

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
C12Q 1/68 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480022299.5

[43] 公开日 2006 年 9 月 13 日

[11] 公开号 CN 1833033A

[22] 申请日 2004.6.7

[21] 申请号 200480022299.5

[30] 优先权

[32] 2003.6.6 [33] US [31] 60/476,164

[86] 国际申请 PCT/US2004/017951 2004.6.7

[87] 国际公布 WO2005/028678 英 2005.3.31

[85] 进入国家阶段日期 2006.2.5

[71] 申请人 惠氏公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 M·查特吉 - 基肖尔

J·A·洛宾逊 B·M·巴特

F·J·贝克斯三世

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 王景朝

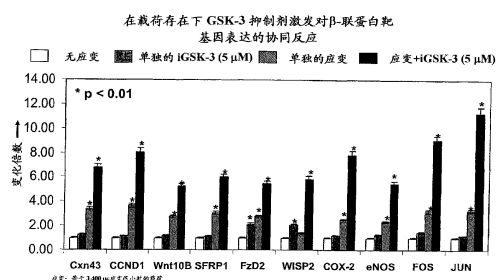
权利要求书 6 页 说明书 168 页 附图 19 页

[54] 发明名称

用于鉴别骨重建调节物的方法和材料以及由此鉴别的物质

[57] 摘要

本发明公开了组合物、化合物、装置和方法，使用其可研究骨矿化，并鉴别调节骨矿化的物质。还公开了使用骨矿化基因谱和特征进行化合物筛选和研究的方法。提供了用于治疗和研究用途的骨矿化调节试剂。



1. 一种经受骨载荷的骨细胞的基因表达谱, 其中骨载荷受 Wnt 通路调节物调节。
- 5 2. 权利要求 1 的基因表达谱, 其中所述基因表达谱包含 COX-2、Jun、Fos、SFRP1、连接蛋白 43 和 eNOS 基因。
3. 权利要求 1 的基因表达谱, 其中所述基因表达谱包含表 1-5、11 或 12 的两种或更多种基因。
4. 权利要求 1 的基因表达谱, 其中所述 Wnt 通路调节物是激动
10 剂。
5. 权利要求 4 的基因表达谱, 其中所述激动剂为 GSK-3 抑制剂。
6. 权利要求 4 的基因表达谱, 其中所述激动剂为 Wnt 3A、Wnt 3A 变体、Wnt 3A 模拟物或 Wnt 3A 激动剂。
7. 权利要求 5 的基因表达谱, 其中所述 GSK-3 抑制剂是选择性
15 GSK-3 抑制剂。
8. 权利要求 5 的基因表达谱, 其中所述 GSK-3 抑制剂是氯化锂或其药物可接受的盐、马来酰亚胺、毒蕈碱性激动剂、alosisine、hymeninidisine 或 inidirubin。
9. 权利要求 8 的基因表达谱, 其中所述马来酰亚胺为 3-(2,4-二氯
20 苯基)-4-(1-甲基-1*H*-吡咯-3-基)-1*H*-吡咯-2,5-二酮或 3-(3-氯-4-羟基苯基氨基)-4-(2-硝基苯基)-1*H* 吡咯-2,5-二酮。
10. 权利要求 4 的基因表达谱, 其中所述基因表达谱来源于培养细胞或得自动物组织的细胞。
11. 权利要求 1 的基因表达谱, 其中所述骨细胞为前成骨细胞、
25 骨原细胞、成骨细胞、破骨细胞、骨细胞或间充质干细胞, 或其组合。
12. 一种鉴别 Wnt 通路调节剂并由此调节骨重建的方法, 所述方法包括以下步骤:
 (A) 获得接触候选物的骨细胞的基因表达谱;

(B) 对比步骤(A)的基因表达谱和权利要求 1 的基因表达谱, 由此确定 Wnt 通路是否被调节。

13. 权利要求 12 的方法, 其中所述机械载荷施加于动物和得自动物的骨细胞, 或者其中机械载荷施加于培养的骨细胞。

5 14. 一种 HBM 细胞的基因表达谱, 其中所述 HBM 细胞经受机械压力和 Wnt 通路调节物。

15. 一种制作骨载荷基因表达谱的方法, 所述方法包括以下步骤:

10 (A) 获得不接触骨载荷的骨细胞的第一种基因表达谱、接触骨载荷的骨细胞的第二种基因表达谱和接触骨载荷和 Wnt 通路调节物的骨细胞的第三种基因表达谱;

(B) 对比第一种、第二种和第三种基因表达谱, 由此获得 Wnt 通路调节物调节基因的骨载荷基因表达谱。

15 16. 权利要求 15 的方法, 其中所述骨细胞为破骨细胞、成骨细胞、骨细胞或所述骨细胞的组合。

17. 权利要求 16 的方法, 其中所述 Wnt 通路调节物为 Wnt 通路激动剂。

20 18. 权利要求 17 的方法, 其中所述 Wnt 通路激动剂为 GSK-3 抑制剂、Wnt 3A、Wnt 3A 模拟物、Wnt 3A 激动剂、LRP5 激动剂、LRP6 激动剂、 β -联蛋白激动剂或 Dkk1 拮抗剂。

19. 一种骨载荷基因表达谱, 所述基因表达谱包含受 Wnt 通路调节物调节的基因, 通过权利要求 15 的方法获得。

20. 一种筛选物质的方法, 所述物质增强与重建相关的骨载荷, 所述方法包括以下步骤:

25 (A) 获得用所述物质培养并接触骨载荷的骨细胞的基因表达谱;

(B) 对比步骤(A)的基因表达谱和权利要求 19 的骨载荷基因表达谱, 其中 Wnt 通路调节物为参比 Wnt 通路调节物。

21. 权利要求 20 的方法, 其中所述参比 Wnt 通路调节物为 GSK-3 抑制剂或 Wnt 3A。

22. 权利要求 20 的方法, 其中在没有候选物时评价的培养骨细胞为 HBM 骨细胞。

5 23. 权利要求 20 的方法, 其中所述骨细胞为成骨细胞、前成骨细胞、骨原细胞、间充质干细胞或其组合。

24. 权利要求 23 的方法, 其中所述骨细胞为成骨细胞, 其中所述物质对成骨细胞的数目和/或增殖的作用通过 [³H]-胸腺嘧啶核苷掺入、5-溴-2'-脱氧尿苷(BrdU)掺入、3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧甲氧基苯基)-2-(4-磺基苯基)-2H-四唑鎓盐(MTS)实验或凋亡实验测定。

10 25. 权利要求 20 的方法, 其中在权利要求 20 的步骤(A)和(B)中给予的骨载荷是机械载荷, 其量为约 50 至约 5,000 μE 。

26. 一种通过权利要求 20 的方法鉴别的候选物, 其用于治疗低骨质疾病。

15 27. 一种治疗骨矿化疾病或病症的方法, 所述方法包括给予治疗有效量的权利要求 26 的候选物。

28. 权利要求 27 的方法, 其中所述骨疾病或病症为骨质疏松、骨折、软骨营养障碍、药物诱导性骨病、高骨代谢、高血钙、骨肥厚、骨关节炎、骨髓炎和 Paget 病。

20 29. 权利要求 28 的方法, 其中所述骨折为髌骨骨折、Colle 骨折或脊椎粉碎性骨折。

30. 权利要求 28 的方法, 其中所述药物诱导性骨病为糖皮质激素诱导性骨质疏松、肝素诱导性骨质疏松、氢氧化铝诱导性骨软化、镇痉剂诱导性骨软化或格鲁米特诱导性骨软化。

25 31. 权利要求 25 的候选物, 其中所述候选物为 GSK-3 拮抗剂、Wnt 3A、Wnt 3A 模拟物、Wnt 3A 激动剂、Dkk1 拮抗剂、LRP5 激动剂、 β -联蛋白激动剂或 LRP6 激动剂。

32. 一种含多种探针的组合物, 其中所述探针包含的核酸序列与

权利要求 19 的骨载荷基因表达谱的核酸退火。

33. 权利要求 32 的组合物, 其中所述多种探针连接至固体基质。

34. 权利要求 33 的组合物, 其中所述固体基质为珠、平板或载玻片。

5 35. 权利要求 32 的组合物, 其中所述多种探针包含的核酸序列与编码连接蛋白 43、COX-2、eNOS、SFRP1、Jun 和 Fos 蛋白的核酸序列退火。

36. 权利要求 32 的组合物, 其中所述多种探针包含的核酸序列与表 1-5、11 或 12 的基因或基因转录物的核酸序列退火。

10 37. 权利要求 35 的组合物, 所述组合物还含有与以下基因的核酸序列退火的探针: PDGFRA、MET、OSMR、ITGBL1、CTGF、WNT6、TIMP3、GJA1、GAS6、LOX、MYBL1、THBS1、ITGB5、CTSK、COL1A1、FBLN1、CCND1、TIMP2、COL6A3、GADD45A、WISP2、FZD2、SFRP4、IGFBP6、LRP5、LRP6、LSP1、CX3CR1、TRFBR2、VCAM1、
15 IL6、FGF2、FGF7、STAT1、TNFRSF10B、IFG2R、IGF2、SPARC、MAPKAPK2、TNF、TNFRSF11b、TNFSF11、ACP5、FAP、MCC、DELTEX、EPHB2、CNK1、ERBB3、GRO1、MYC 和 WNT10B。

38. 一种调节细胞中骨矿化的方法, 所述方法包括给予产生权利要求 1 或 14 中任一项的骨载荷表达谱的物质。

20 39. 权利要求 38 的方法, 其中所述物质为 Wnt 激动剂、Wnt 3A、Wnt 3A 模拟物、Wnt 3A 变体、Wnt 3A 激动剂、Dkk 拮抗剂、COX-2 拮抗剂、LRP5 激动剂、LRP6 激动剂、GSK-3 拮抗剂或 β -联蛋白激动剂。

40. 权利要求 39 的方法, 其中所述 GSK-3 拮抗剂为马来酰亚胺、
25 毒蕈碱性激动剂、alosisine、hymeninidisine 或 inidirubin。

41. 权利要求 40 的方法, 其中所述马来酰亚胺与第二种骨重建调节剂联合给予。

42. 权利要求 41 的方法, 其中所述第二种骨重建调节剂为甲状旁

腺激素、雌激素、维生素 D、维生素 D 类似物、选择性雌激素受体调节物、糖皮质激素、钙制剂或双膦酸盐。

43. 一种在需要其的患者中调节骨矿化和/或骨重建的方法，所述方法包括给予产生权利要求 19 的骨载荷表达谱的化合物。

5 44. 一种组合物，所述组合物含基质和粘附于基质的多种免疫球蛋白，其中所述免疫球蛋白识别并结合表 1-5、11 或 12 的两种或更多种蛋白。

45. 权利要求 44 的组合物，其中所述多种免疫球蛋白含两种或更多种免疫球蛋白，其识别并结合表 1-5、11 或 12 的两种或更多种蛋白。

10 46. 权利要求 45 的组合物，其中所述两种或更多种蛋白为 eNOS、连接蛋白 43、SFRP1、细胞周期蛋白 D1、Wnt10B、Jun、Fos 或 COX-2。

47. 权利要求 44 的组合物，其中所述基质为微芯片、珠、平板、载玻片或管。

15 48. 一种研究骨载荷调节的组合物，所述组合物含有：

(A) 基质；

(B) 粘附于所述基质的两种骨细胞裂解物或更多种细胞裂解物，其中所述裂解物来源于(i)无机械压力的细胞；(ii)接触机械压力的细胞；(iii)无机械压力的 HBM 细胞；(iv)接触机械压力的 HBM 细胞；
20 和(v)接触 Wnt 通路调节物的任一种前述细胞。

49. 权利要求 48 的组合物，其中所述基质为微芯片、珠、平板、载玻片或管。

50. 一种筛选试剂的方法，所述试剂结合调节骨重建和/或骨矿化的蛋白，所述方法包括以下步骤：

25 (A) 在适于候选试剂和权利要求 48 的组合物结合的条件下，使候选试剂和权利要求 48 的组合物接触；

(B) 测定所述候选试剂是否结合权利要求 48 的组合物，并进一步测定权利要求 48 的组合物中的哪种蛋白结合所述候选试剂。

51. 一种方法，所述方法确定化合物或组合物是否增强骨载荷对骨细胞活性/功能和/或矿化的作用，所述方法包括以下步骤：

- (A) 给予细胞系化合物或组合物；
- (B) 此后给予所述细胞系机械刺激；
- 5 (C) 由细胞系获得细胞裂解物；
- (D) 在允许细胞裂解物中的蛋白与权利要求 44 的组合物结合的合适条件下，使细胞裂解物与权利要求 44 的组合物接触；以及
- (E) 通过比较步骤(D)获得的图谱和由仅给予机械载荷刺激的细胞的细胞裂解物获得的表达谱，确定所述化合物或组合物是否增强骨
- 10 载荷对骨细胞活性/功能和/或矿化的作用。

用于鉴别骨重建调节物的方法和材料以及由此鉴别的物质

5

发明背景

在美国，涉及骨矿物质丢失的骨病耗费了大量的卫生保健开支，是老年人群健康情况差的主要原因。骨质疏松是致使卫生保健开支大的最主要病症。

10 骨矿物质丢失源于骨重建稳态和维持正常血钙水平之间的失衡。血钙由肠钙吸收、肾脏排泄和骨动员或钙摄取的相互作用而定。尽管血钙占总体钙的不足 1%，但血清水平对维持正常细胞功能非常重要。

血钙调节并受调于三种主要激素。甲状旁腺激素(PTH)和 1,25-二羟基维生素 D 是钙和骨稳态的主要调节物。PTH 作用于肾脏，增加钙重吸收、磷排泄和 1,25-二羟基维生素 D 产生。PTH 增加骨吸收。1,25-二羟基维生素 D 有效刺激骨吸收，对肠钙(和磷)的吸收刺激甚至更有效。1,25-二羟基维生素 D 也是骨矿化必需的。第三种参与血钙调节的激素是降钙素。降钙素调节钙稳态的程度低于 PTH 和 1,25-二羟基维生素 D。

20 许多反馈回路操控血钙和两种主要稳态激素的水平。在甲状旁腺和肾脏细胞中鉴别出的、并且也存在于其它组织中的对胞外钙敏感的钙敏受体，对钙稳态起关键作用。低血钙水平直接通过刺激 PTH 释放(和合成)刺激 1,25-二羟基维生素 D 合成。为防止血钙水平提高，第二组反馈回路操控 PTH 和 1,25-二羟基维生素 D 水平降低。这些反馈回路将血钙保持在狭窄的生理范围内，与个体摄入的钙量无关。

25 除钙稳态和钙的激素控制之外，骨矿化也受到细胞骨重建的极大影响。骨由胞外基质(大部分矿化)、胶原和细胞组成。胶原纤维为

I 型, 占骨总蛋白的 90%。在胶原纤维内部为纺锤型或盘型羟磷灰石 $[3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2] \cdot (\text{OH})_2$ 晶体。这些纺锤型或盘型晶体是衍生自血钙和磷的含钙-磷化合物。羟磷灰石还存在于“基质”上。基质主要由糖蛋白和蛋白聚糖组成。这些高度阴离子化复合物具有高离子结合能力, 5 因此被认为对钙化起重要作用。

除胶原之外, 还有几种细胞对骨重建和矿化起巨大作用。骨中的主要细胞是破骨细胞和成骨细胞(还包括骨内膜细胞和骨细胞)。破骨细胞负责骨吸收, 由造血干细胞产生。成骨细胞由局部间充质细胞产生, 直接负责骨形成。成骨细胞通过旁分泌因子间接负责调节破骨细胞骨吸收。 10

骨持续进行更新; 这被称为骨重建。在正常成年人中, 新骨由成骨细胞沉积。新骨产生与破骨细胞骨吸收相当。大部分骨代谢发生在骨表面, 特别是在骨内膜表面。不同位置的重建速率不同要归因于作用在特定骨上的物理载荷、接近滑膜关节或在骨髓中存在造血组织而不是脂肪组织以及骨类型。脊柱骨重建比密质骨快 2-9 倍。 15

重建遵循有序的顺序, 这称为骨代谢的基本多细胞单位或骨重建单位(BMU)。在该循环中, 骨吸收由破骨细胞的募集启动, 破骨细胞对暴露于由骨内膜细胞产生的蛋白酶的基质起作用。吸收陷窝(即 Howship 陷窝)由破骨细胞产生。陷窝由破骨细胞释放溶酶体酶到产生基质吸收的腔中产生。然后, 在此吸收期之后是成骨细胞用类骨质填满陷窝的骨形成期。接着, 羟磷灰石矿化类骨质, 形成新骨基质。在骨质疏松和其它骨矿化病中观察到的就是这种可导致有害网状骨变化的重建循环解偶联。 20

骨矿物质丢失自身没有临床作用, 除非发生骨折。由于骨质疏松或骨矿化丢失疾病而产生的骨折的常见部位包括轻伤后的脊骨、腕骨、髌骨或盆骨骨折。骨折还可以表现为前高减低(即楔形骨折)、中锥高减低(即鳕鱼锥)或前高、中高和后高减低(即压迫性或粉碎性骨折)。其它含骨丢失的疾病包括骨软化和佝偻病。 25

增加骨产生也可以引起骨折。在 Piget 病中，由于破骨细胞过度活跃而使骨局部区域显示骨代谢增加。重建增加导致潜在的肢体畸形、骨痛和骨折风险增加。

5 目前，防止或抑制骨丢失的方法包括锻炼、女性每日膳食钙吸收 800-1200 mg/天以及避免有害地影响钙代谢(例如抑制成骨细胞骨形成)的皮质类固醇。当存在钙吸收不良迹象时，建议补充维生素 D。对于女性，雌激素替代疗法也是一种常见的治疗，因为该疗法通过降低细胞因子如 IL-1 和 RANK 的产生而减少破骨细胞产生。最后，双膦酸盐是治疗骨丢失的有效方法。这些化合物通过抑制破骨细胞
10 功能起作用。但是，没有增强骨矿化的治疗，现有的治疗对抑制染病人骨丢失不是非常有效。大多数治疗仅仅减慢了骨丢失进程，但染病个体的骨质密度继续损失，即便进行了治疗。

鉴于血钙稳态和骨重建稳态的复杂性、控制它们的反馈机制以及目前可用于治疗骨病的治疗方法，需要另外的治疗骨重建疾病的方法。
15 还需要筛选调节骨重建和矿化的物质的方法。

发明概述

本发明提供调节骨重建和/或矿化的新试剂。本发明基于新阐明的骨重建调节通路 Wnt 通路，进一步提供可筛选调节骨重建和/或矿化的化合物和组合物的新研究工具。
20

本发明的一个方面涉及承受骨载荷的骨细胞的基因表达谱，其中骨载荷受到 Wnt 通路调节物的调节。基因表达谱包括表 1-5 或 12 中任一个表的任意两种或更多种基因，或涉及图 16 通路模型的任一种基因及其衍生蛋白。Wnt 通路调节物优选为 Wnt 通路激动剂。所述激动剂更优选为 GSK-3 抑制剂或 Wnt 3A、Wnt 3A 模拟物或 Wnt 3A
25 激动剂。其它优选调节物在本文也有讨论。优选的 GSK-3 抑制剂包括氯化锂或其它锂盐、马来酰亚胺、毒蕈碱性激动剂、alosisine、hymeninidisine 或 inidirubin。优选的马来酰亚胺为 3-(2,4-二氯苯基)-

4-(1-甲基-1*H*-吡啶-3-基)-1*H*-吡咯-2,5-二酮或 3-(3-氯-4-羟基苯基氨基)-4-(2-硝基苯基)-1*H*-吡咯-2,5-二酮。

在本发明的另一方面，基因谱得自培养细胞，优选骨细胞。优选的骨细胞是成骨细胞、破骨细胞、骨细胞、前成骨细胞、骨原细胞或间充质干细胞，或这些细胞的任意组合。

本发明的另一个目标是提供一种鉴别 Wnt 通路调节物并由此调节骨重建的方法，该方法包括以下步骤：

- (A) 获得暴露于候选物的骨细胞的基因表达谱；和
- (B) 对比步骤(A)的基因表达谱和优选的基因表达谱，由此确定 Wnt 通路是否受到调节。

在本发明的再另一方面，基因表达谱可得自培养细胞或由动物(体内)获得的细胞。细胞优选为骨细胞或干细胞，例如成骨细胞、破骨细胞、骨细胞或间充质细胞。获得的基因谱包括得自机械载荷细胞或未载荷细胞的数据。其它的表达谱可由表达 LRP5 突变的细胞(HBM 细胞)制作，该细胞产生高骨质表型。

本发明的再一个目标是提供一种制作骨载荷基因表达谱的方法，该方法包括以下步骤：

- (A) 获得不暴露于机械压力的骨细胞群的基因表达谱和暴露于机械应力的骨细胞群的基因表达谱；和
- (B) 对比无机械压力的基因表达谱和暴露于机械压力的基因表达谱，由此获得骨载荷基因表达谱。

该方法可进一步包含以下步骤：

- (C) 获得已给予 Wnt 通路调节物和机械压力的骨细胞群的基因表达谱；和
- (D) 对比步骤(C)的基因表达谱与步骤(A)和(B)的基因表达谱，由此获得扩展的骨载荷基因表达谱。

该方法优选使用破骨细胞、成骨细胞或其它骨细胞。

在本发明的再一方面，以上方法的调节物是 Wnt 通路激动剂或

拮抗剂。优选的激动剂包括 Dkk 拮抗剂(优选 Dkk1 拮抗剂)、Wnt 3A 激动剂或模拟物(以及 Wnt 3A)、GSK-3 拮抗剂、LRP5 激动剂、LRP6 激动剂、 β -联蛋白激动剂。

5 本发明的另一个目标是提供一种由于机械载荷而增强骨重建的物质的筛选方法,该方法包括以下步骤:通过对比没有候选物和存在候选物的情况下产生的基因表达谱数据集,确定候选物对培养的骨细胞的载荷反应的作用。所述筛选工具和方法优选包括参比化合物(对照)。阳性对照包括例如 GSK-3 抑制剂和甲状旁腺激素等。其它参比样品清楚示于本说明书。

10 由以上方法鉴别的物质可用于治疗例如以下的疾病和障碍:骨质疏松、骨折、软骨营养障碍、药物诱导性骨病、高骨代谢、高血钙、骨肥厚、骨关节炎、骨髓炎和 Paget 病。骨折优选包括但不限于髌骨骨折、Colle 骨折或脊椎粉碎性骨折。药物诱导性疾病优选包括但不限于糖皮质激素诱导性骨质疏松、肝素诱导性骨质疏松、氢氧化铝诱导性骨软化、镇痉剂诱导性骨软化或格鲁米特诱导性骨软化。

15 在再另一方面,本发明涉及含多种探针的组合物,所述探针对应于骨载荷基因表达谱中的基因。多种探针优选包含结合连接蛋白 43、COX-2、eNOS、SFRP1、Jun 和 Fos 或列于表 1-5、11 或 12 的任一种基因的核酸序列的探针。

20 本发明另一方面考虑使用产生以上骨载荷或机械载荷表达谱中的一种的试剂来调节细胞中的骨矿化。优选的试剂是 GSK-3 拮抗剂,例如但不限于马来酰亚胺、毒蕈碱性激动剂、alosisine、hymeninidisine 或 inidirubin。还优选 Wnt 3A、其模拟物或其功能变体以及 Wnt 3A 激动剂。

25 在另一方面,这些试剂可与已批准的疗法组合。例如,Wnt 通路激动剂可与现有的骨矿化调节物组合,所述骨矿化调节物例如但不限于甲状旁腺激素、雌激素、维生素 D、维生素 D 类似物、选择性雌激素受体调节物、糖皮质激素、钙制剂或双膦酸盐。

本发明的另一个目标是提供含多种试剂(例如免疫球蛋白或其它蛋白结合配体)的组合物,其中所述多种试剂识别结合表 1-5、11 或 12 中的基因编码的两种或更多种蛋白。这些试剂识别并结合的蛋白优选为以下的两种或更多种蛋白: eNOS、连接蛋白 43、SFRP1、细胞周期蛋白 D1、Wnt10B、Jun、Fos 和 COX-2。

本发明另一方面提供研究骨载荷调节的组合物,其包含(A)基质;和(B)多种骨细胞裂解物,其中两种或更多种裂解物得自(i)没有机械压力的细胞;(ii)有机械压力的细胞;(iii)没有机械压力的 HBM 细胞;(iv)有机械压力的 HBM 细胞;和(v)前述任一种细胞和 Wnt 通路调节物。

然后,这些组合物可用于筛选结合蛋白的试剂。

本发明的另一个目标是考虑确定化合物或组合物是否增强骨载荷对骨细胞活性/功能和/或矿化的作用的方法,该方法包括:

- (A) 给予细胞系化合物或组合物;
- (B) 此后给予细胞系机械刺激;
- (C) 由细胞系获得细胞裂解物;
- (D) 在适于使细胞裂解物中的蛋白与固体基质结合的条件下使细胞裂解物与固体基质(例如板、片、珠等)接触;和
- (E) 通过对比步骤(D)获得的表达谱和由仅给予机械载荷刺激的细胞的细胞裂解物获得的表达谱,确定化合物或组合物是否增强骨载荷对骨细胞活性/功能和/或矿化的作用。

附图简述

图 1。图 1A 显示在 HEK-293A 细胞中 GSK-3 抑制剂剂量依赖性活化 TCF-信号。该图显示在 293A 细胞中 30 μ M-60 μ M 浓度的 iGSK-3 活化转染的 TCF-受体,因此活化 Wnt 信号转导。图 1B 显示 GSK-3 抑制剂在 HEK-293A 细胞和 U2OS 骨细胞中剂量依赖性活化 TCF-信号的对比。数据表明,除 293A 细胞之外,iGSK-3 抑制剂在

U2OS 骨细胞中也活化 TCF-信号。U2OS 细胞对 iGSK-3 介导的 TCF-信号活化的反应比 293A 细胞更强。TCF-诱导以比在 293A 细胞中低的剂量(10 μ M)开始, 峰值为 30 μ M, 与 293A 细胞不同。

5 图 2. GSK-3 抑制剂可在 U2OS 细胞中用于解除 Dkk1 介导的 TCF-信号抑制。正如所示, Wnt1 和 Wnt3A 活化 TCF-信号是对照的约 10-15 倍。加入 Dkk1 抑制 Wnt 介导的 TCF-信号。GSK-3 抑制剂可逆转该抑制。这证明其和其它 GSK-3 抑制剂在 Dkk1-拮抗剂指示实验中可用作对照或活化剂。其它的 Wnt 拮抗剂可通过使用 GSK-3 抑制剂而标准化。

10 图 3. 局部给予 iGSK-3 对小鼠颅盖厚度的作用。在给予小鼠局部 iGSK-3 注射后 18 天, H&E 染色处理小鼠的顶骨横切面。1 mg/kg/天 iGSK-3 明显对右半颅盖具有局部的合成代谢作用。

