal transduction pathway and wherein transcription of the second reporter gene is not activated by the steroid hormone;

assaying for evidence of transcription of the reporter genes in the cells;

and

- 25 selecting the compounds that induce transcription of the second reporter gene and do not induce transcription of the first reporter gene.

31. A method for screening for compounds that modulate the nongentropic activity of a steroid receptor without modulating the genotropic activity of the steroid receptor comprising the steps of:

30 contacting cells with at least one test compound wherein the cells contain:

(a) non-endogenous DNA which expresses a steroid receptor protein, or functional engineered or modified forms thereof;

WO 01/96605

PCT/US01/18950

- (b) DNA which encodes a reporter gene operably linked to a signal transduction pathway responsive transcriptional control unit such that transcription of the reporter gene is activated in response to activating a signal transduction pathway and wherein transcription of the second reporter gene is not activated by the steroid hormone;
- assaying for evidence of transcription of the reporter gene in the cells;
- quantifying the transcription of steroid receptor responsive genes;
- selecting the compounds that induce transcription of the reporter gene and do not induce transcription of steroid receptor responsive genes.
32. The method of claims 30 or 31, wherein the signal transduction pathway responsive transcriptional control unit is selected from the group consisting of serum response element, Activator protein 1, cAMP response element, E-box DNA binding element, E2F DNA binding element, glucocorticoid response element, heat shock response element, interferon γ activation sequence, interferon stimulated response element, nuclear factor of activated T cells, nuclear factor of κ B cells, p53 response element, Rb response element, and STAT3 response element.
33. A bioassay for identifying a test compound or chemical signal that activates nongentropic receptor activity without substantially activating genotropic receptor activity, comprising the steps of:
- growing a tissue culture screening system in a chemically defined culture medium, optionally supplemented with nutrients, wherein the cell line of the tissue culture screening system contains a steroid receptor having at least one identified nongentropic activity;
- adding a test compound or chemical signal to the medium;
- measuring the amount of transcription;
- measuring the amount of nongentropic activity;
- selecting the compound that induces nongentropic activity but does not induce transcription.
34. The method of claim 33, wherein the cell line is OB-6.

WO 01/96605

PCT/US01/18950

35. A method of screening for ligands of steroid receptors that induce nongentropic activity without substantially inducing genotropic activity is provided comprising the steps of:

- 5 contacting a cell with a test compound wherein the cell has been transfected with :
- i) a DNA sequence encoding a functional steroid receptor or genetic variant of a steroid receptor;
 - ii) a response element-reporter gene construct; and iii) serum response element-reporter gene construct;
- 10 determining the effect of the test compound on the transcription of the response element reporter gene construct;
- determining the effect of the test compound on the transcription of the serum response element-reporter gene construct; and
- 15 selecting the compound that activates the transcription of the serum response element-reporter gene construct without substantially effecting the transcription of the response element reporter gene construct.

36. A method of screening for ligands of steroid receptors that induce nongentropic activity without substantially inducing genotropic activity is provided comprising the steps of:

- 20 contacting a first cell with a test compound wherein the first cell has been transfected with :
- i) a DNA sequence encoding a functional steroid receptor or genetic variant of a steroid receptor;
 - 25 ii) a response element-reporter gene construct;
- determining the effect of the test compound on the transcription of the response element reporter gene construct;
- contacting a second cell with the test compound wherein the second cell has been transfected with a signal transduction pathway responsive transcriptional control unit operably linked to a reporter gene;
- 30 determining the effect of the test compound on the transcription of the second cell; and
- selecting the compound that activates the transcription of the second cell without substantially effecting the transcription of the first cell.

WO 01/96605

PCT/US01/18950

37. A kit for measuring steroid receptor dependent nongentropic activity comprising: a container having a stable transfected cell line wherein the cell line includes a steroid responsive reporter gene construct, a means for assessing the
5 activation of nongentropic steroid activity, and a steroid receptor.