15 图 4. iGSK-3 对小鼠颅盖厚度的局部作用, 其以未注射侧颅盖的变化百分率表示。用人 PTH (hPTH)、iGSK-3 和载体(含 2% Tween 80 和 0.5% 甲基纤维素的 50% DMSO)处理的小鼠的颅盖骨厚度进行定量。20 μ g/kg/天的人 PTH (1-34)用作阳性对照, 其显著增加颅盖厚度。iGSK-3 注射 18 天的右半颅盖与该小鼠的未注射左半颅盖相比, 观察到颅盖厚度显著增加(11.8%, $p < 0.005$)。

20 图 5. 与载体处理的颅盖相比, iGSK-3 处理 18 天对颅盖厚度的局部作用。用 hPTH、iGSK-3 和载体(含 2% Tween 80 和 0.5% 甲基纤维素的 50% DMSO)处理的小鼠的颅盖骨厚度进行定量。20 μ g/kg/天的人 PTH (1-34)用作阳性对照, 其显著增加颅盖厚度。iGSK-3 注射 18 天的右半颅盖在与单独的载体相比时, 观察到颅盖厚度增加(6%)。

25 图 6. 与载体处理的颅盖相比, PTH 1-34 和 iGSK-3 处理 7 天对颅盖厚度的局部作用(上图)。用 hPTH、iGSK-3 和使用不同载体(即含 2% Tween 80 和 0.5% 甲基纤维素的 10% DMSO)处理 7 天的小鼠的颅盖骨厚度进行定量, 与载体对照处理的颅盖相比, 颅盖厚度具有统计学上显著的 10% 增加(下图)。

图 7。iGSK-3 对小鼠颅盖上内源性碱性磷酸酶活性(ALP 酶)和β-联蛋白表达的作用。通过 ALP 酶组织化学染色和β-联蛋白表达的免疫组织化学评价 iGSK-3 对颅盖骨的作用。在给予 iGSK-3 或 PTH 后成骨细胞中的 ALP 酶活性显著增强(上图)。iGSK-3 注射的颅盖的免疫组织化学揭示, β-联蛋白在覆盖骨膜的成骨细胞中强烈表达。相反, PTH 对β-联蛋白表达水平没有作用(下图)。

图 8。应变对 MC3T3 细胞中扩展清单基因的载荷后即时基因反应的作用。细胞周期蛋白 D1、连接蛋白 43、SFRP1、Wnt 10B、COX-2 和 eNOS 基因表达被诱导, 在施加载荷的情况下卷曲蛋白 2、Fos 和 Jun 表达也被诱导。在 5 小时载荷后对 WISP2 基因表达的诱导最小。

图 9。单独的载荷和 iGSK-3 以及载荷组合 iGSK-3 对活化β-联蛋白通路的作用。数据表明, 与未载荷对照相比, 单独的载荷诱导每个基因(WISP2 除外)表达。单独的 GSK-3 抑制剂(5 μM)诱导卷曲蛋白 2 和 WISP2 表达, 但对连接蛋白 43、细胞周期蛋白 D1、Wnt 10B、SFRP1、COX-2、eNOS、Fos 或 Jun 没有作用。但是, 在载荷存在下用 5 μM GSK-3 抑制剂处理 MC3T3 细胞, 对每种靶基因的基因表达都产生协同诱导。

图 10。存在载荷时 iGSK-3 对 Wnt 靶基因表达的剂量依赖性作用。数据表明, 与未载荷对照相比, 单独的载荷诱导每个基因表达。任一浓度(未列出数据)的单独的 GSK-3 抑制剂对所列出基因的基因表达都没有作用。但是, 在载荷存在下用渐增浓度(0.05-20 μM)的 GSK-3 抑制剂处理 MC3T3 细胞, 对每种靶基因的基因表达都产生剂量依赖性的协同诱导。

图 11。对钙荧光素标记的体内载荷作用。以 6 N 力载荷雌性小鼠, 同时以 7 N 载荷雄性小鼠。与非载荷对照相比, 在两种性别的非转基因和 HBM 转基因载荷小鼠胫骨中的钙荧光素标记表面都增加, 据此观测到强烈的骨形成反应。

图 12。TaqMan®数据显示非-TG 和 LRP5 G171V TG 小鼠的未

载荷和载荷胫骨中的 *COX-2*、*PTGS* 和 *eNOS* 表达。在 LRP5 G171V TG 小鼠中载荷诱导的所有三种基因的 mRNA 水平的增加都高于非-TG 小鼠。

5 图 13。图 13A 显示的 TaqMan®数据表明，Wnt 相关基因和 Wnt 靶基因在载荷后 4 小时的非-TG 和 LRP5 G171V TG (HBM TG)小鼠中表达。非-TG 和 LRP5 G171V TG 小鼠中载荷都诱导β-联蛋白靶基因转录增加。但是，该诱导在 LRP5 G171V TG 小鼠中更明显。图 13B 显示的 TaqMan®数据表明，Wnt 相关基因和 Wnt 靶基因在载荷后 24 小时的非-TG 和 LRP5 G171V TG (HBM TG)小鼠中表达。

10 图 14。TAQMAN®数据表明，RANKL 和 OPG 在载荷后 4 和 24 小时的非-TG 和 G171V LRP5 TG (HBM TG)小鼠中表达。RANKL 基因转录在非-TG 或 LRP5 G171V TG 小鼠中都明显没有受到诱导。OPG 基因转录仅在 LRP5 G171V TG 小鼠中被诱导，而在非-TG 小鼠中没有被诱导。

15 图 15。抑制 COX-2 表达对载荷诱导的基因表达的作用。在载荷 (3,400 με应变，5 小时)前 1 小时，向细胞中加入不同浓度(1-60 μM)的 COX-2 抑制剂 NS-398。COX-2 抑制剂被证明可阻断载荷诱导的连接蛋白 43、细胞周期蛋白 D1、Wnt 10b、SFRP1 和 COX-2 基因表达的诱导，而对卷曲蛋白 2、eNOS、Fos 或 Jun 没有作用。这些数据
20 表明，COX-2 表达对介导施加载荷刺激下的 Wnt 靶基因表达反应起重要作用。

图 16。描述 LRP5 参与活化 Wnt/β-联蛋白通路的模型。

图 17。天然 Wnt 配体(Wnt 3A)协同诱导β-联蛋白靶基因表达。

25 发明详述

本文公开的方法、组合物和实验用于鉴别和分析化合物和组合物及其治疗骨矿化障碍和疾病的用途。这样的障碍或疾病包括但不限于骨发育病、骨折(例如脊骨、髌骨、腕骨或盆骨骨折、楔形骨折、

压迫性和粉碎性骨折)、年龄相关的骨丢失、软骨营养障碍(例如软骨发育不全、致死性骨发育不全、FGFR-2 突变的 Jackson-Weiss 综合症和 FGFR-1 突变的 Pfeiffer 综合症)、药物诱导性骨病(例如糖皮质激素诱导的骨丢失)、高骨代谢、高血钙、骨肥厚、骨髓炎、骨质疏松、骨硬化症、中锥高、前高、中高或后高减低、Paget 病或本文论述的任何其它障碍和疾病。

1. 定义和缩写

1.1 定义

10 所述“患者”意指任何动物。优选的动物包括禽、鱼、哺乳动物和啮齿动物。其它类别的动物包括驯养动物或农业动物(例如家禽,如小鸡、火鸡、鸭和鹌鹑,以及猪、绵羊、山羊、猫、水牛等)。优选的哺乳动物包括马、猪、绵羊、山羊、牛和灵长类动物,优选的灵长类动物是人。

15 所述“物质”和“试剂”意欲包括优选调节 Wnt 通路或其成员的化合物或组合物。

所述“参比化合物”意欲包括调节 Wnt 通路、更优选同时调节 Wnt 通路和骨重建的可用作对照的化合物。参比化合物包括但不限于甲状旁腺激素(PTH)和 GSK 抑制剂。

20 所述“调节”意指通过上调或下调蛋白、蛋白编码核酸、通路(例如 Wnt 通路)、通路中的蛋白等的活性而改变的能力。

所述“骨细胞调节”意欲包括骨密度和/或骨矿化的调节。可通过评价骨矿化、碱性磷酸酶诱导或成骨细胞诱导的变化体外确定骨细胞的调节。可通过任一种相同的体外研究方法,以及通过骨扫描研究骨质密度的变化,或通过染色组织样品的 β -联蛋白或本文描述的其它骨调节标记物研究 Wnt 通路活性的变化,评价体内骨调节。

25 术语“力”、“载荷”、“压力”和“应变”在本文可交互使用,涉及在力学中倾向于维持或改变体位或扭曲体位的任一种动作

的力的原理，该术语在本文可与载荷交互使用。以每单位面积量度的力定义为“压力”，在本文中也称为“机械压力”，并可根
据力(载荷)如何施加而分类为压力、张力或剪切力。具体地说，如果施加载荷使材料变得更短，则表现为压力，而材料被拉伸时则表现为张力。
5 当材料的一个区域相对于相邻区域滑动时则表现为剪切力。压力的结果被定义为形变，相对形变的百分率或长度的变化定义为“应变”。
例如，如果一种材料被拉伸至其原长的 101%，则其应变为 0.01 或 1%。因为应变没有单位，所以其或者以相对形变报告，其中 0.01 的应变
等于 1%形变，或者以微应变报告，其中 10,000 微应变等于 0.01 应
10 变或 1%形变(Turner 等, *Bone*, 14: 595-608 (1993))。

所述“Wnt 通路”意欲包括 Wnt 蛋白活性下游或上游的任何蛋白(参见图 16)。例如，其应当包括 LRP5、LRP6、Dkk、GSK-3、Wnt10B、
Wnt6、Wnt3 (例如 Wnt 3A)、Wnt1 或本文讨论的任何其它蛋白，以及编码这些蛋白的基因。所讨论的 Wnt 通路还意欲包括 Wnt 下游所有
15 参与骨重建的通路，例如 LRP5 或 HBM 通路、Dkk 通路、 β -联蛋白通路、MAPKAPK2 通路、OPG/RANK 通路等。

所述“GSK 抑制剂”指任何抑制 GSK 活性的物质。这些物质包括非选择性 GSK 抑制剂，例如 LiCl 或其它锂盐，以及选择性 GSK
抑制剂。优选的 GSK 抑制剂是 GSK-3 抑制剂。更优选的 GSK 抑制
20 剂是 GSK-3 同种型特异性抑制剂，例如 GSK-3 β 或 GSK-3 α 抑制剂。
其它的抑制剂包括但不限于单克隆或多克隆抗体或其免疫活性片段、肽适体、GSK 结合蛋白、GSK 核酸的反义分子、RNA 干扰分子、
吗啉代寡核苷酸、肽核酸(PNA)、核酶和肽。

所述“Dkk1 拮抗剂”意欲包括但不限于在 Wnt 通路中抑制 Dkk1
25 活性的单克隆或多克隆抗体或其免疫活性片段、肽适体、GSK 结合
蛋白、GSK 核酸的反义分子、RNA 干扰分子、吗啉代寡核苷酸、肽
核酸(PNA)、核酶和肽。

所述“Wnt 3A 激动剂”意欲包括上调 Wnt 3A 合成和/或活性的试

剂。所述“Wnt 3A 模拟物”是指优选以可见于实施例 9 的方式模拟 Wnt3A 活性的分子。所述“Wnt 3A 变体”包括在给予载荷时可增强对 Wnt/ β -联蛋白反应的活化作用的任何功能变体。

5 所述“骨失调”或“骨病”表示包括其中患者的骨矿化稳态已被有害破坏的失调。有害破坏可为增加骨矿化形式和降低骨矿化形式。骨失调包括本文论述的任一种失调。优选的骨失调包括骨质丢失和骨矿化稳态丢失。例如，优选的骨失调和骨病包括但不限于骨质疏松、骨折、软骨营养障碍、药物诱导性骨病、高骨代谢、高血钙、骨肥厚、骨关节炎、骨髓炎和 Paget 病。优选的骨折包括但不限于
10 于腕骨骨折、Colle 骨折或脊椎粉碎性骨折。优选的药物诱导性疾病包括但不限于糖皮质激素诱导性骨质疏松、肝素诱导性骨质疏松、氢氧化铝诱导性骨软化、镇痉剂诱导性骨软化或格鲁米特诱导性骨软化。

所述“骨细胞”意欲包括组织培养物细胞(“培养细胞”)或得自骨组织的细胞。这样的细胞包括但不限于成骨细胞、前成骨细胞、骨
15 原细胞、破骨细胞、骨细胞、间充质干细胞或其任意组合。所述骨组织意欲包括这些细胞的组合，其同样可由骨活组织检查获取。

所述“骨重建”是指骨生长和代谢的过程。所述“骨重建物”是指调节骨重建的化合物或组合物。该物质优选增强骨重建，使骨
20 矿化被增强，骨吸收被抑制。因此，这类物质还可包括“骨矿化调节物”。骨重建既可在体内研究，也可在体外研究。

所述“骨矿化”是指在骨中形成羟磷灰石的过程。本文考虑了调节骨中形成的羟磷灰石量的骨矿化调节试剂。例如，骨矿化激动剂应增加需要其的患者中形成的羟磷灰石的量。骨重建既可在体内
25 研究，也可在体外研究。

所述“LRP5 通路”和“HBM 通路”是指任何含 LRP5 或 HBM 突变体的蛋白/基因以及 LRP5 或 HBM 突变体下游参与与骨重建相关的信号转导的蛋白。本发明优选的物质是用于治疗骨丢失相关性疾

病的 LRP5 通路激动剂。还考虑了为相关的 LRP6 通路激动剂的物质。因为 LRP5 和 LRP6 之间极大的相似性,所以提及的所有 LRP5 和 HBM 调节也设想用于 LRP6。

5 所述“HBM”意欲包括高骨质以及与 HBM1 家族相关的表型。在人 LRP5 中,有一种突变 G171V 产生可在 HBM1 家族中观测到的表型。但是,在该位点的任何突变都设想用于人 LRP5 基因,或任何哺乳动物 LRP5 基因或在 LRP6 的 β -螺旋中的等同位点。

10 所述“HBM 表型”意欲包括所有产生表型(如在 HBM1 家族中观测到的表型)的突变。突变可位于人 LRP5 的残基 171,或 LRP5 中的其它位点或 LRP6 中相似位点,其在动物中表达时诱导高骨质。

所述“ β -联蛋白通路”是指任何包含 β -联蛋白和参与与骨重建相关的信号转导的 β -联蛋白下游蛋白的蛋白/基因。本发明优选的物质是活化 β -联蛋白通路的物质(即 β -联蛋白激动剂)。

15 所述“MAPKAPK2 通路”是指任何包含 MAPKAPK2 和参与与骨重建相关的信号转导的 MAPKAPK2 下游蛋白的蛋白/基因。

所述“OPG/RANKL 通路”是指任何包含 OPG/RANKL 或参与与骨重建相关的信号转导的 OPG/RANKL 下游蛋白的蛋白/基因。

20 所述“Dkk 通路”意欲包括任何参与 Dkk-1 和 LRP5 和/或 LRP6 相互作用的蛋白/基因,该相互作用是 Wnt 通路的一部分。Dkk-1 抑制 LRP5 活性。因此对骨丢失疾病来说,优选 Dkk-1 拮抗剂。

25 “蛋白”是指通过肽键连接在一起的氨基酸残基的聚合物。本文使用的该术语是指任意大小、结构或功能的蛋白、多肽和肽。但是,通常蛋白至少为 6 个氨基酸长。优选地如果蛋白为短肽,则其至少为约 10 个氨基酸残基长。“蛋白”还包括天然、重组或合成蛋白。该术语还可用于指蛋白片段。蛋白可为单一分子,或者可为多分子复合物。术语蛋白还可应用于其中一个或多个氨基酸残基为对应天然氨基酸的人工化学类似物的氨基酸聚合物。所使用的术语“蛋白”还包括其中一个或多个氨基酸残基为未对应于任何天然氨基酸

的“非天然”氨基酸的氨基酸聚合物。蛋白优选具有涉及骨重建和/或骨矿化的生物活性。

5 所述“蛋白的片段”或“蛋白片段”指为另一种蛋白的一部分的蛋白/多肽。例如，蛋白片段可为通过消化分离自培养细胞的全长蛋白所获得的多肽。蛋白片段通常包含至少 6 个氨基酸。片段更通常包含至少 10 个氨基酸。片段优选包含至少约 16 个氨基酸。这样的蛋白片段优选具有生物活性。所述生物活性优选调节对骨矿化产生调节的 Wnt 通路。

10 所述“免疫球蛋白”意欲包括抗体、抗体片段和为抗体一部分的重组蛋白。使用的术语“抗体”指免疫球蛋白，无论是天然的，还是全合成或部分合成产生的。该术语还包括保持对抗原的特异结合能力的其所有衍生物。该术语还包括任何具有与免疫球蛋白结合结构域同源或基本上同源的结合结构域的蛋白。这些蛋白可来自天然来源，或部分或全部合成产生。抗体可为单克隆或多克隆抗体。
15 抗体可为任意免疫球蛋白型中的一员，包括人型中的任一种：IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE，以及亚型(例如 IgG1、IgG2)。但是，本发明优选 IgG 型来源。

术语“抗体片段”指少于全长的任意抗体衍生物。抗体片段优选保留全长抗体特异性结合能力的至少有效部分。抗体片段的实例
20 包括但不限于 Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、Fv、dsFv 双抗体和 Fd 片段。抗体片段可通过任何方法产生。例如，抗体片段可通过片段化完整抗体而酶法或化学法产生，或者可由编码部分抗体序列的基因重组产生。或者，抗体片段可全部或部分合成产生。抗体片段任选为单链抗体片段。或者，片段可包含例如通过二硫键连接在一起的多条
25 链。片段还可以任选为多分子复合物。功能性抗体片段通常包含至少约 50 个氨基酸，更通常包含至少约 200 个氨基酸，或者在这些值之间的任何长度。

“单链 Fv” (“scFv”)是仅由可变轻链(V_L)和可变重链(V_H)组成

5 的重组抗体片段，可变轻链和可变重链相互之间通过多肽接头共价连接。 V_L 或 V_H 均可为 NH_2 -末端结构域。多肽接头长度和组成可变，只要两个可变结构域在没有严重立体干扰的情况下桥接。通常，接头主要由甘氨酸和丝氨酸残基骨架组成，并散布有一些利于溶解性的谷氨酸或赖氨酸残基。

“双抗体”是二聚体 scFv。双抗体的组分通常具有比大多数 scFv 短的肽接头，它们表现出结合成二聚体的偏向性。

10 “Fv” 片段是由一个 V_H 和一个 V_L 结构域组成的抗体片段， V_H 和 V_L 结构域通过非共价作用保持在一起。术语 “dsFv” 在本文用于指具有分子内工程二硫键以稳定 V_H - V_L 对的 Fv。

“F(ab')₂” 片段是和用胃蛋白酶于 pH 4.0-4.5 消化免疫球蛋白(通常为 IgG)所获得的片段基本等同的抗体片段。该片段还可以重组产生。

15 “Fab'” 片段是和还原 F(ab')₂ 片段中连接两个重链部分的一个或多个二硫键所获得的片段基本等同的抗体片段。Fab' 片段也可以重组产生。

“Fab” 片段是和用木瓜蛋白酶消化免疫球蛋白(通常为 IgG)所获得的片段基本等同的抗体片段。Fab 片段也可以重组产生。Fab 片段的重链段是 Fd 部分。

20 术语“蛋白捕获剂”指自身可结合蛋白的分子或多分子复合物。蛋白捕获剂优选以大致特异性的方式结合其结合配偶体。蛋白捕获剂的解离常数(K_D)优选小于约 10^{-6} 。抗体或抗体片段特别适于用作蛋白捕获剂。抗原也可以用作蛋白捕获剂，因为它们能够结合抗体。结合蛋白配体的受体是另一种可能的蛋白捕获剂实例。要理解的是，
25 蛋白捕获剂不限于仅通过非共价作用与其结合配偶体相互作用的物质。蛋白捕获剂还可以任选地共价连接至它们结合的蛋白。例如，蛋白捕获剂在结合后可光交联其结合配偶体。

术语“结合配偶体”是指由特定的蛋白捕获剂优选以大致特异

性的方式结合的蛋白。在某些情况下，结合配偶体可为一般由蛋白(为蛋白捕获剂)体内结合的蛋白。但是，在其它实施方案中，结合配偶体可为蛋白或肽，通过其选择(通过体内或体外选择)或产生(例如抗体的情况)蛋白捕获剂。结合配偶体可由一种以上的蛋白捕获剂分享。

5 例如，由多种多克隆抗体结合的结合配偶体可携带多种不同的表位。一种蛋白捕获剂也可以结合多种结合配偶体(例如，假设多个结合配偶体具有相同的表位)。

“适于蛋白结合的条件”指允许蛋白及其结合配偶体在溶液中发生结合的条件(以盐浓度、pH、去污剂、蛋白浓度、温度等表示)。

10 该条件优选严格得不出现大量的非特异性蛋白结合。

“阵列”是在基质上以一定样式排列的实体。尽管该样式经常为二维样式，但该样式也可三维样式，以使材料更大量地应用于阵列基质。

术语“基质”指本发明阵列的主体、基础和中心材料。基质

15 为核酸、抗体、免疫球蛋白和其它化合物粘附的材料。

术语“显微机械加工”和“微细加工”都指用于产生微细结构(特征为毫米以下规模尺寸的结构)的多种技术。这样的技术包括但不限于激光消融、电沉积、物理和化学的汽相沉积、光蚀刻以及湿化学和干蚀刻。还包括相关的技术，例如注塑和LIGA(例如X射线蚀刻、

20 电沉积和制模)。这些技术中的大部分最初都被开发用于半导体、微电子和微电机系统(MEMS)，但也可应用于本发明。

术语“涂层”指在基质表面上天然或合成形成或施加在基质表面上的一层。例如，基质如硅暴露于空气导致暴露的表面氧化。在基质由硅制造的情况下，在暴露于空气时在表面上形成二氧化硅涂

25 层。在其它情况下，涂层不是由基质产生，而是可通过机械、物理、电子或化学方法置于表面上。这类涂层的实例是应用于硅或聚合基质的金属涂层或应用于硅基质的氮化硅涂层。尽管涂层可为任意厚度，但涂层厚度通常小于基质厚度。

“中间层”是位于首个涂层和基质之间的其它涂层或层。任选可一起使用多个中间层。典型中间层的主要目的是要帮助首个涂层和基质之间粘附。例如，钛或铬中间层用于将金涂层粘附到硅或玻璃表面上。但是，预期中间层还有其它可能存在的功能。例如，某些中间层可在阵列检测系统中起作用(例如绝缘基质和绝缘涂层之间的半导体层或金属层)。

“亲合标记物”是能够直接或间接地将多肽固定到有机薄膜暴露官能团上的官能部分。亲合标记物优选能够位点特异性固定化，由此增强多肽或核酸在有机薄膜上的定向。在某些情况下，亲合标记物可为单纯的化学官能团。其它可能的亲合标记物包括核酸、氨基酸、聚合(氨基酸)标记物或全长蛋白。再其它可能的亲合标记物包括碳水化合物和核酸。例如，亲合标记物可为与另一种在有机薄膜上用作官能团的多核苷酸或另一种用作连接物的多核苷酸杂交的多核苷酸。亲合标记物还可为合成化学部分。如果每片有机薄膜都包含液体双层或单层，则膜锚定物是合适的亲合标记物。亲合标记物可共价或非共价连接至蛋白。例如，如果亲合标记物共价连接至多肽，则其可通过化学偶联或作为融合蛋白连接。亲合标记物还可以通过可切割键连接至蛋白。或者，亲合标记物可不直接与多肽接触。可由连接物替代性地分隔亲合标记物与蛋白。通过非共价作用或通过共价键，亲合标记物可将蛋白固定在有机薄膜上。

“连接物”对于本发明目的是将亲合标记物连接至阵列薄膜上的固定化蛋白的任意实体。连接物可以但不是必须地为同时非共价连接亲合标记物和蛋白的分离分子。连接物可替代性地共价连接亲合标记物或蛋白或这二者(例如通过化学偶联或作为融合蛋白)。典型的连接物为蛋白，例如全长蛋白、多肽或肽。其它可能的连接物包括碳水化合物和核酸。

术语“融合蛋白”指由两种或更多种多肽组成的蛋白：尽管其天然态通常未结合，但其各自的氨基和羧基端通过肽键结合，形成

单一连续的多肽。要理解地是，所述两种或更多种多肽组分或者直接连接，或者通过肽接头/间隔物间接连接。

5 术语“正常生理条件”指在活体生物或细胞中典型的条件。尽管已认识到某些器官或生物具有极端条件，但生物体外和胞内的环境一般在 pH 7 左右(即由 pH 6.5 至 pH 7.5)变化，含有水作为主要溶剂，并保持在 0℃以上和 50℃以下的温度。应当认识到，各种盐的浓度取决于用作参比的器官、生物体、细胞或细胞区室。正常生理条件可进一步包含骨组织和骨细胞中的载荷和非载荷状态。

10 “蛋白质组学”指对蛋白质组或蛋白质组某些部分的研究或特征鉴定。“蛋白质组”是细胞或细胞群胞内蛋白以及由细胞或细胞群分泌的蛋白的总收集物。该特征鉴定最通常包括检测细胞表达的蛋白存在与否以及通常的量。还可以研究蛋白在细胞中的功能、结构特征(例如翻译后修饰)和定位。“功能蛋白质组学”指对细胞或细胞群的蛋白表达产物的功能特征、活性水平和结构特征的研究。

15

1.2 缩写

ACP5	酸性磷酸酶 5
Akt-3	蛋白激酶 B (PKB)或 RAC-PK
ALPASE	碱性磷酸酶
AP1	连接蛋白相关蛋白 1
AP1B1	连接蛋白复合物 AP-1, β 1 亚单位
AXIN	轴蛋白
b.i.d.	<i>bis in die</i> (每日两次)
BGN	骨特异性双糖链蛋白聚糖
BMP1	骨形态发生蛋白 1
BMP4	骨形态发生蛋白 4
BMU	骨重建单位
BSA	牛血清白蛋白