WO 01/96605

1/13

PCT/US01/18950

FIG. 1/10

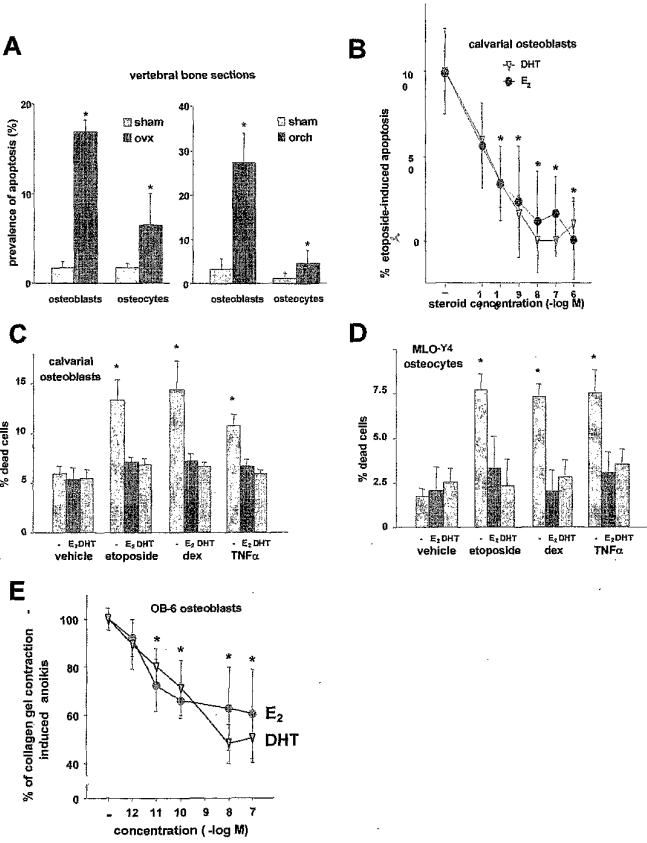


FIG. 2/10

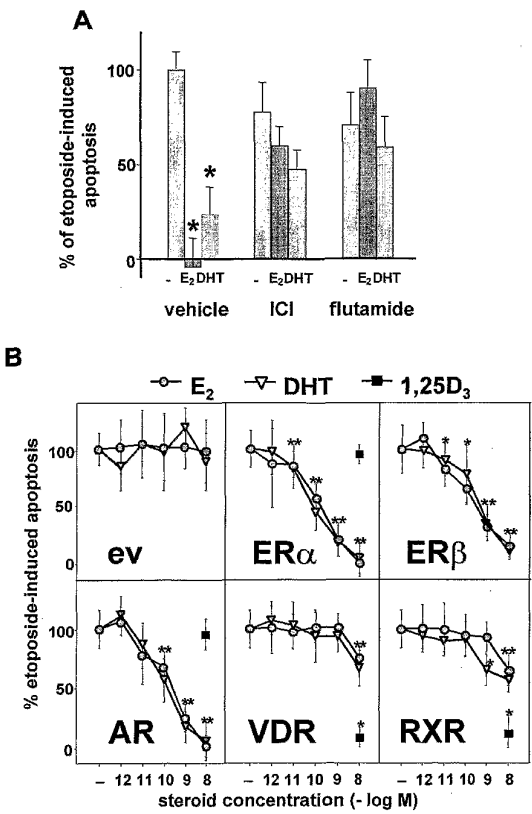
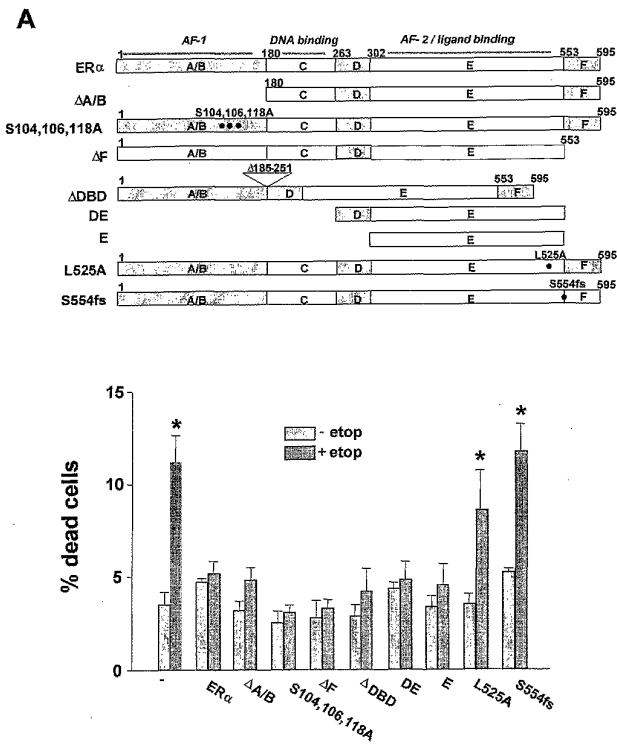