BTG2	B 细胞易位基因 2, 抗增殖
CBFB	核结合因子 β
CCND1	细胞周期蛋白 D1
CCND3	细胞周期蛋白 D3
CCNI	细胞周期蛋白 I
CELSR2	钙粘着蛋白 EGF LAG 七跨膜 G 型受体 2
CHUK/IKK α	保守的螺旋-环-螺旋遍在激酶, I κ B 激酶 α
CK1 α	酪蛋白激酶 1, α 1
CKB	肌酸激酶, 脑
CNK1	KSR 样连接物增强子
Col1A1	胶原蛋白, 1 型, α 1
Col3A1	胶原蛋白, 3 型, α 1
Col6A3	胶原蛋白, VI 型, α 3
Connx43	连接蛋白 43
COX-2	环加氧酶-2
CRABP2	细胞视黄酸结合蛋白 II
CSF1R	集落刺激因子 1 受体
CSPG2	硫酸软骨素蛋白聚糖
CTGF	结缔组织生长因子
CTSK	组织蛋白酶 K
CX3CR1	趋化因子(C-X3-C)受体 1
Cyclin D1	也参见 CCND1
DELTEX	Deltex 同系物 2 (果蝇), 参见 EphB2
DMSO	二甲基亚砷
DVL1	蓬乱的(Disheveled), dsh 同系物(果蝇)
EDTA	乙二胺四乙酸
EGTA	乙二醇- <i>O-O'</i> -双(2-氨基-乙基)- <i>N,N,N'N'</i> -四乙酸
EPHB2	KSR 样连接物增强子(果蝇 ras 激酶抑制物)

EPHB6	Eph 受体 B6
ERBB3	GRO1 癌基因
ERK	也称为促分裂原活化的蛋白激酶 p44/42 (MAPK)
FAP	成纤维细胞活化蛋白, α
FBLN1	纤蛋白 1
FBS	胎牛血清
FGF-2	成纤维细胞生长因子(碱性)
FGF-7	成纤维细胞生长因子 7 (角化细胞生长因子)
FOS	FBJ 鼠骨肉瘤病毒癌基因同系物
FOSL1	Fos-样抗原 1
Frizzled2	卷曲蛋白(果蝇)同系物 2, 也叫做 FZD2
FZD2	卷曲蛋白(果蝇)同系物 2
G171V	在人 LRP5 的 171 位甘氨酸至缬氨酸的突变
GADD45A	生长停滞和 DNA 损伤诱导蛋白, α
GADD45B	生长停滞和 DNA 损伤诱导蛋白 45, β
GADD45G	生长停滞和 DNA 损伤诱导蛋白 45, γ
GAS6	生长停滞特异性 6
GJA1	缝隙连接膜通道蛋白 α 1 (也称为连接蛋白 43)
GJB3	缝隙连接膜通道蛋白 β 3
GSK-3	糖原合酶激酶-3
GSK-3 α	糖原合酶激酶-3, α 同种型
GSK-3 β	糖原合酶激酶-3, β 同种型
iGSK	GSK 抑制剂
iGSK-3	GSK-3 抑制剂
HBM	高骨质
HERPUD1	高半胱氨酸诱导的、内质网压力诱导的泛素样结构域成员 1
HRT	激素替代疗法

i.m.	肌肉
i.v.	静脉内
IDB2	DNA 结合抑制剂 2
IDB3	DNA 结合抑制剂 3
IGF2	胰岛素样生长因子 2 (生长调节素 A)
IGF2R	胰岛素样生长因子 2 受体
IGFBP6	胰岛素样生长因子结合蛋白 6
IL-1	白介素-1
IL1R1	白介素-1 受体, I 型
IL1RL1	白介素-1 受体样 1
IL4RA	白介素 4 受体, α
IL-6	白介素-6
ITGA5	整联蛋白 α 5 (纤连蛋白受体 α)
ITGB5	整联蛋白, β
ITGBL1	整联蛋白, β 样 1
JNK	c-jun 氨基激酶通路
JUN	v-jun 禽肉瘤病毒 17 癌基因同系物
JUND1	Jun 原癌基因相关基因 d1
LBD	LRP5 的配体结合结构域
LDLR	低密度脂蛋白受体
LOX	赖氨酰氧化酶
LRP5	低密度脂蛋白受体-相关蛋白 5
LRP6	低密度脂蛋白受体-相关蛋白 6
LSP1	淋巴细胞特异性蛋白 1
LUM	腔蛋白聚糖
MAPK	促分裂原活化的蛋白激酶(p42,44)(ERK)
MAPKAPK2	促分裂原活化的蛋白激酶活化的蛋白激酶 2, 也称为 MK2

MCC	结直肠癌中的突变
MDSC	间充质源性干细胞
MET	<i>met</i> 原癌基因(肝细胞生长因子受体)
MMP-14	基质金属蛋白酶 14
MMP-9	基质金属蛋白酶 9
MSX1	同源框, <i>msh</i> 样 1
MYBL1	<i>v-myb</i> 成髓细胞瘤病毒癌基因同系物(禽)-样 1
MYC	<i>v-myc</i> 禽骨髓细胞瘤病毒癌基因同系物
MYCS	Myc-样癌基因, s-myc 蛋白
NCAM1	神经细胞粘附分子 1
NFATC1	活化 T 细胞的核因子, 胞质 1
NFKB1	B 细胞中的 κ 轻链基因增强子的核因子, p105
Non-TG	非转基因的
NOS3	一氧化氮合酶 3 (NOS3), 也称为 eNOS
NR4A1	核受体亚家族 4, A 组, 成员 1
OGN	osteoglycin
OPG	护骨蛋白
OSMR	制癌蛋白 M 受体
p.o.	<i>per os</i> (经口)
PCOLCE	前胶原 c-蛋白酶增强蛋白
PDGFA	Cluster Incl. M29464: 血小板衍生的生长因子 α
PDGFRA	血小板衍生的生长因子受体 α 多肽
PKA	蛋白激酶 A
PKC	蛋白激酶 C
PLAT	组织型纤溶酶原激活物, t-PA
PRDC-	与 DAC 和 Cerberus 相关的蛋白
PENDING	
PTGIS	前列腺素合酶

PTGS1	前列腺素-内过氧化物合酶 1, 也叫做 COX-1
PTGS2	前列腺素-内过氧化物合酶 2 (前列腺素 G/H 合酶或环加氧酶 2)或 COX-2
PTH	甲状旁腺激素
q.d.	<i>quaque die</i> (每天)
q.h.	<i>quaque hora</i> (例如每 24 小时、每 6 小时)
q.o.d.	<i>quaque altera die</i> (每隔一天)
RAMP3	受体(降钙素)活性修饰蛋白 3
RANK	NF-κB 受体活化剂
RANKL	NF-κB 配体的受体活化剂
RNAi	RNA 干扰
RUNX1	runt 相关转录因子 1
RUNX2/CBFA1	runt 相关转录因子 2
s.c.	皮下
S100A10	与依钙蛋白类似的钙结合蛋白
SDC1	多配体聚糖 1
SDF1	基质衍生因子 1
SERM	选择性雌激素受体调节物
SERPINE1	丝氨酸(或半胱氨酸)蛋白酶抑制剂, 分化体 E (连接蛋白, 纤溶酶原活化物抑制剂 1 型), 成员 1
SFRP1	分泌性卷曲相关蛋白 1
SFRP4	分泌性卷曲相关蛋白 4
shRNA	小发夹 RNA
siRNA	小干扰 RNA
SPARC	sparc/骨粘连蛋白
SPARCL1	SPARC-样 1 (mast9, hevin)
SPP1	分泌性磷蛋白 1
SPR	表面等离子共振

STAT1	信号转导和转录激活蛋白 1
STAT3	RIKEN cDNA 1110034C02 基因
TANK	TRAF 家族成员相关的 Nf- κ B 活化剂
TG	转基因的
TGFB1	转化生长因子, β 1
TGFB2	转化生长因子, β 受体 II
THBD	凝血调节蛋白
THBS1	血小板反应蛋白 1
TIEG	TGFB 诱导性早期基因
TIMP1	金属蛋白酶组织抑制剂
TIMP2	金属蛋白酶组织抑制剂 2
TIMP3	金属蛋白酶组织抑制剂 3
TNF	肿瘤坏死因子
TNFRSF10B	肿瘤坏死因子受体超家族, 成员 10b
TNFRSF11B	肿瘤坏死因子受体超家族, 成员 11b (护骨蛋白)
TNFSF11	肿瘤坏死因子(配体)超家族, 成员 11 (参见 RANKL)
TOB1	ErbB-2.1 的转导物
TRAF3	TNF 受体相关因子 3
TUNEL	末端脱氧核苷酸转移酶 dUTP 切口末端标记法
UNK_D83402	前列腺素 I ₂ (前列腺环素)合酶
VCAM1	血管细胞粘附分子 1
VEH	载体
WIF	Wnt 抑制因子
WISP1	WNT1 诱导性通路蛋白 1
WISP2	WNT1 诱导性信号转导途径蛋白 2
wk	周
Wnt	无翅型 MMTV 整合位点

Wnt 3A	无翅型 MMTV 整合位点家族成员 3A
Wnt6	无翅型 MMTV 整合位点家族成员 6
Wnt10B	无翅型 MMTV 整合位点家族成员 10B

2. 骨载荷基因表达谱

5 本发明的一个新方面阐明了 Wnt 通路涉及骨矿化稳态，并且通过调节该通路也可以调节矿化。同时使用体内和体外实验阐明骨载荷的基因表达谱。最通常地是制作与 Wnt 信号转导途径直接或间接相关的各种基因的基因表达谱(即被上调和下调的基因的鉴别)，更具体地说是制作其基因特征谱(即基因转录物相互之间上调和下调的量)。

10 进行本文公开的基因表达分析(参见以下的另外章节以及实施例)，发现许多基因在骨载荷和增强的骨载荷作用下被上调，最特别地包括 COX-2、eNOS、连接蛋白 43、Fos、Jun 和 SFRP1 (其它的基因列于下文的表中)。进一步确定了β-联蛋白是经典 Wnt 通路中的必需组分。该通路一旦活化，β-联蛋白就不再磷酸化。非磷酸化形式的β-联蛋白在胞质中累积，并转运至核中。一进入核中，β-联蛋白就可解除靶转录因子的抑制剂，包括 TCF 和 LEF，并又激活转录。

20 信号转导途径激动剂(即 Wnt 通路激动剂)包括但不限于 GSK 抑制剂。其它的信号转导途径抑制剂包括但不限于 Wnt 3A、Wnt 3A 模拟物、Wnt 3A 激动剂、PKC 抑制剂(例如 SQ22536)、PKA 抑制剂(例如 H89, Calbiochem)、MEK1/2 抑制剂(例如 Calbiochem 的 U0126、PD98059)、P38 MAPK 抑制剂(例如 SB203580, Calbiochem)、JNK 抑制剂(Calbiochem 的 SP-600125)、MAPKAPK2 抑制剂(Calbiochem 目录号 No. 3850880)、钙动员抑制剂(例如 TMB-8 HCl)、G 蛋白偶联的信号转导抑制剂(例如百日咳毒素)、一氧化氮合酶抑制剂(例如 L-NAME)和 COX-2 抑制剂(例如 NS-398、吲哚美辛)。

25 因此，以上讨论的激动剂和拮抗剂都可用作研究工具来研究

(1)Wnt 通路; (2)与骨稳态相关的 Wnt 通路信号转导; (3)针对骨稳态的 Wnt 通路调节; (4)其它信号转导途径协同 Wnt 通路信号转导的影响; (5)骨载荷反应以及体内和体外的骨载荷基因表达谱; 以及(6)骨稳态及其调节。所述试剂例如可用于鉴别新的骨合成代谢基因靶; 其还可用于治疗需要进行骨稳态调节的患者。例如, Wnt 通路激动剂可用于治疗骨丢失, 而 Wnt 通路拮抗剂可用于治疗例如在骨质疏松症中观察到的骨矿化升高的病症。

2.1 基因表达谱分析

通过分析基因向 RNA 的转录, 进行基因表达谱分析。进行此工作的优选方法是利用实时 PCR 和 TaqMan®方法学。实时 PCR 提供了快速且可重现的制作刺激作用下的转录谱和基因转录特征的方法, 尤其是在刺激后的即时时间点。该方法因此对分析骨细胞对骨载荷的反应特别有用。检测到的信号与反应中的 PCR 产物量成正比。通过记录每个循环的荧光发射量, 可监测 PCR 指数阶段的 PCR 反应, 其中 PCR 产物的第一次显著增加与靶模板的初始量相关联。

因此, 实时 PCR 和 TaqMan®技术的应用还允许对同一平板上的多个靶进行分析, 只要所有的引物对都使用相同的热循环参数。因此可获得对多个基因的分析, 例如在骨压力刺激作用下表现出被上调和下调的基因。本文以及实施例公开了使用实时 PCR 的方法。其它的方法也是技术人员已知的。参见例如 RAPID CYCLE REAL-TIME PCR: METHODS AND APPLICATION (S. Meuer et al., eds., Springer Verlag 2001)和 RAPID CYCLE REAL-TIME PCR-METHODS AND APPLICATIONS (W. Dietmaier et al., eds., Springer Verlag 2002)。

尽管实时 PCR 是进行基因表达谱分析的优选方法, 但也可使用其它的 RNA 分析和定量方法。其它的 RNA 表达分析方法是本领域已知的, 包括 eTAG (ACLARA Biosciences)、RNA 印迹分析、S1 核酸酶分析、RNA 酶保护实验和蛋白质印迹(在蛋白质水平上观察变

化)。进行这些实验的方法是本领域已知的。参见例如 USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Harlow, Ed and Lane, David (Cold Spring Harbor Press, 1999); Sambrook et al., MOLECULAR CLONING : A LABORATORY MANUAL (2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989); 和 Maniatis et al., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 1982)。

可对培养生长的细胞进行基因表达谱分析, 用于体外分析骨载荷, 以及体内分析得自骨组织的细胞中的转录。以下进一步论述体内和体外分析中给予骨刺激的方法。简而言之, 获得未载荷细胞、给予载荷的细胞、给予 Wnt 通路调节物的细胞、静止和给予载荷的 HBM 细胞以及得自 HBM 转基因(TG)或正常动物的先前类别细胞的基因表达谱和特征。汇编得自各个细胞群的基因表达谱, 这既提供了通过其可进行物质筛选的单个基因表达谱和基因特征组, 也提供了一组优化的基因表达谱, 其提供了一组被上调和下调的基因, 它们和观察到在天然骨刺激作用下被上调和下调的基因是同一组基因。

由以下的参数组获得骨基因表达谱:

- (1)无载荷的体外细胞培养物;
- (2)经受载荷刺激的体外细胞培养物;
- (3)在给予 Wnt 通路活性调节化合物后经受载荷刺激的体外细胞培养物;
- (4)得自经受载荷的 HBM 动物的细胞;
- (5)得自经受载荷和 Wnt 通路调节化合物的 HBM TG 动物的细胞;
- (6)得自经受载荷的非 TG 动物的细胞;
- (7)得自经受载荷和 Wnt 通路调节物的非 TG 动物的细胞; 和
- (8)得自未经受载荷的 TG 或非 TG 动物的细胞。

根据由各个细胞组获得的数据, 获得基因表达谱(即被上调和下调的

基因的指示)和基因表达特征(即和静止状态相比基因表达上调和下调的程度)。由这些数据获得核心基因组,其构成了响应骨载荷时经常被上调和下调的基因。

以下的表对由以上各个参数获得的基因表达谱进行了分类。

5

表 1
HBM 基因表达谱

<u>基因</u>	<u>通路</u>	<u>观测到的 HBM 基因型</u> <u>对基因表达的作用</u>
ACP5	HBM	在 HBM 细胞中被上调
Coll1A1	HBM	无显著作用
连接蛋白 43	Wnt	无显著作用
CTSK	HBM	在 HBM 细胞中被上调
细胞周期蛋白 D1	Wnt	无显著作用
ENOS	载荷传感物	无显著作用
卷曲蛋白 2	Wnt	无显著作用
GADD45A	HBM	在 HBM 细胞中被下调
IGF2	HBM	在 HBM 细胞中被下调
IGFBP6	HBM	在 HBM 细胞中被上调
IL-6	载荷传感物	在 HBM 细胞中被下调
IL-8	压力和破骨细胞功能	在 HBM 细胞中被下调
MK2	压力和破骨细胞功能	在 HBM 细胞中被下调
OPG	压力和破骨细胞功能	无显著作用
骨粘连蛋白	HBM	无显著作用
PTGS2	载荷传感物	无显著作用
RANKL	压力和破骨细胞功能	无显著作用
SFRP1	Wnt	在 HBM 细胞中被上调
SFRP4	Wnt	在 HBM 细胞中被上调

TGFβ	HBM	在 HBM 细胞中被上调
TIMP3	HBM	在 HBM 细胞中被上调
WISP2	Wnt	在 HBM 细胞中被上调
Wnt10B	Wnt	在 HBM 细胞中被上调

表 1 所述“压力和破骨细胞功能”指为压力反应型的基因以及破骨细胞发生和功能所必需的基因。用于表 1 的术语“载荷传感物”是指文献已知的对机械载荷起反应的基因。用于表 1 和整个申请中的术语“HBM 特征”意欲包括一组基因，其在表达 HBM 突变的细胞系中或在被感染的人 HBM1 家族个体中差异性表达。

表 2

对比 HBM TG 和非 TG 动物的载荷对体内基因表达的作用

<u>基因</u>	<u>通路</u>	<u>载荷对基因表达的作用</u>
ACP5	HBM	在雄性 HBM-TG 中同等地被上调，在雌性 HBM-TG 中更显著地被诱导
CollA1	HBM	在二者中均无显著变化
连接蛋白 43	Wnt	被上调；在 HBM-TG 中更显著
CTSK	HBM	在两种动物中同等地被上调
细胞周期蛋白 D1	Wnt	被上调；在 HBM-TG 中更显著
ENOS	载荷传感物	被上调；在 HBM-TG 中更显著
卷曲蛋白 2	Wnt	被上调；在 HBM-TG 中更显著
GADD45A	HBM	在两种动物中都被下调
IGF2	HBM	在两种雄性动物中都被上调
IGFBP6	HBM	被上调；在 HBM-TG 中更显著
IL-6	载荷传感物	被上调；在 HBM-TG 中更显著
IL-8	压力和破骨细胞功能	被上调；在 HBM-TG 中更显著
<u>基因</u>	<u>通路</u>	<u>载荷对基因表达的作用</u>

LRP5	-	在二者中均无显著变化
MK2	压力和破骨细胞功能	仅在非 TG 动物中被上调
OPG	压力和破骨细胞功能	仅在 HBM-TG 动物中被上调
骨粘连蛋白	HBM	被上调; 在 HBM-TG 中更显著
PTGS	载荷传感物	被上调; 在 HBM-TG 中更显著
RANKL	压力和破骨细胞功能	在二者中均无显著变化
SFRP1	Wnt	被上调; 在 HBM-TG 中更显著
SFRP4	Wnt	被上调; 在 HBM-TG 中更显著
TGFβ	HBM	在二者中均无显著变化
TIMP3	HBM	在二者中均无显著变化
WISP2	Wnt	被上调; 在 HBM-TG 中更显著
Wnt10B	Wnt	被上调; 在 HBM-TG 中更显著

表 3
载荷对体外基因表达的作用

<u>基因</u>	<u>基因类型</u>	<u>MC3T3 细胞对 重力载荷的反应</u>
AP1B1	压力调节型基因	被上调
AXIN	Wnt 通路组分	被上调
BMP1	观测到由 iGSK-3 诱导	被上调
CBFB	成骨细胞功能	被上调
CCND1	Wnt 靶基因	被上调
CCND3	细胞周期	被上调
CELSR2	G-型受体	被上调
CHUK/IKK α	促进β-联蛋白核转运	被上调
CK1 α	Wnt 通路组分	被上调
<u>基因</u>	<u>基因类型</u>	<u>MC3T3 细胞对</u>

重力载荷的反应

CKB	激酶	被上调
CRABP2	成骨细胞分化	被上调
CSF1R	破骨细胞发生	被上调
CTGF	生长因子	被上调
DVL1	Wnt 信号转导中间体	被上调
EPHB6	Wnt 靶基因	被上调
FOSL1	压力调节型基因	被上调
GADD45B	细胞周期	被上调
GADD45G	细胞周期	被上调
GJA1	Wnt 靶基因	被上调
GJB3	Wnt 靶基因	被上调
HERPUD1	Wnt 靶基因	被上调
IGFBP6	IGF 结合蛋白	被上调
IL1R1	IL-1 介导的信号转导, 炎症	被上调
IL1RL1	IL-1 介导的信号转导, 炎症	被上调
IL4RA	炎症	被上调
ITGA5	整联蛋白信号转导	被上调
JUN	压力调节型基因	被上调
JUND1	压力调节型基因	被上调
LDLR	脂蛋白受体	被上调
LOX	赖氨酰氧化酶	被上调
MAPKAPK2	压力调节信号转导中的激酶	被上调
MSX1	Wnt 靶基因	被上调
MYCS	Wnt 靶基因	被上调
NCAM1	Wnt 靶基因	被上调
NFATC1	炎症	被上调
<u>基因</u>	<u>基因类型</u>	<u>MC3T3 细胞对</u>

重力载荷的反应

NFKB1	炎症，增殖	被上调
PDGFA	生长因子，成骨细胞发育	被上调
PRDC-PENDING	Cereberus 样蛋白	被上调
PTGS1	炎症	被上调
PTGS2	Wnt 靶基因	被上调
RAMP3	钙信号转导	被上调
RUNX	成骨细胞功能	被上调
RUNX2/CBFA1	成骨细胞功能	被上调
SDC1	Wnt 信号转导必需的蛋白聚糖	被上调
SERPINE1	蛋白酶	被上调
SPARCL1	成骨细胞功能	被上调
STAT3	增殖和细胞生长	被上调
TANK	炎症，NF- κ B 信号转导	被上调
TGFB1	TGF β 信号转导基因	被上调
THBD	内皮细胞功能	被上调
TIEG	TGF β 信号转导基因	被上调
TIMP1	基质金属蛋白酶	被上调
TIMP3	基质金属蛋白酶	被上调
TNFRSF11B/OPG	Wnt 靶基因	被上调
TRAF3	NF- κ B 信号转导	被上调
WISP1	Wnt 靶基因	被上调

在对培养的 MC3T3 细胞施加重力载荷的作用下，以上列出的基因被调节。

表 4

在有和没有 Wnt/ β -联蛋白通路活化剂 iGSK-3 时

使用 FlexerCell 载荷的作用

治疗/基因	CCND1	CXN43	SFRP1	Wnt10b	eNOS	COX-2	FOS
无 iGSK/无载荷	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
无 iGSK+载荷	3.64	3.39	3.05	2.76	2.35	2.48	3.20
iGSK 0.05 μ M +载荷	3.80	4.27	3.04	3.70	2.54	2.56	3.66
iGSK 0.2 μ M +载荷	4.39	4.42	3.36	3.53	2.65	2.74	3.76
iGSK 1 μ M +载荷	5.17	4.76	3.59	3.69	3.06	3.16	4.51**
iGSK 5 μ M +载荷	6.93*	5.38	5.41*	4.40*	4.33*	6.50**	6.20**
iGSK 20 μ M +载荷	7.13**	7.72**	10.00**	6.95**	5.95**	8.17**	10.77**

“*” 表示接近载荷 2 倍的诱导。“**” 表示等于或大于载荷 2 倍的诱导。

5 对于其它的获得上调和下调的基因，参见本文提供的实施例和其它表。

3. 研究体内骨载荷的方法

3.1 骨研究

10 为理解作为 HBM 突变合成代谢特性基础的机制，使 HBM 转基因(TG)小鼠经受体内机械载荷，以探究与其非转基因(非-TG)对照同窝小鼠相比的基因表达变化。这可通过获得已给予骨载荷刺激的动物的胫骨和颅盖进行，但也可使用其它合适的骨，包括但不限于尺骨、股骨和椎骨。RNA 得自给予载荷刺激后的 HBM TG 和非 TG 同窝小鼠。然后由颅盖或胫骨(或其它骨)中提取出 RNA，并在动物之间进行对比(即静止状态和载荷刺激后的 HBM TG 和非 TG 小鼠)。

15 观察到 HBM 小鼠的 Wnt 通路基因反应明显比其非 TG 同窝小鼠对照大。由该观测结果可推断，HBM 突变使骨对机械载荷更敏感。在体内载荷刺激下产生的一个基因特征组包含连接蛋白 43、骨粘连蛋白、护骨蛋白、eNOS、COX-2、前列腺素合酶(PTGS)、白介素-6
20 (ILK-6)、细胞周期蛋白 D1、Wnt 10B、SFRP1 和 SFRP4 的上调。其

它的基因也被上调，如下文和实施例的更详细论述。

诱导骨载荷刺激的方法包括实施例论述的四点载荷系统。其它的体内给予载荷的方法是本领域已知的(例如三点载荷系统)，也可如一般技术人员已知的一样使用。

5 用在 HBM TG 小鼠中获得的以上表达谱或本文论述的其它基因的任意组合，可在非 TG 和 HBM TG 动物中筛选物质，以确定具体物质是否增强 Wnt 通路的活化并由此增强骨矿化。用于研究矿化增强物的几个阳性对照包括 PTH 和通过活化 Wnt 通路增强矿化的 GSK-3 抑制剂 3-(3-氯-4-羟基苯基氨基)-4-(2-硝基苯基)-1-*H*-吡咯-2,5-
10 二酮。本文描述的其它 GSK-3 抑制剂也可用作阳性对照。

除了由经受载荷刺激和/或 Wnt 通路调节的动物获得基因表达谱和特征之外，还可以研究由载荷和/或 Wnt 通路调节产生的动物骨病理学变化。例如，颅盖厚度的变化(或其它骨厚度的变化)或本文任一表中列出的、在单独的或与一种或多种骨重建调节化合物组合的骨
15 载荷刺激作用下被上调或下调的任何 RNA 或蛋白的蛋白表达变化。

可例如通过以约 0.01 mg/kg/天至约 100 mg/kg/天的量给予动物测试物，对颅盖骨进行分析。更优选物质以约 0.1 mg/kg/天至约 50 mg/kg/天的量提供。例如可以约 0.5、10 和 50 mg/kg/天给予动物物质。通常，以每组 6 只小鼠的批次给予小鼠物质(研究中共有 72 只小鼠)，
20 并在给予后 5、15 和 30 天进行研究。甲状旁腺激素(PTH)可用作阳性对照，GSK-3 抑制剂 3-(3-氯-4-羟基苯基氨基)-4-(2-硝基苯基)-1-*H*-吡咯-2,5-二酮也可用作阳性对照。在存在和不存在这些试剂的情况下给予骨载荷刺激后，可检测颅盖尺寸的差异。

其它研究骨病理变化的方法对本领域技术人员来说是显而易见的。
25 然后可将骨的这些病理学变化与体内和体外获得的基因表达谱和基因特征谱以及进一步相关的数据进行对比。如前所述，基因表达谱可通过本文论述的任何方法获得，或可通过普通技术人员明显了解的方法获得。

尽管对以上讨论的任何基因都可测试其在骨载荷刺激下的调节活性,但优选进行评测的基因包括但不限于: SFRP1、TIMP3、GJA1、CTSK、Col1A1、CCND1、TIMP2、GADD45A、WISP2、FZD2、SFRP4、IGFBP6、LRP5、LRP6、IL6、IGF2、SPARC、MAPKAPK2、TNF、TNFRSF11B、TNFSF11、PTGS2 (COX-2)、eNOS、GRO1 和 Wnt10B。另外参见在本文任何表中列出的、在单独的或与一种或多种骨重建调节化合物组合的骨载荷刺激作用下被上调或下调的基因。

4. 体外研究骨载荷的方法

本发明的一个方面是研究体外骨载荷的作用以及可增强骨载荷好处(即增加骨矿化)的方法。研究骨载荷增强既可在体内进行(如上所述),也可在体外进行。骨载荷增强优选首先在体外进行,然后进行如上文所述的体内实验。

因此,本发明的一个方面包括将细胞置于模拟载荷刺激的条件。有几种方法可将应变作用于细胞培养物,以模拟在体内观测到的骨载荷反应。这些方法包括但不限于流体剪切、静水压、单轴拉伸、双轴拉伸、重力载荷以及使用 Flexercell®或等同体系诱导的载荷。

4.1 骨载荷刺激

由例如以上任何方法提供的骨载荷刺激调节的基因优选包括但不限于 SFRP1、连接蛋白 43、CCND1、Wnt10b、Jun、Fos、PTGS2 (COX-2) 和 eNOS。其它可监测其活性增加(例如 mRNA 转录物和蛋白增加)的基因如本文表中的许多基因所示。至少有 6 个基因表现出在骨载荷作用下始终被上调(即 Jun、Fos、eNOS、SFRP1、COX-2 和连接蛋白 43),这些基因也被加入 Wnt 通路活化物增强。加入 Wnt 通路活化试剂(例如 GSK-3 抑制剂和 Wnt 3A 及其激动剂、模拟物和变体)没有增强其它基因如 Wnt2,其仅对骨载荷有反应。

4.1.1 流体剪切刺激

一种诱导骨载荷的方法是利用流体剪切。流体剪切包括通过搅拌装置产生持续层流剪切的锥板式粘度计。或者，流动回路装置可在平行流动培养腔中产生这样的剪切。后一方法和装置以 Flexcell International Corporation 生产的 Streamer 系统举例说明。还已知流动回路装置产生可重现和一致的刺激。缺点仅仅是终点通常短暂以及这些变化是否影响分化成骨细胞的功能(Basso et al., *Bone* 30 (2):347-51 (2002))。

4.1.2 静水压刺激

诱导骨载荷的第二种方法是使用静水压。静水压利用压缩空气产生持续或间歇性力，这些力被认为特异性地定向于细胞与胞外基质蛋白/粘附蛋白相互作用的区域。

4.1.3 单轴拉伸刺激

体外诱导骨载荷的第三种方法是使用单轴拉伸刺激。单轴拉伸方法利用一个方向的拉伸力。该方法包括在已处理的聚苯乙烯薄膜条或其它薄膜条上的组织培养物中培育细胞，其中所述薄膜条固定在柔软的硅氧烷层上。硅氧烷层还连接有两个金属棒。使用电磁铁或一些其它移动方法可使金属棒彼此之间被操控。该方法不产生任何流体剪切。没有流体剪切使该方法较不优选，因为间质液流动在骨重建中起的作用比机械拉伸大。因此，该方法不能完全模拟体内发生的情况，尽管其产生可重现且一致的刺激(Basso et al., *Bone* 30 (2):347-51 (2002))。

4.1.4 双轴拉伸刺激

双轴拉伸基本上就是本文论述的 Flexercell®系统。该方法利用胶原蛋白包被的硅橡胶膜，细胞在其上生长。然后将板置于特制的连接真空泵的盘中。真空泵通过拉伸或扭曲细胞膜来拉伸和松弛膜。另外，任何介质或流体移动都将进一步增加流体剪切。

4.1.5 重力载荷刺激

重力载荷是另一种可体外诱导骨载荷的方法。力基本上作用于细胞上,使细胞变扁。关于其它细节,参见例如 Hatton et al., J. Bone & Min. Res. 18 (1):58-66 (2003); 和 Fitzgerald et al., Exp. Cell. Res. 228:168-71 (1996)。具体地说,在板上或盖玻片上培养细胞,然后暴露于渐增的 G 力。

4.1.6 Flexercell®刺激

评价基于试剂的 Wnt 通路和骨矿化增强的一个优选方法是使用 Flexercell®系统,其是一种双轴拉伸刺激。简而言之,使骨细胞(例如 MC3T3 细胞)承受 3,400 $\mu\epsilon$ 。也可将约 50 $\mu\epsilon$ 至约 5,000 $\mu\epsilon$ (以及在此之间的任何值)的载荷用作机械载荷刺激。在该范围内的任何刺激都模拟生理骨载荷刺激。5,000 $\mu\epsilon$ 以上的刺激产生病理生理学载荷,因此不被优选。细胞还可在承受双轴拉伸之前接触 Wnt 通路调节物(例如 GSK 抑制剂)。

通过单独给予或连同 GSK 抑制剂一起给予载荷而被上调的基因包括但不限于 COX-2、eNOS、连接蛋白 43 和 SFRP1。由 Flexercell®研究体外获得的表达谱酷似体内载荷基因表达谱(即对 HBM TG 小鼠胫骨细胞进行 RNA 分析,其中使用四点系统对小鼠进行骨载荷)。因此,该机械载荷实验或使用本文公开的各种细胞系的其它机械载荷方法的应用,可用于鉴别调节并优选活化经典 Wnt 通路以及模拟 HBM 表型的小分子、肽、免疫球蛋白等。

诱导细胞上的机械压力刺激的体外方法也可用于研究细胞增殖和凋亡,其与骨重建以及成骨细胞和破骨细胞的增殖和破骨细胞吸收的需要相关。例如,可将 HBM 和未改变的成骨细胞接种入 Bioflex 6 孔平板中,在含 10% FBS 的生长培养基中培养 2-3 天,直至细胞约 60%汇合。在机械载荷前 24 小时,用 1 mL 含约 2 至约 4% FBS 的基

本培养基替换培养基。然后使细胞承受约 50 至约 5,000 μg 的载荷约 1 至约 5 小时。

在载荷后,再培养细胞一段时间。随后,使用各种商业实验或本领域已知的实验评测细胞数和增殖情况,其中所述实验包括但不限于⁵ $[^3\text{H}]$ -胸腺嘧啶掺入、5-溴-2'-脱氧尿苷(BrdU)掺入、3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧甲氧基苯基)-2-(4-磺基苯基)-2H-四唑盐(triazolium salts)(MTS)实验、TUNEL 实验(即末端脱氧核苷酸转移酶 dUTP 切口末端标记法)或膜联蛋白 V 实验。

可使用以上论述的体外骨载荷方法,分析其它的 Wnt 通路激动剂增强骨载荷的能力,其中所述其它的 Wnt 通路激动剂包括本文讨论的其它 GSK-3 抑制剂化合物、天然 Wnt 通路配体、合成配体、小分子以及已知的拮抗剂 Cerebrus、SFRP 和 WIF (Wnt 抑制因子)。已知的 Wnt 通路活化剂包括 Wnt1 和 Wnt 3A、小分子 Wnt 模拟物、与 LRP5 相互作用并活化 Wnt 信号转导的肽适体。优选的肽适体包括:

适体

适体序列(氨基端至羧基端)

262 METDTLLLWVLLLWVPGSTGDGSMDSKIIHLTDDSFDTDVLKADG
AILVDFWAEWCGPNSGGGGMIWEAWSCYACGTSGPCKMIAPILD
EIADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAAT
KVGALSKGQLKEFLDANLA

15 在另一个实施方案中,可筛选或使用 Wnt 拮抗剂治疗需要骨去矿化(例如骨硬化症)的个体。Wnt 拮抗剂包括但不限于 Dkk1 拮抗剂。

4.2 细胞培养物

可进行体外载荷实验的细胞包括但不限于以下人细胞系: U2OS 细胞(ATCC)、MG-63 细胞(ATCC)、SAOS-2 细胞(ATCC)、HOS-TE85 细胞(ATCC)、HOB03CE6 细胞(Wyeth)、HOB01C1 前骨细胞(Wyeth)和人初级成骨细胞。另外,细胞可由任何哺乳动物体系培养。优选的用于研究的动物系包括大鼠和小鼠骨细胞。例如,可用于以上任何方法的小鼠骨细胞包括但不限于实施例讨论的 MC3T3 细胞(ATCC)

和初级成骨细胞，或任何与以上人细胞系类似的细胞系。可用于任何公开的体外压力诱导方法的大鼠细胞包括但不限于 UMR-106 细胞 (ATCC)、ROS17/2.8 细胞和初级成骨细胞，或任何与以上人细胞系类系的细胞系。培养这些细胞的方法是技术人员已知的。参见例如 IAN FRESHNEY, CULTURE OF ANIMAL CELLS- A MANUAL OF BASIC TECHNIQUE (4th ed., Wiley-Liss, New York, 2000)。

在本发明的另一方面，可由骨取出细胞，细胞可包括成骨细胞、破骨细胞和骨细胞以及祖细胞和干细胞。优选的成骨细胞及其祖细胞和干细胞包括成熟的成骨细胞、前成骨细胞(成熟的和未成熟的)以及间充质干细胞(也称为间充质衍生的干细胞，MDSC)。

在本发明的另一方面，得自 HBM 和未改变个体的人细胞系可与本文讨论的骨载荷方法学联用。这些细胞系可用于研究由在 HBM 和非转基因小鼠上进行的体内载荷实验鉴别的基因诱导。

4.3 TCF 荧光素酶实验

TCF 荧光素酶实验系统也可用于监测 Wnt 信号转导活性。用于 TCF 荧光素酶实验的构建物可如本领域所知的制备。例如，可使用 Kozak 和引导肽分泌的信号序列，在 pcDNA3.1 中表达 Wnt 通路蛋白如 LRP5、LRP6 和 HBM 等。

一制备出构建物，就将细胞如成骨细胞和 HEK293 细胞接种在孔板中，并用构建物 DNA、CMV β -半乳糖苷酶质粒 DNA 和 TCF 荧光素酶报告基因 DNA 转染。然后裂解细胞，检测细胞的 β -半乳糖苷酶和荧光素酶活性，以确定 Wnt 通路互作蛋白或其它分子如抗体是否影响 Wnt 信号转导。关于使用 TCF-荧光素构建物的方法的其它细节由以下实施例提供。

在另一个实施方案中，Flexercell[®]机械细胞载荷系统(或任何体外诱导细胞上的载荷的方法)可与 TCF 荧光素酶报告基因系统或其它报告基因系统联用，以检测机械载荷对 Wnt 通路的作用。这样的实验

可如下进行。对于这些实验，如上所述平板接种 MC3T3 细胞(或本文讨论的另一种等同细胞)，培养 3 天或直至汇合。然后将培养基更换为含 BSA 的无血清培养基或含 α MEM 的低血清培养基(1% FBS)。然后对在此低或无血清培养基上的细胞再诱导 24 小时。在机械载荷前约 1 小时，一个平板用 1 剂 Wnt 通路调节物(例如 GSK 抑制剂、天然 Wnt 配体，包括但不限于 Wnt 1 和 Wnt 3A)预处理，而另一个平板未处理。在用任何 Wnt 模拟配体、小分子等预处理后，接着如前所述使细胞承受机械载荷(例如 3,400 μ E)约 5 小时。在载荷后即时和载荷后 24 小时，如上所述使用 Qiagen 小型试剂盒由载荷和未载荷的对照样品收集 RNA。

然后对各个时间点的载荷特征组基因进行实时 PCR (或任何本领域已知的合适 RNA 实验)，以观察处理对基因表达的改变。或者，可使用技术人员已知的其它方法或本文讨论的方法分析 RNA。

5. 阵列

利用涉及骨重建及其调节的 Wnt 通路的基因表达谱和特征的一种方法为制备的核酸和蛋白阵列形式。然后可使用这些阵列进一步研究 Wnt 通路及其与骨重建的关系。这些阵列还可用于筛选通过 Wnt 通路调节骨重建的物质。

5.1 核酸阵列

如本领域技术人员已知的制备核酸阵列。制备和使用这些阵列的方法描述于例如 P. Baldi et al., DNA MICROARRAYS AND GENE EXPRESSION: FROM EXPERIMENTS TO DATA ANALYSIS AND MODELING (Cambridge University Press 2002) ; 和 DNA MICROARRAYS: A MOLECULAR CLONING MANUAL (David Bowtell and Joseph Sambrook, eds., Cold Spring Harbor Laboratory, 2002)。

优选的核酸阵列包含的核酸与表 1-5 或图 16 中的任何基因的 Wnt

信号转导途径成员相对应。例如，这种阵列可包含 2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50 或更多(或在此之间的任何整数值)个涉及骨重建的基因。这样的基因包括任何表中、实施例中列出的任何受调节基因，或者是图 16 所示通路的一部分。

5 这些核酸是与骨载荷反应相关的核酸的示例。

在另一个实施方案中，可制备包含 Wnt 通路骨重建基因和参与例如血钙调节、破骨细胞凋亡、成骨细胞增殖等的基因的阵列。

表 5

10 用于开发高骨质微阵列或蛋白/抗体阵列的基因清单

基因	描述	表达位置
ACP5	酸性磷酸酶 5，酒石酸盐抗性	骨和结肠癌
CCND1	细胞周期蛋白 D1 (PRAD1; 甲状旁腺腺瘤 1)	HBM 骨
CNK1	v-erb-b2 成红细胞白血病毒癌基因同系物 3 (禽类)	骨和结肠癌
COL1A1	胶原蛋白，I 型，α1	HBM 骨
COL6A3	胶原蛋白，VI 型，α3	HBM 骨
CTGF	结缔组织生长因子	HBM 骨
CTSK	组织蛋白酶 K (致密性骨发育不全)	HBM 骨
CX3CR1	趋化因子(C-X3-C)受体 1	骨炎症
DELTEX	Deltex 同系物 2 (果蝇), EphB2	骨和结肠癌
EPHB2	KSR 样连接物增强子(果蝇 ras 激酶抑制物)	骨和结肠癌
基因	描述	表达位置
ERBB3	GRO1 癌基因(黑素瘤生长刺激活性，α)	骨和结肠癌

FAP	成纤维细胞活化蛋白, α	骨和结肠癌
FBLN1	纤蛋白 1	HBM 骨
FGF-2	成纤维细胞生长因子 2 (碱性)	骨炎症
FGF-7	成纤维细胞生长因子 7 (角化细胞生长因子)	骨炎症
FOS	fos FBJ 鼠骨肉瘤病毒癌基因同系物	骨和结肠癌/载荷敏感基因
FZD2	卷曲蛋白(果蝇)同系物 2	HBM 骨
GADD45A	生长停滞和 DNA 损伤诱导蛋白, α	HBM 骨
GAS6	生长停滞特异性蛋白 6	HBM 骨
GJA1	缝隙连接蛋白, α 1, 43 kD (连接蛋白 43)	HBM 骨
IGF2	胰岛素样生长因子 2 (生长调节素 A)	骨炎症
IGF2R	胰岛素样生长因子 2 受体	骨炎症
IGFBP6	胰岛素样生长因子结合蛋白 6	HBM 骨
IL-6	白介素 6 (干扰素, β 2)	骨炎症
ITGB5	整联蛋白, β 5	HBM 骨
ITGBL1	整联蛋白, β 样 1 (具有 EGF 样重复序列结构域)	HBM 骨
JUN	v-jun 禽肉瘤病毒 17 癌基因同系物	骨和结肠癌/载荷敏感基因
LOX	赖氨酰氧化酶	HBM 骨
LRP5	低密度脂蛋白受体-相关蛋白 5	HBM 骨
	<u>基因</u>	<u>描述</u>
		<u>表达位置</u>
LRP6	低密度脂蛋白受体-相关蛋白	HBM 骨

6		
LSP1	淋巴细胞特异性蛋白 1	骨炎症
MAPKAPK2	促分裂原活化的蛋白激酶活化的蛋白激酶 2	破骨细胞活性
MCC	结直肠癌中的突变	骨和结肠癌
MET	Met 原癌基因(肝细胞生长因子受体)	HBM 骨
MYBL1	v-myb 成髓细胞瘤病毒癌基因同系物(禽)-样 1	HBM 骨
MYC	v-myc 禽骨髓细胞瘤病毒癌基因同系物	骨和结肠癌
Enos	一氧化氮合酶 3 (内皮细胞)	载荷反应型基因
OSMR	制癌蛋白 M 受体	HBM 骨
PDGFRA	血小板衍生的生长因子受体, α 多肽	HBM 骨
PTGS2/COX-2	前列腺素-内过氧化物合酶 2 (前列腺素 G/H 合酶和环加氧酶)	载荷反应型基因
SFRP1	分泌性卷曲相关蛋白 1	HBM 骨
SFRP4	分泌性卷曲相关蛋白 4	HBM 骨
SPARC	sparc/骨粘连蛋白, cwcw 和 kazal 样结构域蛋白聚糖(睾丸蛋白聚糖)	骨炎症
STAT1	信号转导和转录激活蛋白 1, 91 kD	骨炎症
<u>基因</u>	<u>描述</u>	<u>表达位置</u>
TGFBR2	转化生长因子, β 受体 II (70-80 kD)	骨炎症

THBS1	血小板反应蛋白 1	HBM 骨
TIMP2	金属蛋白酶组织抑制剂 2	HBM 骨
TIMP3	金属蛋白酶组织抑制剂 3 (Sorsby 眼底营养不良,假炎症)	HBM 骨
TNF	肿瘤坏死因子(TNF 超家族, 成员 2)	破骨细胞活性
TNFRSF10B	肿瘤坏死因子受体超家族, 成员 10b	骨炎症
TNFRSF11B/OPG	肿瘤坏死因子受体超家族, 成员 11b (护骨蛋白)	破骨细胞活性
TNFSF11/RANKL	肿瘤坏死因子(配体)超家族, 成员 11	破骨细胞活性
UNK_D83402	前列腺素 I2 (前列腺环素)合 酶	HBM 骨
VCAM1	血管细胞粘附分子 1	骨炎症
WISP2	WNT1 诱导性信号转导途径 蛋白 2	HBM 骨
WNT10B	无翅型 MMTV 整合位点家 族, 成员 10B	骨和结肠癌
WNT6	无翅型 MMTV 整合位点家 族, 成员 6	HBM 骨

5 核酸阵列优选包含两个或更多个对应于观测到在“HBM 骨”中表达的基因的序列。这样的阵列可包含至少 2、3、4、5、10、15、20、25、30 或更多(以及在此之间的任意整数值)种序列, 这些序列在骨载荷作用下被上调或下调, 如表、实施例或图 16 所示。可制备类似的为高骨质特异性的蛋白/抗体阵列, 其包含的蛋白、肽和/或免疫球蛋白结合表 5 列出的至少 2、3、4、5、10、15、20、25、30 或更多(以及在此之间的任意整数值)种蛋白, 或结合涉及本文讨论的任一通路

的任何蛋白。

5.1.2 DNA 微阵列构建

在杂交前经常需要扩增核酸样品。合适的扩增方法包括但不限于聚合酶链反应(PCR) (Innis, et al., PCR PROTOCOLS. A GUIDE TO METHODS AND APPLICATION. ACADEMIC PRESS, Inc. San Diego, (1990))、连接酶链反应(LCR)(参见 Wu et al., *Genomics*, 4:560 (1989); Landegren et al., *Science*, 241:1077 (1988); 和 Barringer et al., *Gene*, 89:117 (1990))、转录扩增(Kwoh et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1173 (1989))和自动维持序列复制(Guatelli et al., *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 87:1874 (1990))。

在一个优选实施方案中, 通过检测一个或多个连接至样品核酸的标记检测杂交的核酸。标记可通过任何本领域众所周知的众多方法掺入。但是, 优选标记在制备样品核酸的扩增步骤中同时掺入。因此, 例如, 使用标记引物或标记核苷酸的聚合酶链反应(PCR)将产生标记的扩增产物。在一个优选实施方案中, 如上所述使用标记核苷酸(例如荧光素标记的 UTP 和/或 CTP)的转录扩增将标记掺入到转录的核酸中。

或者, 可将标记直接加入到最初的核酸样品(例如 mRNA、聚核苷酸 mRNA、cDNA 等)中, 或在完成扩增后直接加入到扩增产物中。连接标记物至核酸的方法是本领域技术人员周知的, 包括例如缺口翻译或末端标记(例如用标记 RNA), 方法是加入激酶到含核酸的反应混合物中, 随后将连接样品核酸的核酸接头连接至标记物(例如荧光团)。

适用于本发明的可检测标记物包括任何通过光谱学、光化学、生物化学、免疫化学、电、光或化学方法可检测的组合物。本发明使用的标记物包括用标记的链霉抗生物素蛋白缀合物染色的生物素、磁珠(例如 Dynabeads™)、荧光染料(例如荧光素、Texas 红、罗

丹明、绿色荧光蛋白等)、放射性标记(例如 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^{32}P)、酶(例如辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶和其它常用于 ELISA 的酶)以及量热标记物, 例如胶体金或有色玻璃或塑料(例如聚苯乙烯、聚丙烯、胶乳等)珠。讲述这种标记物应用的专利包括美国专利 No. 3,817,837、3,850,752、3,939,350、3,996,345、4,277,437、4,275,149 和 4,366,241。

得自其它基因如 COX-2 的参比序列可在全长基因组至单独染色体、附加体、基因、基因组分(例如外显子或调节序列)至少量核苷酸之间广泛变化。参比序列通常约为 2、5、10、20、50、100、500、1000、5,000 或 10,000、20,000 或 100,000 (以及在此之间的任意整数值)个核苷酸。有时序列中只有特定区域才是目标区域。

本发明的方法使用寡核苷酸阵列, 其包含与一个或多个序列已知的选定参比序列(例如 eNOS、COX-2、Jun、Fox、连接蛋白 43、SFRP 或本文讨论的任何其它基因)互补的探针。通常, 这些阵列以高密度阵列(“芯片上的 DNA”)固定在固体表面上, 例如美国专利 5,143,854 和 PCT 专利说明书 WO 90/15070、WO 92/10092 和 WO 95/11995 所述, 这些文献每个都通过引用结合到本文中。

可利用各种策略将寡核苷酸探针阵列排列和展示在芯片上, 由此使可由靶核酸导出的杂交模式和序列信息最大化。代表性的展示和排列策略描述于 PCT WO 94/12305, 该专利通过引用结合到本文中。为了更充分描述, 下文简单描述了基本策略。

基本的叠瓦策略提供了一种固定化探针阵列, 用于分析与一种或多种选定参比序列显示出高度序列一致的靶序列。以再分为 4 个探针组的阵列为例说明该策略, 尽管由一个探针组(即与先前所述的参比序列互补的探针组)就显然可获得令人满意的结果。

第一个探针组包含多个探针, 这些探针与选定的参比序列完全互补。完全互补通常存在于整个探针长度上。但是, 也可使用具有一个或多个完全互补区段的探针, 这些区段两侧为与参比序列没有

互补性的前导序列或尾随序列。在互补区段中，第一个探针组中的每个探针都具有至少一个对应于参比序列中的核苷酸的探查位置(interrogation position)。即探针和参比序列排列得使二者之间的互补性最大时，对准探查位置与参比序列中的对应核苷酸。如果探针具有一个以上的探查位置，则每个都对应于参比序列中各自的核苷酸。探查位置和第一个探针组特定探针中的对应核苷酸的一致性不能简单地通过检查第一组中的探针来确定。显而易见地是，通过比较第一个探针组中的探针和其它探针组的对应探针的结构，确定探查位置和对应该核苷酸。

原则上，在参比序列互补区段的每个位置上探针都可具有探查位置。有时，当探查位置远离互补区段末端时，其提供更精确的数据。因此，互补区段长度为“x”的探针含有的探查位置通常不超过“x-2”。因为探针通常为 9-21 个核苷酸，并且通常探针全部都互补，所以探针通常具有 1-19 个探查位置。探针通常在探针中央或附近含有单个探查位置。

为了举例说明本发明，对于第一组中的每个探针，有最多 3 个来自另外三个探针组的对应探针。因此，有 4 个探针对应于参比序列中的各个目的核苷酸。4 个对应探针每个都具有与目的核苷酸对准的探查位置。通常，另外三个探针组的探针与第一个探针组的对应探针相同，但有一个例外。这个例外是至少一个(通常只有一个)探查位置由 4 个探针组中的不同核苷酸占据，其中所述探查位置出现在 4 个探针组中 4 个对应探针每一个的相同位置。例如，对于参比序列中的腺嘌呤(A)核苷酸，第一个探针组对应探针的探查位置由胸腺嘧啶(T)占据，而另 3 个探针组的对应探针其各自的探查位置由腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)或鸟嘌呤(G)占据，每个探针的核苷酸不同。当然，如果第一个探针组的探针包含与参比序列没有互补性的尾随或侧翼序列，则这些序列不需要存在于另 3 个探针组的对应探针中。同样，另 3 个组的对应探针可在互补性区段外部含有在第一个探针组的对

应探针中不存在的前导或尾随序列。有时候,另3个探针组的探针与第一个探针组对应探针的完全互补区段的连续子序列相同(探查位置除外)。在此情况下,子序列包含探查位置,其与全长探针的不同之处通常在于仅省略了互补区段末端的一个或两个末端核苷酸。即,如果第一个探针组的探针的互补区段长度为“n”,则其它组的对应探针通常包括长度至少为“n-2”的区段子序列。因此,子序列长度通常至少为3、4、7、9、15、21或25(以及在此之间的任意整数值)个核苷酸,最通常在9-21个核苷酸的范围内。子序列应足够长,或者杂交条件自身,使探针与在探查位置突变的参比序列变体的可检测杂交比其与参比序列的杂交更强烈。

探针可为寡脱氧核糖核苷酸(寡DNA)或寡核糖核苷酸(寡RNA),或能够通过互补碱基配对与靶核酸序列杂交的这些聚合物的任意修饰形式。互补碱基配对指序列特异性碱基配对,包括例如Watson-Crick碱基配对以及其它形式的碱基配对,例如Hoogsteen碱基配对。修饰形式包括2'-O-甲基寡核糖核苷酸以及所谓的PNA,在PNA中寡脱氧核糖核苷酸通过肽键而不是磷酸二酯键连接。探针可通过任意键连接基质(例如3'-、5'-或通过碱基)。3'连接更常见,因为该方向与固相合成寡核苷酸的优选化学反应相适。

在第一个探针组中的探针数目(以及由此而来的其它探针组的探针数目)取决于参比序列的长度、参比序列中目的核苷酸的数目以及每个探针的探查位置数目。一般来说,参比序列中每个目的核苷酸都需要在4个探针组中具有相同的探查位置。