FIG. 3A/10



WO 01/96605

4/13

PCT/US01/18950

FIG. 3B/10

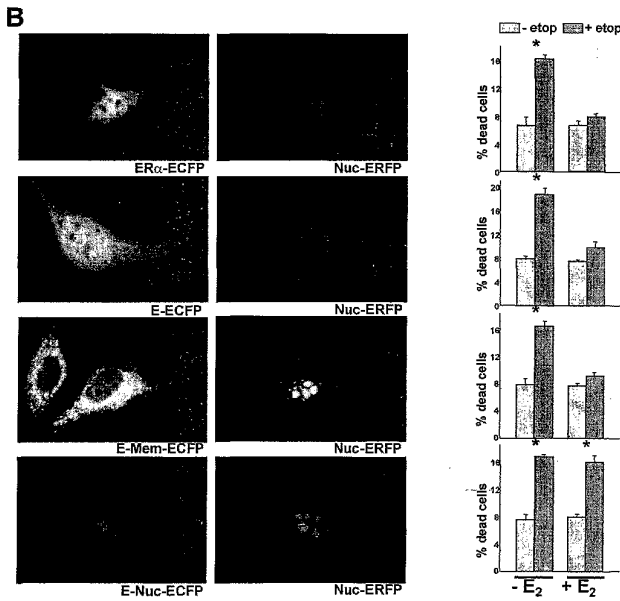
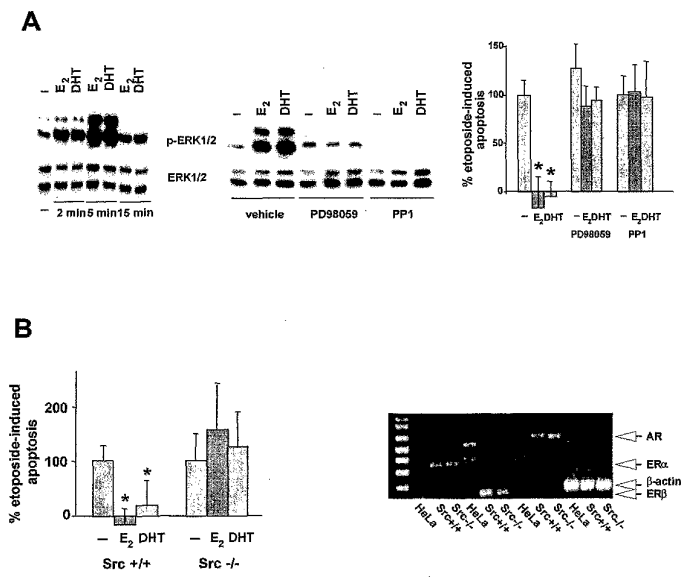