在某些参比序列中,每个核苷酸都是目的核苷酸。在其它参比序列中,只有某些变体(例如突变或多态)集中的部分是目标。在其它参比序列中,只有特定的突变或多态以及紧邻的核苷酸是目标。通常,第一个探针组选择的探查位置对应于至少一个核苷酸(例如表现为点突变)和一个紧邻的核苷酸。通常,第一个探针组中探针的探查位置对应于至少3、10、50、100、1000、20,000、100,000、1,000,000、

10,000,000 (或在此之间的任意整数值)或更多个连续核苷酸。通常, 探针探查位置对应于参比序列核苷酸的至少 5、10、30、50、75、90、99 或有时 100% (以及在此之间的任意整数值)。第一个探针组中的探针经常完全覆盖参比序列, 并相对于参比序列彼此相互重叠。例如, 在一个常见排列中, 第一个探针组中的每个探针都与该组中的其它探针不同, 不同之处在于省略了与参比序列互补的 3'碱基, 得到了与参比序列互补的 5'碱基。

芯片上探针的数量可相当大(例如 10^5 - 10^6)。但是, 给定长度探针通常只有总数的相对较小的部分(即少于约 50%、25%、10%、5% 或 1%)被选择用来执行特殊的叠瓦策略, 在此情况下叠瓦策略应反映出骨载荷基因表达谱和骨载荷基因增强表达谱。例如, 完整的八聚体探针组包含 65,536 个探针; 因此, 本发明阵列通常少于 32,768 个八聚体探针。完整的十聚体探针阵列包含 1,048,576 个探针; 因此, 本发明阵列通常少于约 500,000 个十聚体探针。通常阵列的下限为 25、50 或 100 个探针, 探针可多至 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 等个探针。除探针以外, 阵列还可具有其它组分, 例如连接探针与支持体的接头。

使用仅一定比例的所有可能的给定长度探针的一些优势包括: (i) 阵列中的每个位置都高度信息化, 无论是否发生杂交; (ii) 非特异性杂交最小; (iii) 杂交差异和序列差异直接关联, 尤其是对于已知标准的杂交模式; 和(iv)使用高分辨率光刻法能够在合成过程中独立定位每个探针, 使阵列可针对任意序列进行设计和优化。例如, 任何探针的长度可独立于其它探针而变化。

尽管探针阵列通常如上所述以行和列铺设, 但芯片上探针的这种物理排列不是必须的。只要阵列中每个探针的空间位置是已知的, 则就可收集并处理探针的数据, 产生与芯片上探针的物理排列无关的靶序列。在处理数据时, 无论芯片上探针的物理排列如何, 各个探针的杂交信号都可被再认定为随后的数据缩减所需的任何概念阵

列。

芯片中可使用一定长度范围的探针。如上所述，探针可仅由互补区段组成，或者可具有一个或多个互补区段，这些区段与侧翼、尾随和/或插入区段并列。在后一种情况下，互补区段的总长度比探针长度更重要。从功能上说，第一个探针组的互补区段应足够长，以使探针与参比序列的可检测杂交比其与参比序列变体的杂交更强烈，其中所述参比序列变体在对应于探针探查位置的核苷酸处含有单碱基突变。同样，其它探针组的对应探针中的互补区段应足够长，以使探针与在探查位置具有单核苷酸置换的参比序列变体的可检测杂交比其与参比序列的杂交更强烈地。探针通常具有与参比序列完全互补(除了在探查位置可能不互补以外，这取决于探针组)的互补区段，其长度至少为 3 个核苷酸，更通常至少为 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25 或 30 或更多个碱基。

在某些芯片中，所有探针的长度都相同。其它芯片使用不同分组的探针组，在此情况下一个分组中的探针大小相同，但不同分组之间不同。例如，某些芯片具有两个分组，一个分组包含如上所述的 4 组探针，其中所有探针都是 15 聚体，另一分组包含 4 组探针，其中所有探针都是 20 聚体。当然，可加入其它的探针组。因此，某些芯片包含例如 15 聚体、20 聚体、26 聚体和 30 聚体大小的 4 个探针分组。其它芯片可在 4 组探针的同一分组中具有不同大小的探针。在这些芯片中，第一组中探针的长度相互独立地可变。其它组中的探针通常和第一组中占据相同列的探针长度相同。但是，有时候在 4 条道中的相同列位置可包含不同长度的探针。包含不同长度的探针是为了补偿探针的杂交信号，这些杂交信号依赖于寡核苷酸探针在反应的 pH、温度和离子条件下的杂交稳定性。

探针长度对辨别与靶序列完美匹配的探针和具有单个碱基错配的探针很重要。较短的探针通常分辨力较高。较短的探针通常较不

易形成二级结构。但是，较大探针的结合靶序列的绝对量以及由此产生的信号较大。最适当兼顾这些竞争因素的探针长度可根据例如靶 DNA 序列特定区域的 GC 含量、二级结构、合成效率和交叉杂交而有所变化。在靶序列的某些区域中，根据杂交条件，短探针(例如 11 聚体)可提供由较长探针(例如 19 聚体)不易获得的信息，反之亦然。最大序列信息可如上所述通过在芯片上包含几个分组的不同大小的探针获得。但是，对于靶序列中的许多区域来说，这样的策略提供了过剩的信息，即同一序列由不同分组的探针读取多次。由单个分组的不同大小探针可获得等量的信息，其中选择探针大小使在靶序列的特定区域可读取的序列最大化。

5.2 蛋白阵列

蛋白阵列的两种主要类型是正相阵列(即抗体、抗体片段、免疫球蛋白或肽被固定在基质上)和反相阵列(即细胞裂解物被固定在基质上，随后用例如抗体筛选)。可利用这些蛋白阵列快速筛选 Wnt 通路调节物、Wnt 通路活性增强物、不同刺激作用下骨蛋白表达、测定在不同刺激作用下骨中表达的其它蛋白等。

5.2.1 正相阵列

一种优选的方法是正相蛋白阵列，其含有一种或多种(优选一种以上)识别并结合任何表中所列基因的蛋白的抗体、抗体片段、免疫球蛋白或肽。因此，在一个方面，设想了一种阵列，其中在合适的基质上粘附有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多种对目的蛋白/多肽具有免疫活性的抗体、其免疫原性片段或免疫球蛋白多肽，或可识别并结合目的蛋白/多肽的其它肽，或其任意组合。然后在合适的条件下使细胞裂解物接触正相阵列，并通过本领域已知的方法检测结合配体的抗体。参见例如 MacBeath, *Nat. Genet. Suppl.* 32:526-32 (2002)。

正相阵列(也称为蛋白检测微阵列)可包含许多不同的亲合试剂, 它们以高空间密度排列在固相支持体上。每种物质都可捕获复杂混合物(例如血清、细胞培养液或细胞裂解物)中的其靶蛋白或多肽。然后检测并定量捕获的蛋白。正相阵列可演变为夹心阵列形式(即捕获免疫球蛋白是固定在固相支持体上的肽, 使用第二标记检测抗体检测结合蛋白)或抗原捕获阵列形式(即蛋白同样通过固定化抗体捕获, 但通常通过在用于阵列前化学标记蛋白的复杂混合物来直接检测捕获的蛋白)。至于论述, 参见 MacBeath, (2002)以及其中提及的参考文献。

在一个优选实施方案中, 固定在每片膜上的蛋白都是抗体或抗体片段。阵列的抗体或抗体片段任选为单链 Fv (scFv)、Fab 片段、Fab' 片段、F(ab')₂ 片段、Fv 片段、dsFv 双抗体、Fd 片段、全长抗体、抗原特异性多克隆抗体或全长单克隆抗体。在一个优选实施方案中, 阵列各膜片上的固定化蛋白为单克隆抗体、Fab 片段或 scFv。

抗体或抗体片段识别并结合以下的任何蛋白: (1)在骨载荷作用下被上调或下调的蛋白; (2) Wnt 通路蛋白; (3)在加入 Wnt 通路激动剂或拮抗剂作用下被上调或下调的 Wnt 通路蛋白; (4)在骨载荷刺激和/或激动剂/拮抗剂刺激作用下在 HBM TG 动物或 HBM 细胞系中表达的蛋白或(5)表中列出的描述为被上调和下调的基因/蛋白的任何蛋白。抗体或其片段更优选识别在增强的 Wnt 通路活性作用下被上调或下调的蛋白。被下调蛋白的抗体优选可检测被下调的蛋白存在与否, 或者可检测例如磷酸化模式的差异, 由此可检测蛋白的活性状态(例如 GSK-3 的磷酸化模式)。

这些免疫球蛋白阵列包含的免疫球蛋白优选识别 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50 和 100 或更多(在此之间的任意整数值)种在本文所述的各种条件下(例如施加载荷、载荷增强物等)被上调或下调的蛋白。因此, 这样的阵列可包含 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15 或更多种免疫球蛋白, 其识别由细胞

裂解物、细胞培养液或血清或细胞组分(例如核组分与胞质组分)中检测出的每种蛋白。抗体或其片段、免疫球蛋白或识别蛋白的肽或本文讨论的其它部分最好识别或结合在本文讨论的基因表达谱或基因表达特征中提及的任何蛋白。使用聚-L-赖氨酸或其它连接剂可将抗体点到阵列基质上。细节参见 Sreekumar et al., *Cancer Res.* 61:7585-93 (2001)。抗体微阵列是本领域已知的。参见例如使用夹心微阵列形式的 Silzel et al., (*Clin. Chem.* 44:2036-43 (1998))。

抗体和肽阵列通常使用喷墨打印技术制备, 其中打印机将单克隆抗体点在基质上, 形成特定量(例如 200 μ M)的点。或者, 可使用 96 孔聚苯乙烯微量滴定板以 3×3 模式制备抗体阵列, 来监测细胞中产生的蛋白。关于其它的点阵方法, 参见例如 Moody et al., *Biotechniques* 31:186-194 (2001); Huang et al., *Anal. Biochem.* 294:55-62 (2001); Wiese et al., *Clin. Chem.* 47:1451-7 (2001); Jenison et al., *Clin. Chem.* 47:1894-1900 (2001); Tam et al., *J Immunol Methods* 261:157-165 (2002); 和 Schweitzer et al., *Nature Biotechnol.* 20:359-65 (2002)。

5.2.2 反相阵列

在另一方面, 考虑使用反相阵列(也称为直接阵列), 其中骨细胞裂解物粘附在合适的细胞表面上, 然后使用免疫球蛋白或其它缀合可检测标记的物质筛选蛋白存在与否。骨细胞可得自细胞培养物或小鼠, 例如表达 HBM、人 LRP5、人 LRP6、联合敲除和敲入相同动物的 LRP5 和 LRP6 基因(单独或组合)的转基因小鼠或非 TG 同窝小鼠。其它细胞系可为已用表达 HBM 蛋白、LRP5、LRP6 或其它 Wnt 通路蛋白的核酸转染的瞬时转染细胞系。能够对基质上的裂解物斑点印迹进行筛选, 使反相裂解物阵列小型化。每块基质的点数根据裂解物被筛选的方式而有所变化。关于其它论述, 参见例如 Sreekumaretal., *Cancer Res.* 61:7585-93 (2001)。

裂解物一粘附在基质上, 就可以用可检测配体对其进行筛选, 所述可检测配体例如为抗体、RNA (如果已知蛋白结合 RNA 的话)、

DNA (如果已知蛋白结合 DNA 的话)、肽(已知与蛋白相互作用)、另一种蛋白等, 其中这些部分每个都可具有附着的可检测标记。

5 在本发明的另一方面, 可将混合的以上类型细胞裂解物置于阵列基质上。例如, 给予骨载荷刺激和/或 Wnt 通路调节物的动物裂解物可与细胞培养物的裂解物混合。细胞培养物的裂解物可为给予或不给予机械载荷的细胞的裂解物。其可为给予 Wnt 通路调节物和载荷的细胞培养物的裂解物或任意组合的细胞裂解物。这样的阵列可用于快速筛选在载荷和/或候选化合物作用下表达的、调节 Wnt 通路并由此调节骨重建的蛋白。

10

5.2.3 用于蛋白阵列的装置

对于任一种形式的阵列, 都可将可检测标记如放射性同位素、发色团、荧光团或化学发光物质连接至检测部分(例如第二检测抗体、肽等)。然后在合适的条件下将检测部分与微芯片温育, 以结合第一
15 抗体或抗原。

在洗去过量的探针蛋白后, 分析芯片表面的标记信号。信号检测表明标记蛋白与蛋白文库的一种或多种独有成员相互作用。然后可由芯片上的斑点位置(如果使用正相阵列的话)或通过可检测标记和结合的抗体(如果使用反相阵列的话)测定能够结合探针蛋白或其它探
20 针部分的蛋白的一致性。其它方法可用于检测蛋白-蛋白、蛋白-配体或蛋白-核酸的相互作用。例如, 当用于形成蛋白阵列的固体表面为金层时, 可使用表面等离子共振(SPR)检测表面的质量变化。在使用金层时, 寡核苷酸捕获探针上的反应部分是巯基(而不是氨基), 金表面不需要官能化来实现捕获探针连接。质谱(特别是 MALDI-TOF)也可用于分析结合蛋白文库独有成员的物质类别。
25

在另一个实施方案中, 本发明还提供蛋白包被的基质(例如抗体包被基质), 其含有多个膜片, 这些膜片分散地排列在基质上的已知区域(如果使用正相阵列的话), 其中每块膜片都包含具有不同的已知

序列的固定化蛋白，且其中每块膜片与相邻膜片的间隔都为约 50 nm 至约 500 μm 。在一个优选实施方案中，蛋白包被的基质包含 9 块或更多块膜片。

5 还设想了含蛋白包被基质的生物传感器、微电机设备以及医学设备，这些基质含有多个膜片，这些膜片分散地排列在基质上的已知区域，其中每块膜片都包含具有不同的已知序列的固定化蛋白，且其中每块膜片与相邻膜片的间隔都为约 50 nm 至约 500 μm 。

或者，可在裂解物区域设计不同的膜片，以使用不同的抗体进行筛选，每块膜片都是要筛选的各个不同目的细胞裂解物的其中一种(例如对照、体内样品、体外样品、骨载荷、骨载荷和已知的 Wnt 通路激动剂等)。因此，膜片可具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多种不同实验组的细胞裂解物，每个阵列基质有多块膜片。

15 在一个实施方案中，蛋白阵列包含多块分散排列在基质上已知区域的膜片，优选 9 块或更多块，其中每块膜片都包含具有不同的已知序列的固定化蛋白，且其中每块膜片与相邻膜片的间隔都为约 50 nm 至约 500 μm 。在一个优选实施方案中，膜片与相邻膜片的间隔为约 200 nm 至约 500 μm 。

在某些版本的阵列中，每块膜片的直径与膜片间隔距离成比例。因此，每块膜片的面积可为约 100 nm^2 至约 40,000 μm^2 。每块膜片的面积优选为约 1 μm^2 至约 10,000 μm^2 。

20 在一个阵列实施方案中，阵列含 9 块或更多块总面积约 1 cm^2 的膜片。在一个优选的阵列实施方案中，阵列含 100 块或更多块总面积约 1 cm^2 的膜片。在另一个实施方案中，阵列含 10^3 块或更多块总面积约 1 cm^2 的膜片。

25 在一个阵列实施方案中，固定在一块膜片上的蛋白与固定在同一阵列上的另一块膜片上的蛋白不同。例如抗一种磷酸化形式的 GSK-3 的抗体毗连抗不同磷酸化形式的 GSK-3 的抗体(如果使用正相蛋白阵列的话)。

在本发明阵列的一个替代性实施方案中，不同膜片上的蛋白是相同的。这些膜片可用作对照区。

阵列基质可为有机物或无机物、生物材料或非生物材料、或这些材料的任意组合。在一个实施方案中，基质是透明的或半透明的。

5 膜片驻留的基质表面部分优选为扁平 and 坚硬或半坚硬的。

多种材料都适合用作本发明阵列实施方案中的基质。例如，本发明阵列的基质可包含选自以下的材料：硅、二氧化硅、石英、玻璃、可控孔度玻璃、碳、氧化铝、二氧化钛、锆、氮化硅、沸石和砷化镓。许多金属如金、铂、铝铜合金、钛及其合金也可选用作阵列基质。另外，许多陶瓷和聚合物也可用作基质。可用作基质的聚合物包括但不限于以下物质：聚苯乙烯、聚(四)氟乙烯、(聚)偏二氟乙烯、聚碳酸酯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚乙烯基乙烯、聚乙烯亚胺、聚(醚醚)酮、聚甲醛(POM)、聚乙烯苯酚、聚交酯、聚甲基丙烯酸酐亚胺(PMI)、聚亚烷基砷(PAS)、聚甲基丙烯酸羟乙酯、聚二甲基硅氧烷、聚丙烯酰胺、聚酰亚胺、嵌段共聚物；Eupergit™、Photoresist、聚合的 Langmuir-Blodgett 薄膜和 LIGA 结构也可用作本发明的基质。阵列的优选基质包括硅、二氧化硅、玻璃或聚合物。

10

15

在本发明阵列的一个优选实施方案中，膜片还在基质表面上含有单层，膜片蛋白固定在单层上。单层优选为自装配单层。该单层任选包含式 X-R-Y 的分子，其中 R 为间隔基，X 为结合 R 至表面的官能团，而 Y 为结合蛋白到单层上的官能团。

20

各种化学部分都可在阵列中起单层作用。但是，优选使用 3 种类型的单层形式接触阵列膜片上的高密度生物活性 Ω 官能团：(i)在羟化表面上的烷基硅氧烷单层(“硅烷”)；(ii)在贵金属(优选 Au (111))上的烷基-巯基/二烷基二硫化物单层；和(iii)在无氧化物钝化物上的烷基单层形式。本领域一般技术人员会认识到许多可能的部分可取代 X、R 和/或 Y，这主要取决于选择的基质、包被物和亲合标记。单层的许多实例描述于 Ulman, AN INTRODUCTION TO

25

ULTRATHIN ORGANIC FILMS: FROM LANGMUIR-BLODGETT TO SELF ASSEMBLY (Academic Press, 1991)。

5 基质上包被物(如果存在的话)的沉积或形成在其上的生物活性单层膜片形成之前进行。任选使用光刻法、微成型(PCT 说明书 WO 96/29629)、湿化学蚀刻或这些方法的任意组合制作与单层相容的表面膜片。然后在膜片上形成生物活性单层。或者,可通过微冲压(参见例如美国专利 No. 5,512,131 和 5,731,152)或微触印刷(μ CP)(参见例如 PCT 说明书 WO 96/29629)产生生物活性单层官能化表面膜片阵列。随后生物分子固定产生二维蛋白阵列。喷墨式化学物质分配器
10 (inkjet chemical dispenser)提供了将单层 X-R-Y 分子或其组分在基质或包被物表面上以纳米至微米规模位置形成图案的另一种选择(参见例如 Lemmo et al., *Anal Chem.* 69:543-551 (1997))。

膜片之间的扩散边界可整合为具有垂直润湿特性的拓扑模式或表面官能团。例如,基质材料或抗光蚀剂的壁可用于分隔某些膜片和其它膜片,或用于所有膜片的彼此之间分隔。在一个优选实施方案中,膜片通过无 X-R-Y 型单层的表面相互分隔。或者,具有不同湿润性的非生物活性单层可用于膜片相互之间的分隔。

15 在本发明的另一个优选实施方案中,固定在阵列各个膜片上的蛋白是蛋白捕获剂。

20 在本发明阵列的替代性实施方案中,不同膜片上的蛋白是相同的。

关于如何制作蛋白阵列的其它信息,参见例如美国专利 No. 6,475,808、6,537,749、6,495,314、6,406,921 和 6,406,840。另参见 PROTEINS AND PROTEOMICS: A LABORATORY MANUAL
25 (Richard J. Simpson, ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press 2002)。

7. 调节骨密度的物质

通过经典 Wnt 通路调节骨密度的物质包括但不限于小化合物、干扰 RNA、反义核酸、多肽、适体、免疫球蛋白和蛋白模拟物。这

些化合物可用作进一步分析骨载荷反应及其增强的研究试剂，以及可用作在患者中调节骨密度的工具。这些化合物优选用于活化 Wnt 通路，由此在需要其的患者(例如骨质疏松患者)中增强骨矿化。

5 7.1 小化合物

小化合物可作为对照，用于开发研究骨载荷的基因表达谱。小化合物也可用于治疗涉及 Wnt 通路的骨矿化疾病。小化合物可用于调节在骨载荷作用下或 Wnt 通路中表达的 β -联蛋白、GSK-3、Wnt (例如 Wnt 3A)、LRP5 (或 LRP6)和任何其它蛋白。

10

7.1.1 GSK-3 抑制剂

糖原合酶激酶-3 (GSK-3)是存在于所有真核生物中的多功能丝氨酸/苏氨酸激酶。最初鉴别出 GSK-3 时，其显示磷酸化糖原合酶，由此使其激活。GSK-3 的活性由 GSK-3 磷酸化的程度调节。降低磷酸化导致 GSK-3 活性增加。目前，GSK-3 与糖尿病、Alzheimer 病、双相型障碍和癌症相关。还已经表明 GSK-3 通过活化线粒体死亡路径，是缺氧诱导凋亡的重要介导体(Loberg et al., *J. Biol. Chem.* 277 (44): 41667-73 (2002))。

15

GSK-3 由磷酸肌醇 3-激酶调节，该激酶负责磷酸化 GSK-3，并由此使蛋白失活。

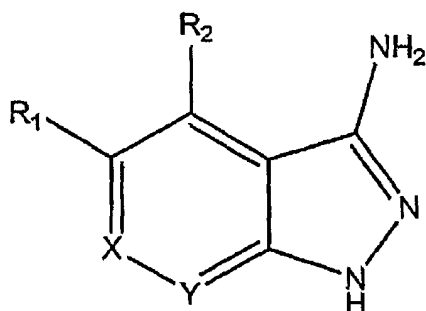
20

众所周知的 GSK-3 抑制剂是 LiCl。但 LiCl 是非选择性的，调节许多蛋白，不仅仅调节 GSK-3，因此较不优选。优选的选择性 GSK 抑制剂和激动剂调节 GSK 蛋白活性而不调节其它蛋白活性。更优选的 GSK 抑制剂和激动剂对 GSK-3 具有选择性，而对其它 GSK 蛋白没有选择性。最优选的 GSK 抑制剂和激动剂可辨别(具有选择性)特定 GSK-3 同种型(即 GSK-3 α 或 GSK-3 β)。选择性 GSK 抑制剂包括 Aloisine A、阿米洛利(Na⁺、H⁺反向转运蛋白抑制剂)和马来酰亚胺化合物。

25

Aloisine A 对 CDK1/细胞周期蛋白 B、CDK2/细胞周期蛋白 A-E、CDK25/p25 以及两种 GSK-3 同种型具有高度选择性。其似乎通过与 ATP 结合袋相互作用起作用，并抑制细胞增殖(Metty et al., *J. Med. Chem.* 46(2):222-36 (2003))。

- 5 具体地说，本发明化合物包括一系列已鉴定为 GSK-3 有效抑制剂的吡唑并[3,4-*b*]吡啶[哒嗪]。这些吡唑并[3,4-*b*]吡啶[哒嗪]为下式：



哒嗪衍生物自动配体对接(automated ligand docking)至 GSK-3 α 同源物模型提示与 ATP 结合位点的相互作用。

- 10 还设想将 WO 00/38675 (SmithKline Beecham)所述的马来酰亚胺衍生物用于本文，该文献通过引用整体结合到本文中。

- 和 WO 00/38675 所讲述的一样，公开的专利和专利申请 EP 470490 (Roche)、WO 93/18766 (Wellcome)、WO 93/18765 (Wellcome)、EP 397060 (Goedecke)、WO 98/11105 (Astra)、WO 98/11103 (Astra)、
15 WO 98/11102 (Astra)、WO 98/04552 (Roche)、WO 98/04551 (Roche)、DE 4243321 (Goedecke)、DE 4005970 (Boehringer)、DE 3914764 (Goedecke)、WO 96/04906 (Wellcome)、WO 95/07910 (Wellcome)、DE 4217964 (Goedecke)、US 5856517 (Roche)、US 5891901 (Roche)和 WO 99/42100 (Sagami)(所述专利和专利申请在后文也称为“组(IA)公开”)
20 公开了某些双吡啶马来酰亚胺、吡啶芳基马来酰亚胺和吡啶并吡啶(在后文也称为“组(IA)化合物”)及其制备方法。

公开的专利和专利申请 EP 328026 (Roche)、EP 384349 (Roche)、EP 540956 (Roche)和 DE 4005969 (Boehringer)(所述专利和专利申请在后文也称为“组(IB)公开”)公开了某些双吡啶马来酰亚胺、吡啶芳基马

来酰亚胺和吲哚并吡啶(在后文也称为“组(IB)化合物”)及其制备方法。

公开的专利申请 EP 508792 (Schering)(所述专利申请在后文也称为“组(IC)公开”)公开了某些马来酰亚胺衍生物(在后文也称为“组(IC)化合物”)及其制备方法。

由“组(IA)公开”、“组(IB)公开”和“组(IC)公开”组成的公开组在后文称为“组(I)公开”。

由“组(IA)化合物”、“组(IB)化合物”和“组(IC)化合物”组成的化合物组在后文称为“组(I)化合物”。

公开的专利和专利申请 WO 95/17182 (Lilly)、WO 95/35294 (Lilly)、EP 624586 (Roche)、EP 657458 (Lilly)、EP 776899 (Lilly)、EP 805158 (Lilly)、US 5491242 (Lilly)、US 5541347 (Lilly)、US 5545636 (Lilly)、US 5552396 (Lilly)、US 5624949 (Lilly)、US 5710145 (Lilly)、US 5721272 (Lilly)、WO 97/18809 (Lilly)和 WO 98/07693 (Lilly)(所述专利和专利申请在后文也称为“组(II)公开”)公开了某些为选择性蛋白激酶 C (PKC) $\beta 1$ 和 PKC $\beta 2$ 抑制剂的化合物(在后文也称为“组(II)化合物”), 这些化合物据描述可用于治疗与糖尿病及其并发症相关的病症。

Hers et al., FEBS Letters 460 (1999) 433-436 公开了某些为 GSK-3 抑制剂的双吲哚基马来酰亚胺。

“组(I)公开”和“组(II)公开”的公开内容通过引用结合到本文中。

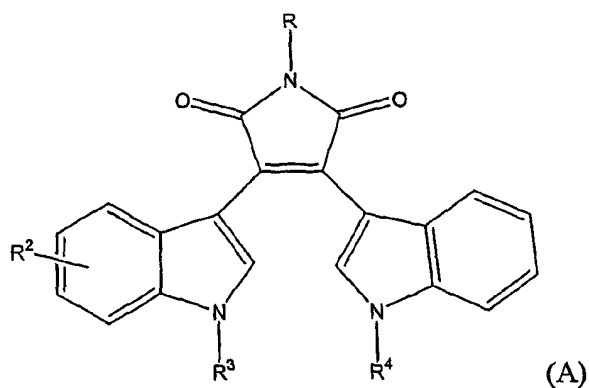
一系列的某些双吲哚马来酰亚胺、吲哚芳基马来酰亚胺和吲哚并吡啶是特别有效的和选择性的 GSK-3 抑制剂。这些化合物已被指出可用于治疗和/或预防与需要 GSK-3 抑制剂相关的病症。

因此, 在一方面, 本文使用的马来酰亚胺衍生物是选自“组(I)化合物”的化合物。选自“组(I)化合物”的合适化合物为式(I)的化合物, 其分别由 EP 470490、WO 93/18766、WO 93/18765、EP 397060、

WO 98/11105、WO 98/11103、WO 98/11102、WO 98/04552、WO 98/04551、DE 4243321、DE 4005970、DE 3914764、WO 96/04906、WO 95/07910、DE 4217964、US 5856517、US 5891901、WO 99/42100、EP 328026、EP 384349、EP 540956、DE 4005969 或 EP 508792 (组(I)公开)定义。

具体地说，选自“组(I)化合物”的化合物所包含的化合物选自在“组(I)公开”中作为实例具体公开的化合物。

选自“组(I)化合物”的化合物实例选自在“组(IA)公开”或“组(IB)公开”中公开的化合物，具有式(A)：



其中：

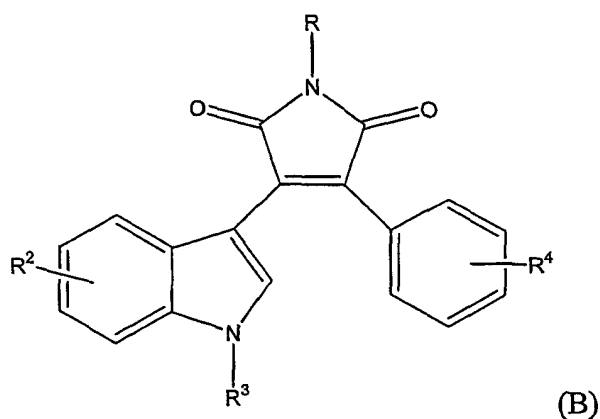
R 为氢；

R² 为氢、5-On-Pr、5-Ph、5-CO₂Me 或 5-NO₂；

R³ 为 Me 或 (CH₂)₃OH；

R⁴ 为 Me、*n*-Pr、-(CH₂)₃X，其中 X 选自 CN、NH₂、CO₂H、CONH₂ 或 OH。

选自“组(I)化合物”的化合物的其它实例选自在“组(IB)公开”中公开的化合物，并具有式(B)：



其中：

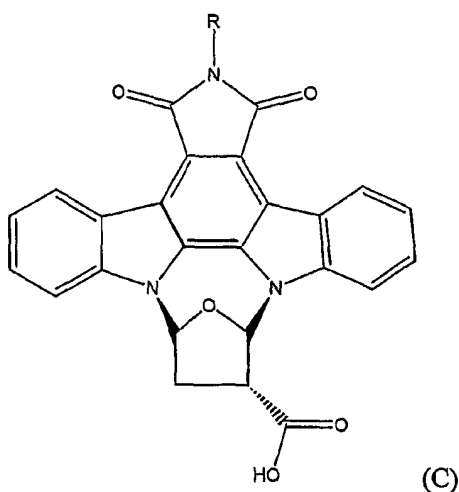
R 为氢;

R^2 为氢;

5 R^3 为 Me 或 $(CH_2)_3Y$ 基团, 其中 Y 为 NH_2 或 OH ;

R^4 为 2-Cl 或 2,4-二-Cl。

选自“组(I)化合物”的化合物再其它实例选自在“组(IC)公开”中公开的化合物，其为 9,10,11,12-四氢-10-羧基-9,12,-环氧-1H-二吡啶并[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]吡咯并[3,4-i]苯并二氮芳辛-1,3(2H)-二酮(式(C))。



选自“组(II)化合物”的合适化合物为式(I)的化合物，其分别由 WO 95/17182、WO 95/35294、EP 624586、EP 657458、EP 776899、EP 805158、US 5491242、US 5541347、US 5545636、US 5552396、

US 5624949、US 5710145、US 5721272、WO 97/18809 或 WO 98/07693 (“组(II)公开”)定义。

具体地说,选自“组(II)化合物”的化合物包括在“组(II)公开”中作为实例具体公开的化合物。

5 式(A)化合物的实例包括列于以下的化合物(后文称为“清单 A”):

3,4-双(1-甲基-3-吡啶基)吡咯-2,5-二酮、

3-(1-甲基-3-吡啶基)-4-(1-丙基-3-吡啶基)吡咯-2,5-二酮、

3-(1-甲基-3-吡啶基)-4-(1-[3-氰基丙基]-3-吡啶基)吡咯-2,5-二酮、

10 3-(1-甲基-3-吡啶基)-4-(1-[3-氨基丙基]-3-吡啶基)吡咯-2,5-二酮、

3-(1-甲基-3-吡啶基)-4-(1-[3-氨基甲酰基丙基]-3-吡啶基)吡咯-2,5-二酮、

3-(1-甲基-5-丙氧基-3-吡啶基)-4-(1-[3-氨基丙基]-3-吡啶基)吡咯-2,5-二酮、

15 3-(1-甲基-5-苯基-3-吡啶基)-4-(1-[3-羟丙基]-3-吡啶基)吡咯-2,5-二酮、

3-(1-甲基-5-苯基-3-吡啶基)-4-(1-[3-氨基丙基]-3-吡啶基)吡咯-2,5-二酮、

3-(1-甲基-5-甲氧羰基-3-吡啶基)-4-(1-[3-羟丙基]-3-吡啶基)吡咯-2,5-二酮、

20 3-(1-甲基-5-硝基-3-吡啶基)-4-(1-[3-羟丙基]-3-吡啶基)吡咯-2,5-二酮、

3-(1-[3-羟丙基]-5-硝基-3-吡啶基)-4-(1-甲基-3-吡啶基)吡咯-2,5-二酮, 或其药物可接受的衍生物。

式(B)化合物的实例包括列于以下的化合物(后文称为“清单 B”):

3-(1-甲基-3-吡啶基)-4-(2-氯苯基)吡咯-2,5-二酮、

25 3-(1-甲基-3-吡啶基)-4-(2,4-二氯苯基)吡咯-2,5-二酮、

3-(1-[3-羟丙基]-3-吡啶基)-4-(2-氯苯基)吡咯-2,5-二酮, 和

3-(1-[3-氨基丙基]-3-吡啶基)-4-(2-氯苯基)吡咯-2,5-二酮, 或其药物可接受的衍生物。

式(C)化合物的实例是：9,10,11,12-四氢-10-羧基-9,12,-环氧-1H-二吲哚并[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]吡咯并[3,4-i]苯并二氮芳辛-1,3(2H)-二酮或其药物可接受的衍生物。

5 适宜地，选自“组(I)化合物”的化合物选自在“组(IA)公开”或“组(IB)公开”中公开的化合物，并具有前文定义的式(A)。

适宜地，选自“组(I)化合物”的化合物选自在“组(IC)公开”中公开的化合物，并具有前文定义的式(C)。

有利地，选自“组(I)化合物”的化合物为选自“清单 A”的式(A)化合物。

10 有利地，选自“组(I)化合物”的化合物为 9,10,11,12-四氢-10-羧基-9,12,-环氧-1H-二吲哚并[1,2,3-fg:3',2',1'-kl]吡咯并[3,4-i]苯并二氮芳辛-1,3(2H)-二酮或其药物可接受的衍生物。

选自“组(I)化合物”的化合物优选选自在“组(B)公开”中公开的化合物，并具有前文定义的式(B)。

15 选自“组(I)化合物”的化合物更优选为选自“清单 B”的式(B)化合物。

选自“组(I)化合物”的化合物最优选为 3-(1-甲基-3-吲哚基)-4-(2,4-二氯苯基)吡咯-2,5-二酮。

20 某些“组(I)化合物”和“组(II)化合物”可包含至少一个手性原子和/或可包含多个键，因此可存在一个或多个立体异构形式。

本发明包含“组(I)化合物”和“组(II)化合物”的所有异构体形式，包括对映体和几何异构体，无论是单个异构体还是异构体混合物，包括外消旋修饰。

25 本发明还包括分别在“组(I)公开”和“组(II)公开”中描述的“组(I)化合物”和“组(II)化合物”的药学活性衍生物。

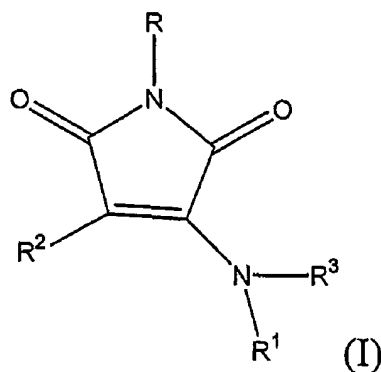
本发明化合物的合适药学活性衍生物包括在“组(I)公开”和“组(II)公开”中描述的盐和溶剂化物。

合适的“组(I)化合物”和“组(II)化合物”的药物可接受衍生物

包括药物可接受的盐和药物可接受的溶剂化物。

还考虑将 WO 00/21927 (SmithKline Beecham)中描述的马来酰亚胺衍生物用于本文，该文献通过引用整体结合到本文中。

WO 00/21927 公开了下式(I)的化合物或其药物可接受的衍生物：



5

其中：

R 为氢、烷基、芳基或芳烷基；

R¹ 为氢、烷基、芳烷基、羟基烷基或烷氧基烷基；

R² 为取代或未取代的芳基或取代或未取代的杂环基；

10

R³ 为氢、取代或未取代的烷基、环烷基、烷氧基烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂环基或芳烷基，其中芳基部分为取代或未取代的；或

R¹ 和 R³ 以及连接它们的 N 一起形成单个或稠合的、任选取代的、饱和或不饱和杂环。

15

适宜地，R 为氢、C₁₋₆ 烷基，例如甲基或乙基，或者 R 为苯基或苄基。

R 优选为氢。

适宜地，R¹ 为氢、C₁₋₆ 烷基，例如甲基、乙基，或者 R¹ 为羟基乙基或甲氧基乙基。

20

R¹ 优选为氢。

当 R² 为取代或未取代的芳基时，芳基的实例包括苯基和萘基。

当 R² 为取代或未取代的杂环基时，杂环基的实例包括吡啶基、

苯并呋喃基、噻吩基和苯并噻吩基。

当 R^2 为取代芳基时，合适的取代基包括最多三个基团，其独立地选自：卤素、 C_{1-6} 烷氧基、硝基、全氟代 C_{1-6} 烷基、苯甲酰基、 C_{1-6} 烷氧基羰基、 C_{1-6} 烷基磺酰基、羟基、 $-O(CH_2)_wO-$ (其中 w 为 1-4)、
 5 苯氧基、苄氧基、 C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 烷基、全氟代 C_{1-6} 烷氧基、 C_{1-6} 烷基 $S-$ 、全氟代 C_{1-6} 烷基 $S-$ 、(二 C_{1-6} 烷基) $N-$ 、氨基、 C_{1-6} 烷基羰基氨基、取代或未取代的脲基、苯基羰基氨基、苄基羰基氨基、苯乙烯基羰基氨基、(二 C_{1-6} 烷氧基)(苯基) $C-$ 、 C_{1-6} 烷基和苯基。适用于脲基
 10 的取代基包括氟苯基、苯基 C_{1-6} 烷基-、环己基、 C_{1-6} 烯基、 C_{1-6} 烷基和 C_{1-6} 烷氧基苯基。

当 R^2 为取代的吡啶基时，合适的取代基包括 C_{1-6} 烷基。

当 R^2 为取代的苯并噻吩基时，合适的取代基包括 C_{1-6} 烷基。

适宜地， R^2 为取代或未取代的苯基。

有利地， R^2 为由以下取代基取代的苯基：4-Cl、3-Cl、2-Cl、2,4-
 15 二-Cl、3,4-二-Cl、3,5-二-Cl、2,6-二-Cl、2-F-6-Cl、2-F、3-F、4-F、2,3-二-F、2,5-二-F、2,6-二-F、3,4-二-F、3,5-二-F、2,3,5-三-F、3,4,5-三-F、2-Br、3-Br、4-Br、2-I、4-I、3-Cl-4-OMe、3-NO₂-4-Cl、2-OMe-5-Br、2-NO₂、3-NO₂、4-NO₂、2-CF₃、3-CF₃、4-CF₃、3,5-二-CF₃、4-PhC(O)-、4-MeO(O)C-、4-MeSO₂-、4-OH、2-OMe、3-OMe、4-OMe、2,4-二-OMe、
 20 2,5-二-OMe、3,4-二-OMe、3,4-OCH₂O-、3,4,5-三-OMe、3-NO₂-4-OMe、4-OnBu、2-OEt、2-OPh、3-OPh、4-OPh、2-OCH₂Ph、4-OCH₂Ph、4-(MeOCH₂)、2-OCF₃、4-OCF₃、4-SMe、3-SCF₃、4-NMe₂、3-NH₂、3-(NHC(O)Me)、3-[NHC(O)NH(3-F-Ph)]、3-[NHC(O)NH(CH₂)₂Ph]、3-[NHC(O)NH 环己基]、3-[NHC(O)NHCH₂CH=CH₂]、3-[NHC(O)Ph]、
 25 3-[NHC(O)CH₂Ph]、3-[反-NHC(O)CH=CHPh]、3-[NHC(O)*n*Pr]、3-[NHC(O)NH₂Et]、3-[NHC(O)NH(3-OMe-Ph)]、4-[C(OMe)₂Ph]、2-Me、3-Me、4-Me、4-*i*Pr、2,5-二-Me、3,5-二-Me、4-Ph、2,3-[(-CH₂=CH₂-)]或 3,4-[(-CH₂=CH₂-)]。

当 R^3 为烷基时, 实例包括甲基和乙基。

当 R^3 为环烷基时, 实例包括环己基。

当 R^3 为烷氧基烷基时, 实例包括甲氧基乙基。

当 R^3 为芳烷基时, 实例包括苄基和苯乙基。

5 当 R^3 为取代或未取代的芳基时, 实例包括苄基、苯基和二苯并呋喃基。

当 R^3 为取代或未取代的杂环基时, 实例包括噻吩基、咪唑基、苯并咪唑基、吡啶基和嘧啶基。

10 当 R^1 和 R^3 与连接它们的 N 原子一起形成稠合杂环时, 该环可为未取代或取代的, 实例包括二氢吲哚基、吲哚基、羟吲哚基、苯并咪唑啉酮基、四氢喹啉基、四氢异喹啉基、苯并咪唑基、苯并氮杂庚因基、异二氢吲哚-2-基和 1,3,3-三甲基-6-氮杂二环[3,2,1]辛-6-基。

15 当 R^1 和 R^3 与连接它们的 N 原子一起形成单一杂环时, 该环可为未取代或取代的, 实例包括 1-苯基-1,3,8-三氮杂螺-[4,5]-癸-4-酮-8-基、哌嗪基、吡咯烷基、哌啶基、吗啉基、硫代吗啉基和吡啶鎓环。

20 当 R^3 为取代的苯基时, 合适的取代基包括最多三个基团, 其独立地选自: 取代或未取代的 C_{1-6} 烷基、苯基、苄基、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基 S-、卤素、羟基、取代或未取代的 C_{1-6} 烷氧基、取代或未取代的苯氧基、吲哚基、萘基、羧基、 C_{1-6} 烷氧基羰基、苄氧基、五氟苯氧基、硝基、N-取代或未取代的氨甲酰基、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基羰基、苯甲酰基、氰基、全氟 C_{1-6} 烷基 SO_2 -、 C_{1-6} 烷基 $NHSO_2$ -、咪唑基、 C_{1-6} 烷基羰基哌嗪基、取代或未取代的苯基 S-、 C_{1-6} 烷基哌嗪基、环己基、金刚烷基、三苯甲基、取代或未取代的 C_{1-6} 烯基、全氟 C_{1-6} 烷基、全氟 C_{1-6} 烷氧基、全氟 C_{1-6} 烷基 S-、氨基磺酰基、烷基氨基磺酰基、二烷基氨基磺酰基、芳基氨基磺酰基、吗啉代、(二 C_{1-6} 烷基)氨基、其中 n 为 1-6 的 C_{1-6} 烷基 $CONH$ -(二 C_{1-6} 烷氧基)苯基 $(CH_2)_nNHC(O)CH(苯基)S$ -; 和 C_{1-6} 烷基 $CON(C_{1-6} 烷基)$ -、噻唑烷二

25

- 酮基 C_{1-6} 烷基、苯基 $CH(OH)-$ 、取代或未取代的哌嗪基 C_{1-6} 烷氧基、取代或未取代的苯甲酰氨基；或 $-[CH=CH-C(O)O]-$ 、 $-[(CH=CH)_2]-$ 、 $-[(CH_2)_xN(C_{1-6} \text{ 烷基羰基})]-$ 、 $-(CH_2)_x-$ 、 $-SCH=N-$ 、 $-SC(C_{1-6} \text{ 烷基})=N-$ 、 $-OCF_2O-$ 、 $-CH=N-NH-$ 、 $-CH=CH-NH-$ 、 $-OC(NHC_{1-6} \text{ 烷基})-N-$ 、 $-OC(O)NH-$ 、 $-C(O)NC_{1-6} \text{ 烷基}$ $C(O)-$ 、 $-[CH=CH-CH=N]-$ 、 $-[CH=C(C_{1-6} \text{ 烷基羰基})O]-$ 、 $-C(O)NHC(O)-$ 、 $-[(CH_2)_xC(O)]-$ 、 $-N=N-NH-$ 、 $-N=C(C_{1-6} \text{ 烷基})O-$ 、 $-O(CH_2)_xO-$ 、 $(CH_2)_xSO_2(CH_2)_y-$ 、 $-N(C_{1-6} \text{ 烷基羰基})(CH_2)_x-$ ，其中 x 和 y 独立地为 1-4；嘧啶-2-基氧基、苯基氨基、 N -[嘧啶-2-基]- N -[C_{1-6} 烷基]氨基、 C_{1-6} 烷基磺酰基氨基和 1,2,3-噁二唑基。
- 10 适于 C_{1-6} 烷基的取代基包括羟基、羧基、未取代或 N -取代的氨甲酰基、 N -吗啉基羰基、 C_{1-6} 烷基氨基羰基、氟代、氰基、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基羰基氨基、氨基、 C_{1-6} 烷基羰基氨基、苯甲酰基氨基、苯基氨基羰基氨基、 C_{1-6} 烷氧基羰基、膦酰基、单或双 C_{1-6} 烷基膦酸盐、 C_{1-6} 烷基氨基磺酰基和 C_{1-6} 烷基羰基氨基 C_{1-6} 烷基氨基 $CO-$ 。
- 15 适于 C_{1-6} 烷基 $S-$ 的取代基包括羧基、 C_{1-6} 烷基羰基、 C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 烷基氨基羰基、未取代或 N -取代的氨甲酰基和氟。
- 适于 C_{1-6} 烷氧基的取代基包括 C_{1-6} 烷氧基、苯基、羧基、 C_{1-6} 烷氧基羰基、未取代或 N -取代的氨甲酰基和苯基。
- 适于氨甲酰基的取代基包括 C_{1-6} 烷基和 C_{1-6} 烷氧基 C_{1-6} 烷基。
- 20 适于 C_{1-6} 烷基羰基的取代基包括羧基和 C_{1-6} 烷氧基羰基。
- 适于苯基 $S-$ 的取代基包括氟、硝基、羧基、 C_{1-6} 烷基氨基羰基、未取代或 N -取代的氨甲酰基和 C_{1-6} 烷氧基羰基。
- 适于 C_{1-6} 烯基的取代基包括(二 C_{1-6} 烷基)氨基羰基、羧基、 C_{1-6} 烷氧基羰基、氨甲酰基和苯基。
- 25 适于哌嗪基 C_{1-6} 烷氧基的取代基包括甲基。
- 适于苯氧基的取代基包括氟。
- 适于苯甲酰基氨基的取代基包括羟基。
- 当 R^3 为取代的苯并呋喃基时，合适的取代基包括 C_{1-6} 烷基羰基。

当 R^3 为取代的噻吩基时, 合适的取代基包括 C_{1-6} 烷基羰基。

当 R^3 为取代的噁唑基时, 合适的取代基包括 C_{1-6} 烷基。

当 R^3 为取代的苯并噁唑基时, 合适的取代基包括卤素。

当 R^3 为取代的吡啶基时, 合适的取代基包括最多三个取代基,
5 其独立地选自: C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基和卤素。

适宜地, R^3 为取代或未取代的苯基。

有利地, R^3 为以下取代基取代的苯基: 2-Me、2-Et、2-*i*Pr、2-
CH₂OH、2-Ph、2-CH₂Ph、2-SMe、2-F、2-Cl、2-OH、2-OMe、2-OPh、
2-Me-5-F、2-Me-3-Cl、2-Me-4-Cl、2-Me-5-Cl、2-Me-3-Br、2,3-二-Me、
10 2,4-二-Me、2-Me-4-OH、2-Me-4-OMe、2-Me-5-CH₂OH、2,4,6-三-Me、
2-(2-吡啶基)、(1-萘基)、2-Me-5-COOH、2-Me-5-COOMe、2-OH-5-
COOH 、 2-[O(CH₂)₂OMe]-5-[(CH₂)₂-COOH] 、 2-
[SCH(Ph)CONH(CH₂)₂(3,4-二-OMePh)]、3-Me、3-Et、3-CH₂OH、3-
CH₂OH-6-Me 、 3-CH₂OH-4-OMe 、 3-(CH₂NMe₂)-4-OMe 、 3-
15 [CH₂COOH]、3-[CH₂COOMe]、3-[CH₂CONH₂]、3-[CH₂CONHMe]、
3-[CH₂-(噻唑烷-2,4-二酮-5-基)]、3-SMe、3-F、3-Cl、3-Br、3-I、3-CF₃、
3-OH、3-OMe、3-OCH₂Ph、3-O*i*Pr、3-OPh、3-O-五氟苯基、3-
(OCH₂CO₂H)、3-(OCH₂CO₂Me)、3-(OCH₂CO₂Et)、3-NO₂、3-CO₂H、
3-CO₂Me、3-CONH₂、3-CONHMe、3-CONHCH₂CH₂OMe、3-COMe、
20 3-COPh、3-(COCH₂CH₂CO₂H)、3-(COCH₂CH₂CO₂Me)、3-CN、3-
SO₂CF₃、3-SO₂NH-*n*Bu、3-(5-噁唑基)、3-[4-甲基哌嗪-1-基]-4-OMe、
3-[O-(噻啶-2-基)]、3-OH-4-OMe、3,4-二-OMe、3,5-二-OMe、3,4-二-
Me、3,5-二-Me、3-[反-CH=CHCONMe₂]-4-Cl、3-F-4-Me、3-Cl-4-Me、
3-Br-4-Me、3,5-二-F、3,4-二-Cl、3,5-二-Cl、3,5-二-Br、3-Cl-4-Br、
25 3-Cl-4-I、3-Cl-4-OH、3-Br-4-OH、3-F-4-OMe、3-Cl-4-OMe、3-Cl-4-
SMe、3-Br-4-Cl、3-Br-4-OCF₃、3-Br-5-CF₃、3,5-二-Cl-4-OH、3,5-二-
-Br-4-OH、3,5-二-Cl-4-Me、3,5-二-Br-4-Me、3-[CH₂CH(Me)CO₂H]、
3-CO₂H-4-Cl、3-CO₂Me-4-Cl、3-CO₂H-4-OH、3-CONH₂-4-Me、3-

NO_2 -4-OH、3-CO₂H-4-SPh、3-CO₂H-4-[S-(2-CO₂H-Ph)]、3-CO₂H-4-[S-(2-CONHMe-Ph)]、3-CO₂Et-4-[S-(2-CO₂Et-Ph)]、3-CO₂H-4-[S-(3-CO₂H-Ph)]、3-CO₂Me-4-[S-(4-Cl-Ph)]、4-[N(Me)(嘧啶-2-基)]、4-Me、4-*n*Bu、4-*t*Bu、4-环己基、4-金刚烷基、4-CPh₃、4-CH₂CN、4-CH(OH)Me、
 5 4-CH(OMe)Me、4-CH₂OH、4-CH₂NHC(O)t-Bu、4-CH₂NH₂、4-CH₂NHCOMe、4-CH₂NHCOPh、4-CH₂NHCONHPh、4-CH₂CO₂H、4-CH₂CO₂Me、4-[CH₂P(O)(OH)₂]、4-[CH₂P(O)(OEt)₂]、4-[CH₂SO₂NHMe]、4-(CH₂)₂OH、4-(CH₂)₂NH₂、4-(CH₂)₂NHCOPh、4-(CH₂)₂NHC(O)Ot-Bu、4-[(CH₂)₂CO₂H]、4-[(CH₂)₂CO₂Me]、4-[(CH₂)₂CH₂CONH₂]、4-[CH₂CH₂CONH(CH₂)₆NHCOMe]、4-[(CH₂)₃CO₂H]、4-[(CH₂)₃CO₂Me]、4-[CH=CH₂]、4-(CH=CHCO₂H)、4-(CH=CHCO₂Et)、4-(CH=CHCONH₂)、4-(CH=CHPh)、4-(CH=CH(4-OHPh))、4-[1,2,3-噻二唑-4-基]、4-[OCH₂-(1-甲基-哌嗪-4-基)]、4-[4-甲基哌嗪-1-基]、4-CF₃、4-SMe、4-(SCH₂CO₂H)、4-(SCH₂CO₂Me)、4-[SCH₂CONH(CH₂)₂OMe]、4-SCF₃、4-[S-(4-NO₂-Ph)]、4-[S-(2-CO₂H-Ph)]、4-[S-(3-CO₂H-Ph)]、4-SO₂NH₂、4-F、4-Cl、4-Br、4-I、4-OH、4-OMe、4-OnBu、4-OPh、4-[O-(4-Cl-Ph)]、4-OCH₂Ph、4-OCH₂CO₂Me、4-COPh、4-COMe、4-CONH₂、4-CO₂H、4-CN、4-NO₂、4-吗啉基、4-[CH₂CO-吗啉-1-基]、4-[CH₂CONH(CH₂)₂OMe]、
 10 4-[(CH₂)₂CONH(CH₂)₆NHC(O)Ot-Bu]、4-[(CH₂)₂CONH(CH₂)₆NH₂]、4-[(CH₂)₂CONH(CH₂)₆NH-生物素基]、4-NMe₂、4-NHCOMe、4-N(Me)COMe、2,3-二-F、4-[NHCO(Ph-2-OH)]、4-(苯基氨基)、4-甲基磺酰基氨基、2,4-二-F、2,5-二-F、2-OMe-3-F、3-CH₂OMe、3-CH(OH)Ph、3,4-二-F、3-CO₂H-4-CH₂CO₂H、3-CO₂H-4-[S-(2-CO₂Et)Ph]、3-CO₂Et-4-[S-(4-CO₂H)Ph]、3-CONHMe-4-[S-(2-CONHMe)-Ph]、3-[4-(二氯乙酰基)哌嗪-1-基]-4-OMe、4-CH₂CONH₂、4-SPh、4-[S(4-CO₂H-Ph)]和4-OCH₂CO₂H。
 15
 20
 25