FIG. 4A,B/10

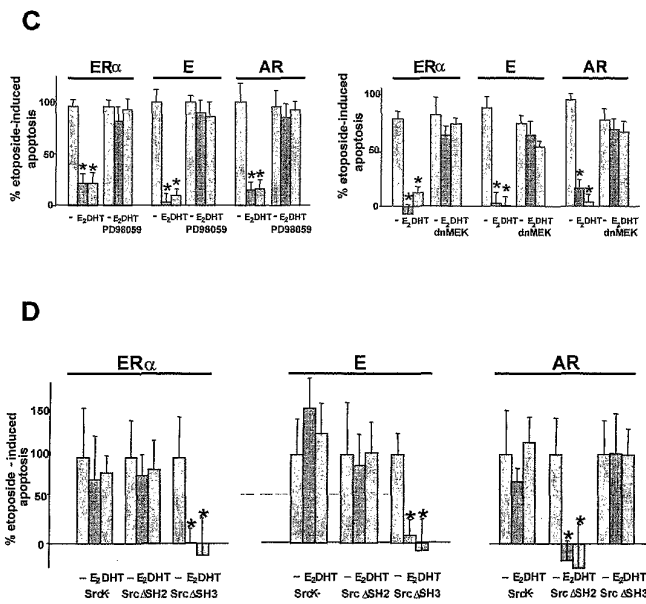


WO 01/96605

6/13

PCT/US01/18950

FIG. 4C,D/10

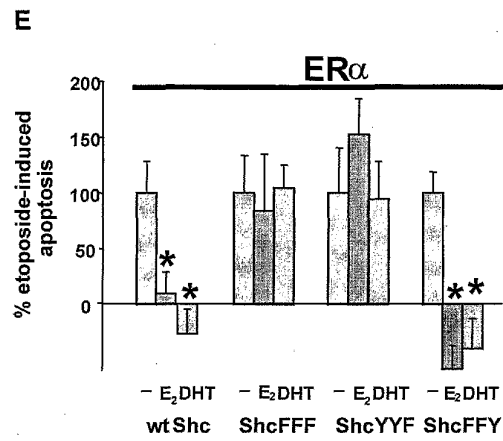


WO 01/96605

7/13

PCT/US01/18950

FIG. 4E/10



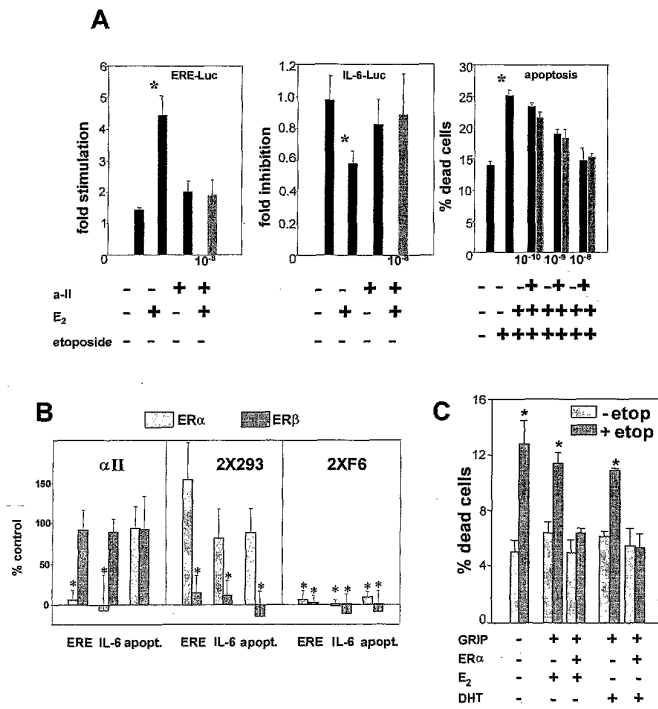
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/96605