当 R¹ 和 R³ 与连接它们的 N 原子一起形成二氢吡嗪基时，合适

的取代基包括 C₁₋₆ 烷基、全氟 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷基 SO₂NH-羟基 C₁₋₆ 烷基、羧基、C₁₋₆ 烷氧基羰基、C₁₋₆ 烷氧基、卤素、叔-丁氧基羰基哌嗪-1-基、4-(C₁₋₆ 烷基)哌嗪基、哌嗪基、酰氨基和硝基。

5 当 R¹ 和 R³ 与连接它们的 N 原子一起形成哌嗪基时，合适的取代基包括烷基羰基、烷基或芳基。

当 R¹ 和 R³ 与连接它们的 N 原子一起形成四氢喹啉基时，合适的取代基包括全氟 C₁₋₆ 烷基。

当 R¹ 和 R³ 与连接它们的 N 原子一起形成吡啶鎓环时，合适的取代基包括氨基。

10 当 R¹ 和 R³ 与连接它们的 N 原子一起形成吡咯烷基时，合适的取代基包括羟基。

当 R¹ 和 R³ 与连接它们的 N 原子一起形成哌啶基时，合适的取代基包括苄基、羟基 C₁₋₆ 烷基、C₁₋₆ 烷基、羟基、氮甲酰基和 C₁₋₆ 烷氧基羰基。

15 当 R¹ 和 R³ 与连接它们的 N 原子一起形成羧吡啶基时，合适的取代基包括 C₁₋₆ 烷基。

如 WO 00/21927 所公开的，有完全属于式(I)的、为式(IA)的化合物亚组，其中 R、R¹、R² 和 R³ 如式(I)所定义，但条件是式(IA)不包括以下后文称为清单 A 的化合物：

- 20 1) 3-苯基-4-(4-甲基哌嗪并)-吡咯-2,5-二酮；
2) 3-[4-(二苯基甲基)-1-哌嗪基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮；
3) 3-苯基-4-(4-苯基哌嗪并)-吡咯-2,5-二酮；
4) 1-甲基-3-苯基-4-(4-苯基哌嗪并)-吡咯-2,5-二酮；
25 5) 1-乙基-3-苯基-4-(4-氯苯基哌嗪并)-吡咯-2,5-二酮；
6) 1-烯丙基-3-苯基-4-(4-甲基哌嗪并)-吡咯-2,5-二酮；
7) 3-吡啶-1-基-4-(1-甲基-1H-吡啶-3-基)-吡咯-2,5-二酮；
8) 氯化 1-(1-甲基-2,5-二氧代-4-苯基氨基-2,5-二氢-1H-吡咯-3-基)吡

啶鎧;

- 9) 氯化 1-[1-(4-甲基-戊基)-2,5-二氧代-4-苯基氨基-2,5-二氢-1H-吡咯-3-基]吡啶鎧;
- 5 10) 氯化 1-(1-十二烷基-2,5-二氧代-4-苯基氨基-2,5-二氢-1H-吡咯-3-基)-吡啶鎧;
- 11) 3-[2-苯并[b]噻吩-2-基-3-[4-(二甲氨基)-2,5-二氢-2,5-二氧代-1H-吡咯-3-基]-1H-吡啶-1-基]-亚氨基氨基甲硫代酸 (carbamimidothioic acid), 丙酯;
- 12) 3-(二甲氨基)-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 10 13) 3-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-4-(苯基氨基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 14) 3-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-4-[[4-(三氟甲基)苯基]氨基]-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 15 15) 3-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-4-(甲氨基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 16) 3-(1H-咪唑并[4,5-b]吡啶-1-基)-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 17) 3-(6-氯-9H-嘌呤-9-基)-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 18) 3-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 20 19) 3-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-4-(1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-1-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 20) 3-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-4-(1-哌嗪基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 21) 1-乙酰基-3-[2,5-二氢-1-甲基-2,5-二氧代-4-[[4-(三氟甲基)苯基]氨基]-1H-吡咯-3-基]-1H-吡啶;
- 25 22) 3-(1H-苯并咪唑-1-基)-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 23) 3-(1H-苯并三唑-1-基)-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮;

- 24) 3-(1H-咪唑-1-基)-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮;
25) 3-(1H-吡啶-1-基)-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮;
26) 3-(1H-咪唑-1-基)-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮;
27) 3-[3-[(二甲氨基)甲基]-1H-吡啶-1-基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-
5 1H-吡咯-2,5-二酮;
28) 3-(1H-苯并咪唑-1-基)-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
29) 3-(1H-吡啶-1-基)-4-(1-甲基-1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
30) 3-氨基-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
31) 3-氨基-4-(5-甲氧基-1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
10 32) 1H-吡啶-1-羧酸, 3-(4-氨基-2,5-二氢-1-甲基-2,5-二氧代-1H-吡咯-3-基)-1,1-二甲基乙酯;
33) 3-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-4-[(苯基甲基)氨基]-1H-吡咯-2,5-二酮;
34) 甘氨酸, N-[2,5-二氢-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-2,5-二氧代-1H-吡咯-3-基]-, 乙酯;
15 35) 3-氨基-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮;
36) 3-[[3-[(3-氨基丙基)氨基]丙基]氨基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
37) [[3-[4-(3-氨基丙基)-1-哌嗪基]丙基]氨基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
20 38) 3-(1H-吡啶-3-基)-4-[[3-(4-甲基-1-哌嗪基)丙基]氨基]-1H-吡咯-2,5-二酮;
39) 1-[3-[(3-氨基丙基)氨基]丙基]-3-[[3-[(3-氨基丙基)氨基]丙基]氨基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
40) 1-[3-[4-(3-氨基丙基)-1-哌嗪基]丙基]-3-[[3-[4-(3-氨基丙基)-1-哌嗪基]丙基]氨基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
25 41) 3-(1H-吡啶-3-基)-1-[3-(4-甲基-1-哌嗪基)丙基]-4-[[3-(4-甲基-1-哌嗪基)丙基]氨基]-1H-吡咯-2,5-二酮;
42) 3,3'-[亚氨基双(3,1-丙二基亚氨基)]双[4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-

- 2,5-二酮;
- 43) 3,3'-[1,4-哌嗪二基双(3,1-丙二基亚氨基)]双[4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 44) 3-[(5-氨基戊基)氨基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 5 45) 3-[[5-[(2-氨基乙基)氨基]戊基]氨基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 46) 3-[(2-氨基乙基)氨基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 47) 3-[(6-氨基己基)氨基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 48) 3-[(7-氨基庚基)氨基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 10 49) 3-[[2-[(2-氨基乙基)氨基]乙基]氨基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 50) 苯丙酰胺, α -氨基-N-[5-[[2,5-二氢-4-(1H-吡啶-3-基)-2,5-二氧代-1H-吡咯-3-基]氨基]戊基]-, (S)-;
- 51) 戊酸, 4-氨基-5-[[5-[[2,5-二氢-4-(1H-吡啶-3-基)-2,5-二氧代-1H-吡咯-3-基]氨基]戊基]氨基]-5-氧代-, (S)-;
- 15 52) 戊酰胺, 2-氨基-5-[(氨基亚氨基甲基)氨基]-N-[2-[[5-[[2,5-二氢-4-(1H-吡啶-3-基)-2,5-二氧代-1H-吡咯-3-基]氨基]戊基]氨基]乙基, (S)-;
- 53) 苯丙酰胺, α -氨基-N-[2-[[5-[[2,5-二氢-4-(1H-吡啶-3-基)-2,5-二氧代-1H-吡咯-3-基]氨基]戊基]氨基]乙基-, (S)-;
- 20 54) 丁酰胺, 4-(氨基亚氨基甲基)氨基-N-[5-[[2,5-二氢-4-(1H-吡啶-3-基)-2,5-二氧代-1H-吡咯-3-基]氨基]戊基]-, (S)-;
- 55) 3-苯基-4-(二乙氨基)-吡咯-2,5-二酮;
- 56) 3-苯基-4-(苄基氨基)-吡咯-2,5-二酮;
- 25 57) 1-甲基-3-苯基-4-(2-二乙氨基乙氨基)-吡咯-2,5-二酮;
- 58) 1-烯丙基-3-苯基-4-(2-二甲氨基乙氨基)-吡咯-2,5-二酮; 和
- 59) 1,3-二苯基-4-哌啶并-吡咯-2,5-二酮。

如 WO 00/21927 所公开的, 还有完全属于式(I)的、为式(II)的

化合物亚组, 其中 R 、 R^1 、 R^2 和 R^3 如式(I)所定义, 但条件是式(1B)不包括以下后文称为清单 B 的化合物:

- 1) 3-(4-甲基哌嗪-1-基)-4-苯基-吡咯-2,5-二酮;
- 2) 3-(4-乙基哌嗪-1-基)-4-苯基-吡咯-2,5-二酮;
- 5 3) 3-(4-氯苯基)-4-(4-甲基-哌嗪-1-基)-吡咯-2,5-二酮;
- 4) 3-[4-(二苯基甲基)-1-哌嗪基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 5) 3-苯基-4-(4-甲基哌嗪并)-吡咯-2,5-二酮;
- 6) 3-苯基-4-(4-苯基哌嗪并)-吡咯-2,5-二酮;
- 10 7) 1-甲基-3-苯基-4-(4-苯基哌嗪并)-吡咯-2,5-二酮;
- 8) 1-乙基-3-苯基-4-(4-氯苯基哌嗪并)-吡咯-2,5-二酮;
- 9) 1-烯丙基-3-苯基-4-(4-甲基哌嗪并)-吡咯-2,5-二酮;
- 10) 3-苯基氨基-4-苯基-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 11) 3-苯基-4-哌啶-1-基-吡咯-2,5-二酮;
- 15 12) 3-(3,5-二甲基-1-苯基-1H-吡啶-4-基)-4-吗啉-4-基-吡咯-2,5-二酮;
- 13) 3-吡啶-1-基-4-(1-甲基-1H-吡啶-3-基)-吡咯-2,5-二酮;
- 14) 氯化 1-(1-甲基-2,5-二氧代-4-苯基氨基-2,5-二氢-1H-吡咯-3-基)-吡啶鎓;
- 20 15) 氯化 1-1-(4-甲基-戊基)-2,5-二氧代-4-苯基氨基-2,5-二氢-1H-吡咯-3-基)-吡啶鎓;
- 16) 氯化 1-(1-十二烷基-2,5-二氧代-4-苯基氨基-2,5-二氢-1H-吡咯-3-基)-吡啶鎓;
- 17) 3-[2,5-二氢-4-(1H-咪唑-1-基)-1-甲基-2,5-二氧代-1H-吡咯-3-基]-1H-吡啶-1-羧酸, 1,1-二甲基乙酯;
- 25 18) 3-[2-苯并[b]噻吩-2-基-3-[4-(二甲氨基)-2,5-二氢-2,5-二氧代-1H-吡咯-3-基]-1H-吡啶-1-基]-亚氨基氨基甲硫代酸, 丙酯;
- 19) 3-(二甲氨基)-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮;

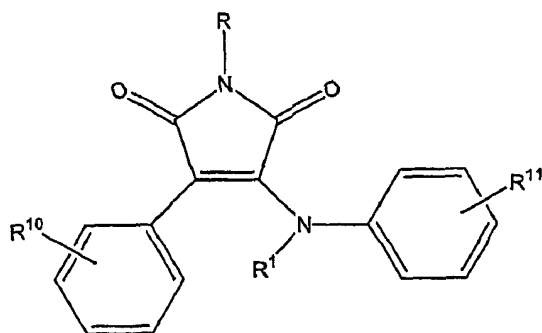
- 20) 3-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-4-(苯基氨基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 21) 3-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-4-[[4-(三氟甲基)苯基]氨基]-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 22) 3-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-4-(甲氨基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 5 23) 3-(1H-咪唑并[4,5-b]吡啶-1-基)-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 24) 3-(6-氯-9H-嘌呤-9-基)-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 25) 3-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 10 26) 3-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-4-(1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-1-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 27) 3-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-4-(1-哌啶基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 28) 1-乙酰基-3-[2,5-二氢-1-甲基-2,5-二氧代-4-[[4-(三氟甲基)苯基]氨基]-1H-吡咯-3-基]-1H-吡啶;
- 15 29) 3-(1H-苯并咪唑-1-基)-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 30) 3-(1H-苯并三唑-1-基)-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 20 31) 3-(1H-咪唑-1-基)-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 32) 3-(1H-吡啶-1-基)-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 33) 3-(1H-吡唑-1-基)-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 34) 3-[3-[(二甲氨基)甲基]-1H-吡啶-1-基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 25 35) 3-(1H-苯并咪唑-1-基)-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 36) 3-(1H-吡啶-1-基)-4-(1-甲基-1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 37) 3-(3,5-二甲基-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-4-(4-吗啉基)-1H-吡咯-2,5-二酮;

- 38) 3-氨基-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 39) 3-氨基-4-(5-甲氧基-1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 40) 1H-吡啶-1-羧酸, 3-(4-氨基-2,5-二氢-1-甲基-2,5-二氧代-1H-吡咯-3-基)-, 1,1-二甲基乙酯;
- 5 41) 3-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-4-[(苯基甲基)氨基]-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 42) 甘氨酸, N-[2,5-二氢-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-2,5-二氧代-1H-吡咯-3-基]-, 乙酯;
- 43) 3-氨基-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 44) 1-(4-甲基苯基)-3-[(4-甲基苯基)氨基]-4-苯基-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 10 45) 3-[[3-[(3-氨基丙基)氨基]丙基]氨基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 46) 3-[[3-[4-(3-氨基丙基)-1-哌嗪基]丙基]氨基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 47) 3-(1H-吡啶-3-基)-4-[[3-(4-甲基-1-哌嗪基)丙基]氨基]-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 15 48) 1-[3-[(3-氨基丙基)氨基]丙基]-3-[[3-[(3-氨基丙基)氨基]丙基]氨基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 49) 1-[3-[4-(3-氨基丙基)-1-哌嗪基]丙基]-3-[[3-[4-(3-氨基丙基)-1-哌嗪基]丙基]氨基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 20 50) 3-(1H-吡啶-3-基)-1-[3-(4-甲基-1-哌嗪基)丙基]-4-[[3-(4-甲基-1-哌嗪基)丙基]氨基]-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 51) 3,3'-[亚氨基双(3,1-丙二基亚氨基)]双[4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮];
- 52) 3,3'-[1,4-哌嗪二基双(3,1-丙二基亚氨基)]双[4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮];
- 25 53) 3-氨基-4-(3,4-二甲氧基苯基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 54) 3-[(5-氨基戊基)氨基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 55) 3-[[5-[(2-氨基乙基)氨基]戊基]氨基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-

- 2,5-二酮;
- 56) 3-[(2-氨基乙基)氨基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 57) 3-[(6-氨基己基)氨基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 58) 3-[(7-氨基庚基)氨基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 5 59) 3-[[2-[(2-氨基乙基)氨基]乙基]氨基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 60) 苯丙酰胺, α -氨基-N-[5-[[2,5-二氢-4-(1H-吡啶-3-基)-2,5-二氧代-1H-吡咯-3-基]氨基]戊基]-, (S)-;
- 61) 戊酸, 4-氨基-5-[[5-[[2,5-二氢-4-(1H-吡啶-3-基)-2,5-二氧代-1H-吡咯-3-基]氨基]戊基]氨基]-5-氧代-, (S)-;
- 10 62) 戊酰胺, 2-氨基-5-[(氨基亚氨基甲基)氨基]-N-[2-[[5-[[2,5-二氢-4-(1H-吡啶-3-基)-2,5-二氧代-1H-吡咯-3-基]氨基]戊基]氨基]乙基]-, (S)-;
- 63) 苯丙酰胺, α -氨基-N-[2-[[5-[[2,5-二氢-4-(1H-吡啶-3-基)-2,5-二氧代-1H-吡咯-3-基]氨基]戊基]氨基]乙基]-, (S)-;
- 15 64) 丁酰胺, 4-[(氨基亚氨基甲基)氨基]-N-[5-[[2,5-二氢-4-(1H-吡啶-3-基)-2,5-二氧代-1H-吡咯-3-基]氨基]戊基]-, (S)-;
- 65) 3-(4-甲基苯基)-1-苯基-4-(苯基氨基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 66) 1,3-双(4-甲基苯基)-4-[(4-甲基苯基)氨基]-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 20 67) 3-氨基-1,4-二苯基-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 68) 3-(4-甲基苯基)-4-(4-吗啉基)-1-苯基-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 69) 3-(4-甲基苯基)-1-苯基-4-[(苯基甲基)氨基]-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 70) 3-氨基-4-(4-甲基苯基)-1-苯基-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 71) 3-(3,5-二甲基-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-4-(4-吗啉基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 25 72) 3-(4-硝基苯基)-1-苯基-4-苯基氨基-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 73) 3-氨基-1-甲基-4-对-甲苯基-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 74) 3-(2-二乙氨基-乙氨基)-4-苯基-吡咯-2,5-二酮;

- 75) 3-[丁基-(2-二乙氨基-乙基)-氨基]-4-苯基-吡咯-2,5-二酮;
 76) 3-[苄基-(2-二甲氨基-乙基)-氨基]-4-苯基-吡咯-2,5-二酮;
 77) 3-[苄基-(2-二甲氨基-乙基)-氨基]-1-甲基-4-苯基-吡咯-2,5-二酮;
 78) 3-[苄基-(2-二甲氨基-乙基)-氨基]-4-(4-氯-苯基)-吡咯-2,5-二酮;
 5 79) 3-[苄基-(2-二乙氨基-乙基)-氨基]-4-苯基-吡咯-2,5-二酮;
 80) 3-[苄基-(2-二甲氨基-乙基)-氨基]-4-(3-甲氧基-苯基)-吡咯-2,5-二酮;
 81) 3-(4-氯-苯基)-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-乙氨基]-吡咯-2,5-二酮;
 82) 3-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-乙氨基]-4-苯基-吡咯-2,5-二酮;
 10 83) 3-苯基-4-(二乙氨基)-吡咯-2,5-二酮;
 84) 3-苯基-4-(苄基氨基)-吡咯-2,5-二酮;
 85) 1-甲基-3-苯基-4-(2-二乙氨基乙氨基)-吡咯-2,5-二酮;
 86) 1-烯丙基-3-苯基-4-(2-二甲氨基乙氨基)-吡咯-2,5-二酮; 和
 87) 1,3-二苯基-4-哌啶并-吡咯-2,5-二酮。

- 15 如 WO 00/21927 所公开的, 有完全属于式(I)的、为式(IC)的化合物亚组:



其中:

R 和 R¹ 如式(I)所定义;

- 20 R¹⁰ 表示氢或一个或多个取代基, 适宜地最多三个, 其选自: 烷氧基羰基、烷氧基烷基、全氟烷基、全氟烷基 S-、全氟烷基 O-、苯基(二-C₁₋₆ 烷氧基)C-、苯甲酰基、C₁₋₆ 烷基 SO₂-、-[(CH=CH)₂]-、苯基、硝基、-OCH₂O-、苄氧基、苯氧基、卤素、羟基、烷基、烷氧基、

氨基、一或二烷基氨基或硫代烷基;

R^{11} 表示氢或一个或多个取代基, 适宜地最多三个, 其选自: 取代或未取代的 C_{1-6} 烷基、苯基、苄基、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基 S-、卤素、羟基、取代或未取代的 C_{1-6} 烷氧基、取代或未取代的苯氧基、
 5 吡啶基、萘基、羧基、 C_{1-6} 烷氧基羰基、苄氧基、苯氧基、五氟苯氧基、硝基、取代或未取代的氨甲酰基、取代或未取代的 C_{1-6} 烷基羰基、苯甲酰基、氰基、全氟 C_{1-6} 烷基 SO_2 -、 C_{1-6} 烷基 $NHSO_2$ -、噁唑基、取代或未取代的苯基 S-、 C_{1-6} 烷基哌嗪基、 C_{1-6} 烷基羰基哌嗪基、1,2,3-噻二唑基、嘧啶-2-基氧基、N-[嘧啶-2-基]-N-甲氨基、苯基氨基、 C_{1-6}
 10 烷基磺酰基氨基、N-吗啉基羰基、环己基、金刚烷基、三苯甲基、取代或未取代的 C_{1-6} 烯基、全氟 C_{1-6} 烷基、全氟 C_{1-6} 烷氧基、全氟 C_{1-6} 烷基 S-、氨基磺酰基、吗啉代、(二 C_{1-6} 烷基)氨基、 C_{1-6} 烷基 $CONH$ -、其中 n 为 1-6 的(二 C_{1-6} 烷氧基)苯基 $(CH_2)_nNHC(O)CH(苯基)S$ -; 和 C_{1-6} 烷基 $CON(C_{1-6} 烷基)$ -、噻唑烷二酮基 C_{1-6} 烷基、苯基 $CH(OH)$ -、取代或未取代的哌嗪基 C_{1-6} 烷氧基、取代或未取代的苯甲酰氨基; 或-
 15 $(CH_2)_x$ -、 $-SCH=N$ -、 $-SC(C_{1-6} 烷基)=N$ -、 $-OCF_2O$ -、 $-[CH=CHC(O)O]$ -、 $-[N=CH-CHCH]$ -、 $-CH=N-NH$ -、 $-CH=CH-NH$ -、 $-OC(NHC_{1-6} 烷基)=N$ -、 $-OC(O)NH$ -、 $-C(O)NMeC(O)$ -、 $-C(O)NHC(O)$ -、 $-[(CH_2)_xC(O)]$ -、 $-N=N-NH$ -、 $-N=C(C_{1-6} 烷基)O$ -、 $-O(CH_2)_xO$ -、 $(CH_2)_xSO_2(CH_2)_y$ -和 $-N(C_{1-6} 烷基羰基)(CH_2)_x$ -, 其中 x 和 y 独立地为 1-4。

如 WO 00/21927 所公开的, 有属于式(IC)的、为式(IC')化合物亚组, 其中 R、 R^1 、 R^{10} 和 R^{11} 如式(IC)所定义, 条件是式(IC')不包括:

3-苯基氨基-4-苯基-1H-吡咯-2,5-二酮;

1-(4-甲基苯基)-3-[(4-甲基苯基)氨基]-4-苯基-1H-吡咯-2,5-二酮;

25 3-(4-甲基苯基)-1-苯基-4-(苯基氨基)-1H-吡咯-2,5-二酮;

1,3-双(4-甲基苯基)-4-[(4-甲基苯基)氨基]-1H-吡咯-2,5-二酮; 或

3-(4-硝基苯基)-1-苯基-4-苯基氨基-1H-吡咯-2,5-二酮。

适宜地, R 为氢。

适宜地, R^1 为氢。

适宜地, R^{10} 代表氢或一种或多种取代基, 其选自: 卤素、羟基、烷基、烷硫基、烷氧基、氨基或亚甲二氧基, 特别是一种或多种卤素和烷基基团。

5 有利地, R^{10} 代表氢或取代基, 其选自: 2-Br、2-Cl、2-F、2-OMe、3-Cl、3-F、3-Me、3-NH₂、3-OMe、4-Br、4-Cl、4-I、4-Me、4-OH、4-OMe、4-SMe、2,3-二-F、2,5-二-F、2,6-二-F、3,4-二-F、3,5-二-F、2,3,5-三-F、2,4-二-Cl、2,4-二-OMe、3,4-(OCH₂O)和 3,5-二-Me。

10 更有利地, R^{10} 代表选自以下的取代基: 2-Br、2-Cl、2-F、2-OMe、3-Cl、3-F、3-Me、4-Br、4-Cl、4-I、2,3-二-F、2,5-二-F、2,6-二-F、3,4-二-F、3,5-二-F、2,3,5-三-F、2,4-二-Cl 和 3,5-二-Me。

优选地, R^{10} 代表选自 2-F、2-OMe、3-F、4-Cl 和 2,3-二-F 的取代基。

15 适宜地, R^{11} 代表氢或一种或多种取代基, 其选自: 2-F、2-Me、3-Br、3-Cl、3-F、3-I、3-OH、3-OMe、3-OPh、3-SMe、3-CO₂H、3-CH₂CO₂H、3-CH₂CO₂Me、3-CH₂CONH₂、3-CH₂CONHMe、3-CH₂OH、4-Cl、4-F、4-Me、4-NHCOMe、4-NHPh、4-NHSO₂Me、4-NMe₂、4-OMe、4-COPh、4-SMe、4-CH₂CN、4-SO₂NH₂、4-(CH₂)₂OH、4-CH(OH)Ph、4-CH₂SO₂NHMe、4-CH₂CO₂H、4-(CH₂)₂CO₂H、4-(CH₂)₂CO₂Me、4-(CH₂)₂CONH₂、4-(CH₂)₃-CO₂H、4-(CH₂)₃CONH₂、4-CH=CHCO₂H、4-CH=CHCONH₂、4-OCH₂CO₂H、4-SCH₂CO₂H、4-S-[2-CO₂H-Ph]、4-S-[3-CO₂H-Ph]、4-CH₂(1,3-噻唑烷-2,4-二酮-5-基)、2,3-二-F、2,4-二-F、3,4-二-F、3,5-二-F、3-Cl-4-Br、3-Cl-4-Me、3-Br-4-Me、3-Cl-4-OH、3-Cl-4-OMe、3,5-二-Me、3,5-二-OMe、3,4-OC(O)NH-、3,4-OCF₂O-、3,5-二-Br-4-OH、3,5-二-Cl-4-Me、3,5-二-Cl-4-OH、3-CO₂H-4-[S-(2-CO₂H)-Ph]、3-CO₂H-4-[S-(2-CONHMe)-Ph]、3-CO₂H-4-Cl、3-F-4-Me、3-F-4-OMe、3,4-[(CH=N-NH)]-、3,4-[(N=N-NH)]-、3,4-[(NH-N=CH)]-、3,4-[(CH₂)₃]-、3,4-[(O(CH₂)₃O)]-、