8/13

PCT/US01/18950

FIG. 5/10

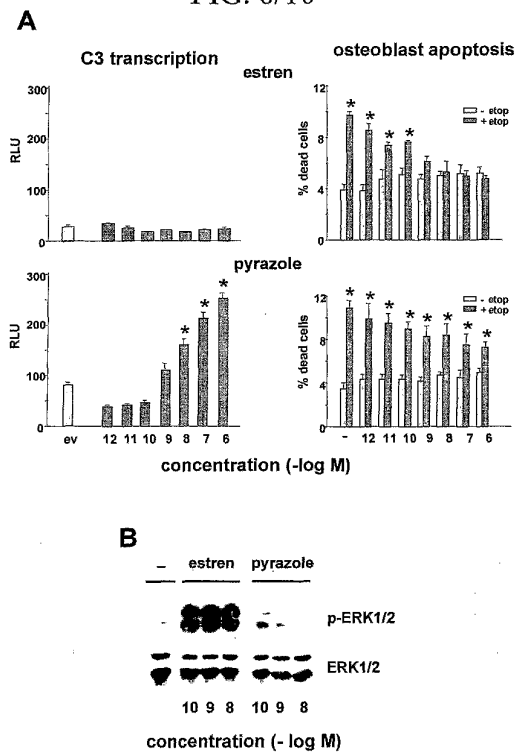


WO 01/96605

9/13

PCT/US01/18950

FIG. 6/10

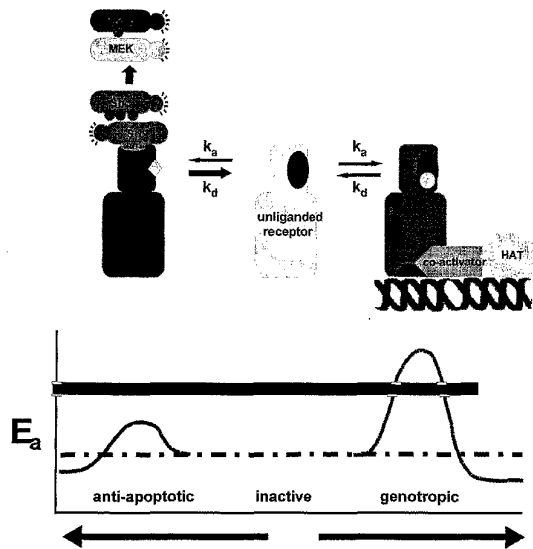


WO 01/96605

10/13

PCT/US01/18950

FIG. 7/10



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

FIG. 8/10

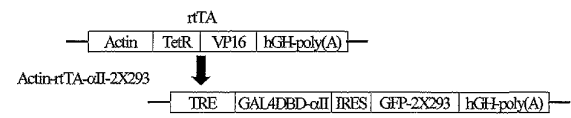


FIG. 9/10

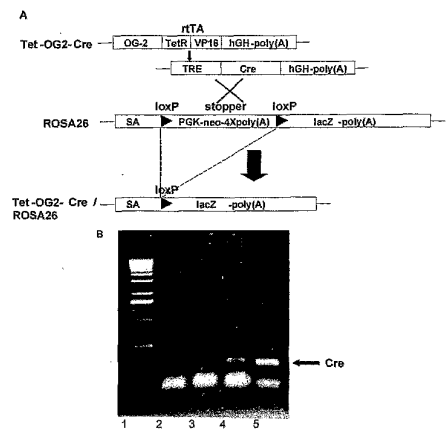
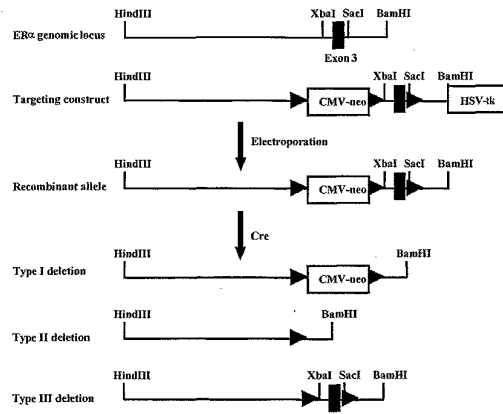


FIG. 10/10



【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
20 December 2001 (20.12.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/096605 A3(51) International Patent Classification: C07K 14/705,
G01N 33/566, C12Q 1/68, C12N 9/12, C07K 14/47,
A01K 67/027(74) Agent: KNOWLES, Sherry, M.; King & Spalding, 191
Peachtree St., Atlanta, GA 30303-1763 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/18950

(22) International Filing Date: 13 June 2001 (13.06.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 13 June 2000 (13.06.2000) US
60/211,287
8 March 2001 (08.03.2001) US
60/274,373(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GH, GI,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MY, NZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(71) Applicant (for all designated States except US): THE
BOARD OF TRUSTEES FOR THE UNIVERSITY OF
ARKANSAS [US/US]; 2801 South University Avenue,
Little Rock, AR 72204 (US).Published:
with international search report(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): MANOLAGAS,
Stavros, C. [US/US]; 35 River Ridge Circle, Little Rock,
AR 72227 (US). KOUSTENI, Stavroula [GR/US]; 14715
Chamberly Dr., Little Rock, AR 72211 (US).(88) Date of publication of the international search report:
4 September 2003For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/096605 A3

(54) Title: METHODS OF DISSOCIATING NONGENOTROPIC FROM GENOTROPIC ACTIVITY OF STEROID RECEPTORS

(57) Abstract: This invention concerns the fundamental discovery of the understanding of the mechanism of action of steroidal nongenotropic effects and their relation to steroidal genotropic effects. It has been discovered that (i) steroidal nongenotropic effects and genotropic effects can be mediated by the same steroid receptor; (ii) both effects are ligand-induced; (iii) the nongenotropic effect occurs due to a ligand-induced activation of the ligand binding domain, which can be fast and loose fitting; (iv) the genotropic effect occurs due to a ligand-induced activation of the DNA-binding domain of the steroid receptor, which is typically a result of a slower, stronger interaction; and (v) the nongenotropic effect of a ligand interaction can be associated from the genotropic effect of a ligand interaction, in such a manner to effect a selective response. This invention also describes, for the first time, that certain steroids are capable of inducing a nongenotropic effect via binding to an unrelated steroid receptor.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/US 01/18950
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K14/705 G01N33/566 C12Q1/68 C12N9/12 C07K14/47 A01K67/027		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 20007 A (UNIV ARKANSAS) 13 April 2000 (2000-04-13) abstract page 32, last paragraph page 35, paragraphs 1,2 page 38, paragraph 2 page 40, paragraphs 2,3 claims 1,2,6,11; examples 6,7,9 --- -/--	8,9, 11-22, 27-29
☒ Further documents are listed in the continuation of box C. ☒ Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed ** later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 April 2003		Date of mailing of the international search report 20/05/2003
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 540-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 540-3016		Authorized officer Weijland, A

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int'l. Application No. PCT/US 01/18950
G ₂ (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	KOUSTENI S ET AL: "Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: Dissociation from transcriptional activity." CELL, vol. 104, no. 5, 9 March 2001 (2001-03-09), pages 719-730, XP002238552 ISSN: 0092-8674 the whole document	1-37
A	CHANG C-Y ET AL: "DISSECTION OF THE LXXLL NUCLEAR RECEPTOR-COACTIVATOR INTERACTION MOTIF USING COMBINATORIAL PEPTIDE LIBRARIES: DISCOVERY OF PEPTIDE ANTAGONISTS OF ESTROGEN RECEPTORS ALPHA AND BETA" MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, WASHINGTON, US, vol. 19, no. 12, December 1999 (1999-12), pages 8226-8239, XP001120691 ISSN: 0270-7306 the whole document	1-37
A	NORRIS ET AL: "Peptide antagonists of the human estrogen receptor" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE, US, vol. 285, no. 5428, 1999, pages 744-746, XP002113864 ISSN: 0036-8075 the whole document	1-37
A	FALKENSTEIN ELISABETH ET AL: "Multiple actions of steroid hormones: A focus on rapid, nongenomic effects." PHARMACOLOGICAL REVIEWS, vol. 52, no. 4, December 2000 (2000-12), pages 513-555, XP002238553 ISSN: 0031-6997 the whole document	1-37

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 01/18950

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0020007	A	13-04-2000	
		AU 1103600 A	26-04-2000
		AU 6419799 A	26-04-2000
		AU 6510999 A	26-04-2000
		CA 2346456 A1	13-04-2000
		CA 2346459 A1	13-04-2000
		CA 2346695 A1	13-04-2000
		EP 1121456 A1	08-08-2001
		EP 1119251 A1	01-08-2001
		EP 1121132 A1	08-08-2001
		WO 0020007 A1	13-04-2000
		WO 0019823 A1	13-04-2000
		WO 0020625 A1	13-04-2000

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/48	C 1 2 Q 1/48	Z
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z N A Z
G 0 1 N 33/50	G 0 1 N 33/50	Z

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,CH,CY,DE,DK,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NO,NZ,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VN,YU,ZA,ZW

(74)代理人 100103920

弁理士 大崎 勝真

(72)発明者 マノラガス, スタブロス・シー

アメリカ合衆国、アーカンソー・7 2 2 2 7、リトル・ロツク、リバー・リツジ・サークル・3 5

(72)発明者 コウステニ, スタブロウラ

アメリカ合衆国、アーカンソー・7 2 2 7 1、リトル・ロツク、シヤンベリー・ドライブ・1 4 7
1 5

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB20 CB01 DA12 DA13 DA20 DA36 DA54 FB01
4B024 AA01 AA11 BA63 CA01 DA02 EA04 GA11 HA08
4B063 QA18 QQ08 QQ22 QQ27 QQ30 QQ33 QQ42 QQ44 QQ53 QQ61
QR32 QR43 QR50 QR58 QR66 QR77 QS03 QS28 QS36 QX01