20

25

3,4-[O-C(NHMe)=N]-、3,4-[OCH₂O]-、3,4-[S-C(NHMe)=N]-和 3,4-[S-CH=N]-。

有利地，R¹¹ 代表氢或选自以下的取代基：2-F、2-Me、3-Cl、3-F、3-I、3-OMe、3-OPh、3-SMe、3-CH₂CO₂H、3-CH₂CO₂Me、3-CH₂CONH₂、3-CH₂CONHMe、3-CH₂OH、4-Cl、4-F、4-Me、4-NHCOMe、4-NHPh、4-NHSO₂Me、4-NMe₂、4-OMe、4-COPh、4-SMe、4-CH₂CN、4-SO₂NH₂、4-(CH₂)₂OH、4-CH(OH)Ph、4-CH₂SO₂NHMe、4-CH₂CO₂H、4-(CH₂)₂CO₂H、4-(CH₂)₂CO₂Me、4-(CH₂)₂CONH₂、4-(CH₂)₃CO₂H、4-(CH₂)₃CONH₂、4-CH=CHCONH₂、4-OCH₂CO₂H、4-SCH₂CO₂H、4-S-[2-CO₂H-Ph]、4-S-[3-CO₂H-Ph]、4-CH₂(1,3-噻唑烷-2,4-二酮-5-基)、2,3-二-F、2,4-二-F、3,4-二-F、3,5-二-F、3-Cl-4-Br、3-Cl-4-Me、3-Br-4-Me、3-Cl-4-OH、3-Cl-4-OMe、3,5-二-Me、3,5-二-OMe、3,4-[OC(O)NH]、3,4-[OCF₂O]、3,5-二-Cl-4-Me、3-CO₂H-4-[S-(2-C(NHMe)-Ph)]、3-F-4-Me、3-F-4-OMe、3,4-[(CH=N-NH)]-、3,4-[(N=N-NH)]-、3,4-[(NH-N=CH)]-、3,4-[(CH₂)₃]-、3,4-[O(CH₂)₃O]-、3,4-[O-C(NHMe)=N]-、3,4-[OCH₂O]-、3,4-[S-C(NHMe)=N]和 3,4-[S-CH=N]。

更有利地，R¹¹ 代表选自以下的取代基：3-Cl、3-Br、4-OMe、3,5-二-F、4-CH₂SO₂NHMe、4-(CH₂)₃CO₂H 和 4-S-[3-CO₂H-Ph]。

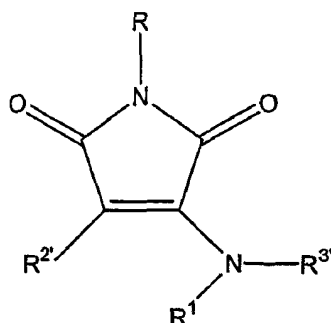
式(IC)的具体化合物是其中 R 和 R¹ 每个都代表氢，而 R¹⁰ 和 R¹¹ 每个都分别具有以下含义：

	<u>R¹⁰</u>	<u>R¹¹</u>
	4-Cl	3-Cl
	4-Cl	3-Br
25	2-OMe	4-OMe
	4-Cl	4-CH ₂ SO ₂ NHMe
	2-OMe	3,5-二-F
	2-F	3,5-二-F
	3-F	4-(CH ₂) ₃ CO ₂ H

2,3-二-F-Ph

3,5-二-F

如 WO 00/21927 所公开的, 有完全属于式(I)的、为式(ID)的化合物亚组:



5 其中 R 和 R¹ 如式(I)所定义;

R^{2'} 为苯基、取代的苯基或吡啶基;

R^{3'} 为氢、烷基、环烷基、苯基、取代的苯基、其中苯基可选被取代的 C₁₋₆ 烷基苯基、烷氧基烷基、取代或未取代的杂环基。

10 在一方面, 提供如前定义的式(I)的化合物, 其不包括式(ID)的化合物。

有属于式(ID)的、为式(ID')化合物亚组, 其中 R、R¹、R^{2'} 和 R^{3'} 如式(ID)所定义, 但条件是式(ID')不包括以下的后文称为清单 D' 的化合物:

- 1) 3-[2-苯并[b]噻吩-2-基-3-[4-(二甲氨基)-2,5-二氢-2,5-二氧代-1H-吡咯-3-基]-1H-吡啶-1-基]-亚氨基氨基甲硫代酸, 丙酯;
- 2) 3-(二甲氨基)-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 3) 3-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-4-(苯基氨基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 4) 3-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-4-[[4-(三氟甲基)苯基]氨基]-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 5) 3-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-4-(甲氨基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 6) 3-(6-氯-9H-嘌呤-9-基)-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 7) 3-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基)-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-

二酮;

- 8) 1-乙酰基-3-[2,5-二氢-1-甲基-2,5-二氧代-4-[[4-(三氟甲基)苯基]氨基]-1H-吡咯-3-基]-1H-吡啶;
- 9) 3-氨基-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 5 10) 3-氨基-4-(5-甲氧基-1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 11) 1H-吡啶-1-羧酸, 3-(4-氨基-2,5-二氢-1-甲基-2,5-二氧代-1H-吡咯-3-基)-, 1,1-二甲基乙酯;
- 12) 3-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-4-[(苯基甲基)氨基]-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 13) 甘氨酸, N-[2,5-二氢-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-2,5-二氧代-1H-吡咯-3-基]-, 乙酯;
- 10 14) 3-氨基-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 15) 3-[[3-[(3-氨基丙基)氨基]丙基]氨基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 16) 3-[[3-[4-(3-氨基丙基)-1-哌嗪基]丙基]氨基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 15 17) 3-(1H-吡啶-3-基)-4-[[3-(4-甲基-1-哌嗪基)丙基]氨基]-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 18) 1-[3-[(3-氨基丙基)氨基]丙基]-3-[[3-[(3-氨基丙基)氨基]丙基]氨基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 20 19) 1-[3-[4-(3-氨基丙基)-1-哌嗪基]丙基]-3-[[3-[4-(3-氨基丙基)-1-哌嗪基]丙基]氨基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 20) 3-(1H-吡啶-3-基)-1-[3-(4-甲基-1-哌嗪基)丙基]-4-[[3-(4-甲基-1-哌嗪基)丙基]氨基]-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 21) 3,3'-[亚氨基双(3,1-丙二基亚氨基)]双[4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮];
- 25 22) 3,3'-[1,4-哌嗪二基双(3,1-丙二基亚氨基)]双[4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮];
- 23) 3-氨基-4-(3,4-二甲氧基苯基)-1H-吡咯-2,5-二酮;

- 24) 3-[(5-氨基戊基)氨基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 25) 3-[[5-[(2-氨基乙基)氨基]戊基]氨基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 26) 3-[(2-氨基乙基)氨基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 5 27) 3-[(6-氨基己基)氨基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 28) 3-[(7-氨基庚基)氨基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 29) 3-[[2-[(2-氨基乙基)氨基]乙基]氨基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 30) 苯丙酰胺, α -氨基-N-[5-[[2,5-二氢-4-(1H-吡啶-3-基)-2,5-二氧代-1H-吡咯-3-基]氨基]戊基]-, (S)-;
- 10 31) 戊酸, 4-氨基-5-[[5-[[2,5-二氢-4-(1H-吡啶-3-基)-2,5-二氧代-1H-吡咯-3-基]氨基]戊基]氨基]-5-氧代-, (S)-;
- 32) 戊酰胺, 2-氨基-5-[(氨基亚氨基甲基)氨基]-N-[2-[[5-[[2,5-二氢-4-(1H-吡啶-3-基)-2,5-二氧代-1H-吡咯-3-基]氨基]戊基]氨基]乙基]-, (S)-;
- 15 33) 苯丙酰胺, α -氨基-N-[2-[[5-[[2,5-二氢-4-(1H-吡啶-3-基)-2,5-二氧代-1H-吡咯-3-基]氨基]戊基]氨基]乙基]-, (S)-;
- 34) 丁酰胺, 4-[(氨基亚氨基甲基)氨基]-N-[5-[[2,5-二氢-4-(1H-吡啶-3-基)-2,5-二氧代-1H-吡咯-3-基]氨基]戊基]-, (S)-;
- 20 35) 3-氨基-1,4-二苯基-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 36) 3-(4-甲基苯基)-1-苯基-4-[(苯基甲基)氨基]-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 37) 3-氨基-4-(4-甲基苯基)-1-苯基-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 38) 3-氨基-1-甲基-4-对-甲苯基-1H-吡咯-2,5-二酮;
- 39) 3-(2-二乙氨基-乙基)-4-苯基-吡咯-2,5-二酮;
- 25 40) 3-[丁基-(2-二乙氨基-乙基)-氨基]-4-苯基-吡咯-2,5-二酮;
- 41) 3-[苄基-(2-二甲氨基-乙基)-氨基]-4-苯基-吡咯-2,5-二酮;
- 42) 3-[苄基-(2-二甲氨基-乙基)-氨基]-1-甲基-4-苯基-吡咯-2,5-二酮;
- 43) 3-[苄基-(2-二甲氨基-乙基)-氨基]-4-(4-氯-苯基)-吡咯-2,5-二酮;

- 44) 3-[苄基-(2-二乙氨基-乙基)-氨基]-4-苯基-吡咯-2,5-二酮;
 45) 3-[苄基-(2-二甲氨基-乙基)-氨基]-4-(3-甲氧基-苯基)-吡咯-2,5-二酮;
 46) 3-(4-氯-苯基)-4-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-乙氨基]-吡咯-2,5-二酮;
 5 47) 3-[2-(4-甲基-哌嗪-1-基)-乙氨基]-4-苯基-吡咯-2,5-二酮;
 48) 3-苯基-4-(二乙氨基)-吡咯-2,5-二酮;
 49) 3-苯基-4-(苄氨基)-吡咯-2,5-二酮;
 50) 1-甲基-3-苯基-(2-二乙氨基乙氨基)-吡咯-2,5-二酮;
 51) 1-烯丙基-3-苯基-4-(2-二甲氨基乙氨基)-吡咯-2,5-二酮。

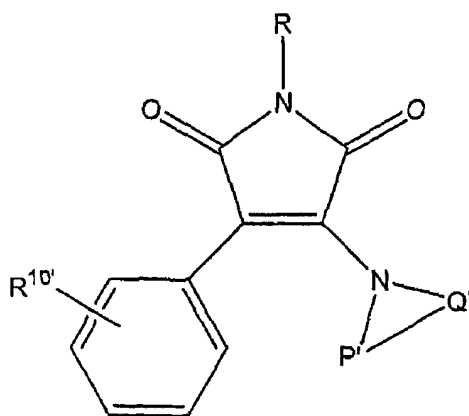
- 10 适宜地, $R^{2'}$ 为吡啶基、苯基或被一个或多个(适宜地最多三个)取代基取代的苯基, 其中所述取代基选自: 卤素、卤代烷基、烷氧基、硝基、烷基和烷氧基。

$R^{2'}$ 的实例包括苯基、吡啶-3-基、2-甲氧基苯基、3-氟苯基、3-硝基苯基、4-氯苯基、4-碘苯基、4-(三氟甲基)苯基和 2,3-二氟苯基。

- 15 适宜地, $R^{3'}$ 代表氢、 C_{1-6} 烷基、环己基、苯基、苄基、 C_{1-2} 烷基苯基、 C_{1-6} 烷氧基 C_{1-2} 烷基, 或取代或未取代的单环或稠合环的杂环基团, 其具有 5 或 6 个环原子, 每个环上最多有 3 个杂原子, 例如噁唑基、苯并呋喃基、二苯并呋喃基、吡啶基、喹啉基和嘧啶基。

- 20 $R^{3'}$ 的实例包括氢、乙基、环己基、苯基、苄-2-基、苄基、苯基 $(CH_2)_2$ -、 $MeO(CH_2)_2$ -、4-甲基噁唑-2-基、2-乙酰基苯并呋喃-5-基、二苯并呋喃-2-基、二苯并呋喃-3-基、2-甲基吡啶-3-基、2,6-二甲基吡啶-3-基、2-氯吡啶-5-基、喹啉-3-基、嘧啶-2-基。

如 WO 00/21927 所公开的, 有完全属于式(I)的、为式(IE)的化合物亚组:



其中 R 如式(I)所定义;

$R^{10'}$ 代表氢或一个或多个(适宜地最多三个)取代基, 其选自: 烷基、卤素和硝基。

- 5 $P'-Q'$ 代表 $(CH_2)_aO(CH_2)_b-$ 、 $(CH_2)_aS(CH_2)_b-$ 、 $-(CH_2)_c-$ 、 $-(CH_2)_dCH(G)(CH_2)_e-$ 、 $-(CH_2)_aN(ZZ)(CH_2)_b-$, 其中 a、b、d 和 e 独立地为 1-4, c 为 1-6, ZZ 为氢、烷基、芳基或烷基羰基, 而 G 为烷基、酰氨基、羟基烷基、芳烷基或羟基。

- 10 有属于式(I)的、为式(IE')的化合物亚组, 其中 R、 $R^{10'}$ 和 $P'-Q'$ 如式(IE)所定义, 但条件是式(IE')不包括:

3-苯基-4-哌啶-1-基-吡咯-2,5-二酮;

3-(4-甲基哌啶-1-基)-4-苯基-吡咯-2,5-二酮;

3-(4-乙基哌啶-1-基)-4-苯基-吡咯-2,5-二酮;

3-(4-氯苯基)-4-(4-甲基-哌啶-1-基)-吡咯-2,5-二酮;

- 15 3-(4-甲基苯基)-4-(4-吗啉基)-1-苯基-1H-吡咯-2,5-二酮;

3-苯基-4-(4-甲基哌啶并)-吡咯-2,5-二酮;

3-苯基-4-(4-苯基哌啶并)-吡咯-2,5-二酮;

1-甲基-3-苯基-4-(4-苯基哌啶并)-吡咯-2,5-二酮;

1-乙基-3-苯基-4-(4-氯苯基哌啶并)-吡咯-2,5-二酮;

- 20 1-烯丙基-3-苯基-4-(4-甲基哌啶并)-吡咯-2,5-二酮; 和

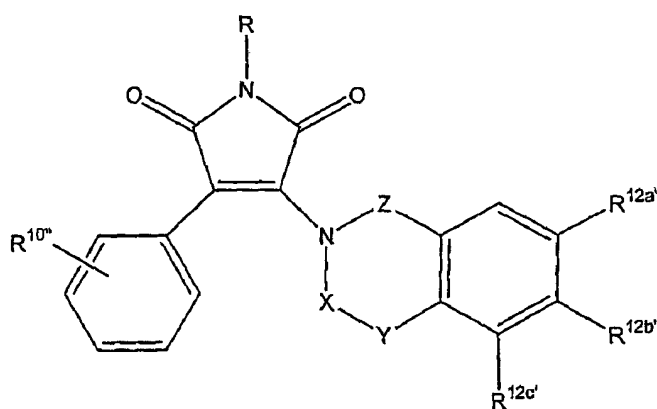
1,3-二苯基-4-哌啶并-吡咯-2,5-二酮。

适宜地, $R^{10'}$ 为甲氧基、氯或硝基。

$R^{10'}$ 的实例包括 4-甲氧基、4-氯、2,4-二氯和 3-硝基。

-P'-Q'- 的实例包括 $-(CH_2)_4-$ 、 $-(CH_2)_2O(CH_2)_2-$ 、 $-(CH_2)_3CH(Me)CH_2-$ 、 $-(CH_2)_3-CH(CONH_2)CH_2-$ 、 $-(CH_2)_3CH(CH_2OH)CH_2-$ 、 $-(CH_2)_2CH(CH_2Ph)(CH_2)_2-$ 、 $-(CH_2)_2CH(OH)(CH_2)_2-$ 、 $-(CH_2)_5-$ 和 $(CH_2)S(CH_2)_2-$ 。

如 WO 00/21927 所公开的, 有完全属于式(I)的、为式(IF)的化合物亚组:



其中 R 如式(I)所定义;

$R^{10''}$ 为一个或多个(适宜地最多三个)取代基, 其选自: 全氟烷基、卤素、硝基、烷氧基、芳基羰基、烷基;

Z 为键或亚烷基链;

-X-Y- 为 $-CH=N$ 、 $(CH_2)_t-$ 、 $-(CH_2)_uCH(U)-$ 、 $-(U)CH(CH_2)_u-$ 、 $-CH=CH-$ 、 $-(CH_2)_vC(烷基)_2-$ 、 $-C(O)C(烷基)_2-$ 、 $-C(O)O-$, 其中 t、u 和 v 独立地为 1-4, U 为烷基、羧基、烷氧基羰基、羟基烷基和酰氨基;

$R^{12a'}$ 、 $R^{12b'}$ 和 $R^{12c'}$ 各自独立地为氢、硝基、烷氧基、4-乙基哌嗪-1-基、4-BOC-哌嗪-1-基、4-甲基-哌嗪-1-基、4-甲基-哌嗪-1-基、卤素、烷基、哌嗪-1-基、全氟烷基和烷基磺酰基氨基。适宜地, Z 为键或 C_{1-2} 亚烷基链。

Z 的实例包括键、亚甲基或亚乙基。

-X-Y- 的实例为 $-CH=N$ 、 $(CH_2)_2-$ 、 $-CH(Me)CH_2-$ 、 $-CH=CH-$ 、-

CH(CO₂H)CH₂-、-CH(CO₂Me)CH₂-、-(CH₂)₃-、-CH(CH₂OH)CH₂-、-CH₂CH(CH₂OH)-、-CH₂CH(Me)-、-CH₂C(Me)₂-、-CH(CONH₂)CH₂-、-C(O)C(Me)₂-和-C(O)O-。

5 R^{12a'}、R^{12b'}和 R^{12c'}的实例包括氢、硝基、氟、甲氧基、4-乙基哌嗪-1-基、4-BOC-哌嗪-1-基、4-甲基-哌嗪-1-基、4-甲基-哌嗪-1-基、氯、溴、三氟甲基和甲磺酰基氨基。

Z 优选为键。

-X-Y- 优选为 -(CH₂)₂- 或 -CH(CH₂OH)CH₂-、-CH(Me)CH₂-、-CH₂CH(Me)-或-CH₂C(Me)₂-。

10 R^{12b'} 优选为氟。

R^{12a'} 优选为氟。

R^{10''} 最优选为 2-Br、2-Cl、2-F、2-OMe、3-Cl、3-F、3-Me、4-Br、4-Cl、4-I、2,3-二-F、2,5-二-F、2,6-二-F、3,4-二-F、3,5-二-F、2,3,5-三-F、2,4-二-Cl、3,5-二-Me;

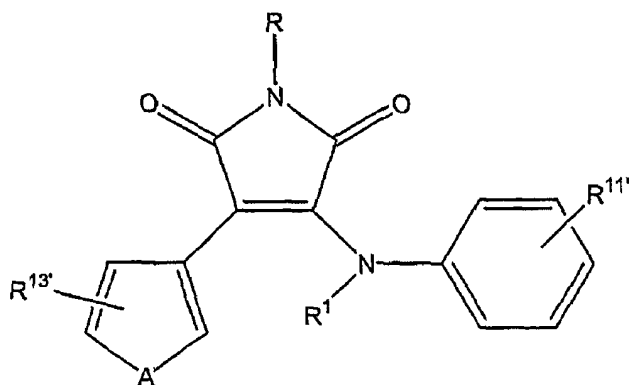
15 Z 为键;

-X-Y-为-(CH₂)₂-、-CH(CH₂OH)CH₂-、-CH(Me)CH₂-、-CH₂CH(Me)-或 CH₂C(Me)₂-;

R^{12b'} 为氟;

R^{12a'} 为氟。

20 如 WO 00/21927 所公开的, 有完全属于式(I)的、为式(IG)的化合物亚组:



其中 R 和 R¹ 如式(I)所定义;

A 是 N(烷基)、氧或硫。

A 的实例是 N(甲基)、氧和硫。

A 优选为硫。

- 5 R^{11''} 为一个或多个(适宜地最多三个)选自以下基团的取代基: 氢、卤素、烷基、烷硫基、-S-CH=N-、苯氧基、-(CH₂)_w-、羟基、羧基、-O(CH₂)_xO-、羟基烷基和烷基氨基磺酰基烷基, 其中 w 和 x 独立地为 1-4。

- 10 R^{11''} 的实例为氢、溴、甲基、甲硫基、氯、-S-CH=N-、苯氧基、-(CH₂)₃-、羟基、羧基、-O(CH₂)O-、氟、羟甲基和 MeNHSO₂CH₂-。

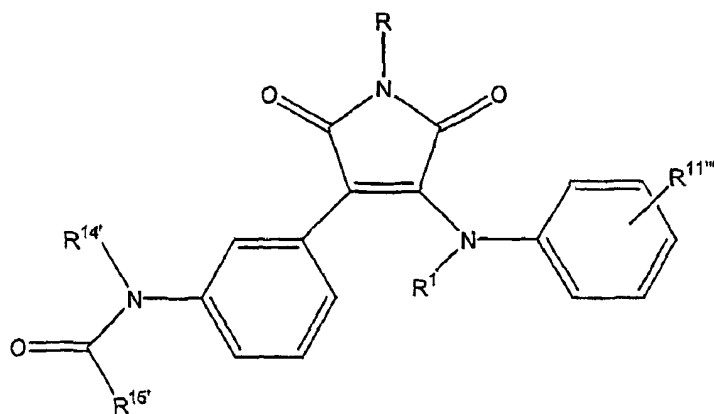
R^{11''} 优选为 3-Br、4-Me、4-SMe、3-Br-4-Me、3-Cl、3,4-[S-CH=N]-、3-OPh、3,4-[(CH₂)₃]-、3-SMe、氢、3,5-二 Br-4-OH、3,5-二 Cl-4-OH、3-CO₂H-4-Cl、3,4-[-OCH₂O]-、3-Cl-4-OH、3,5-二 F、3-CH₂OH、3-OH 或 4-CH₂SO₂NHMe。

- 15 R^{13'} 为一个或多个(适宜地最多两个)选自以下基团的取代基: -(CH=CH)₂-和氢。

R^{13'} 的实例包括 4,5-[(CH=CH)₂]-和氢。

R^{13'} 优选为氢。

- 20 如 WO 00/21927 所公开的, 有完全属于式(I)的、为式(IH)的化合物亚组:



其中 R 和 R¹ 如式(I)所定义;

R^{11'''} 为其中 aa 为 1-4 的 $-\text{[(CH}_2\text{)}_{aa}]$;

R^{14'} 为氢;

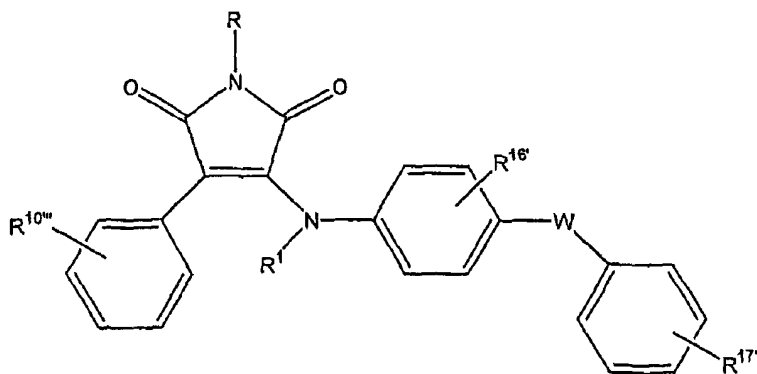
5 R^{15'} 为烷基、未取代或取代的苯氨基、未取代或取代的苯基烷基氨基、环己基氨基、烯基氨基、苯基、苄基、苯乙烯基或烷氨基。

R^{11'''} 的实例包括 3,4- $-\text{[(CH}_2\text{)}_3]$

适宜地, R^{15'} 为 C₁₋₆ 烷基、(卤苯基)氨基、苯基烷基氨基、环己基氨基、丙烯基氨基、苯基、苄基、苯乙烯基、丙基、乙氨基或(甲氧基苯基)氨基。

10 R^{15'} 的实例包括甲基、(3-氟苯基)氨基、苯基乙氨基、环己基氨基、丙烯基氨基、苯基、苄基、反-苯乙烯基、正丙基、乙氨基或(3-甲氧基苯基)氨基。

如 WO 00/21927 所公开的, 有完全属于式(I)的、为式(IJ)的化合物亚组:



15

其中 R 和 R¹ 如式(I)所定义;

R^{10'''} 代表一个或多个(适宜地最多三个)独立地选自以下的取代基: 烷氧基或卤素。

20 R^{16'} 代表一个或多个(适宜地最多三个)独立地选自以下的取代基: 氢、羧基、烷氧基羰基或烷氨基羰基;

R^{17'} 代表一个或多个(适宜地最多三个)独立地选自以下的取代基: 羧基、烷氧基羰基、卤素、烷氨基羰基、硝基或氢;

W 为硫、氧或取代或未取代的 NH。

适宜地, W 为硫或氧。有利地, W 为硫。

适宜地, $R^{10''}$ 为 C_{1-6} 烷氧基、氯或氟。

$R^{10''}$ 的实例为甲氧基、4-Cl、2-Cl 和 2,3-二 F。

5 有利地, $R^{10''}$ 为 2,3-二 F。

适宜地, $R^{16'}$ 为氢、羧基、 C_{1-6} 烷氧基羰基或 C_{1-6} 烷氨基羰基。

$R^{16'}$ 的实例为羧基、氢、乙氧基羰基、甲氧基羰基和甲氨基羰基。

有利地, $R^{16'}$ 为氢。

适宜地, $R^{17'}$ 为羧基、 C_{1-6} 烷氧基羰基、卤素、 C_{1-6} 烷氨基羰基、

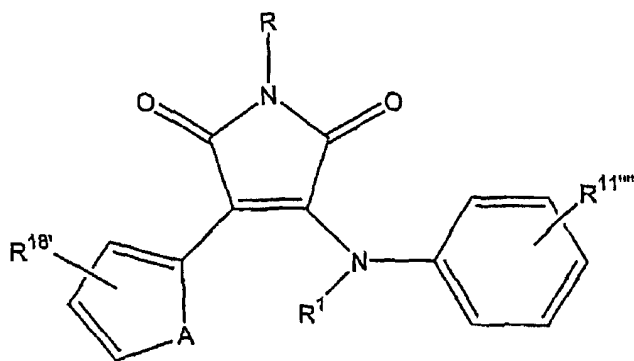
10 硝基或氢;

$R^{17'}$ 的实例为 2-羧基、3-羧基、4-羧基、4-Cl、2-甲氨基羰基、4-硝基、氢和 2-乙氧基羰基。

有利地, $R^{17'}$ 为 3-羧基。

如 WO 00/21927 所公开的, 有完全属于式(I)的、为式(IK)的化

15 合物亚组:



其中 R 和 R^1 如式(I)所定义;

20 $R^{11'''}$ 代表一个或多个(适宜地最多三个)独立地选自以下的取代基: 卤素或羟基;

$R^{18'}$ 代表一个或多个(适宜地最多三个)独立地选自以下的取代基: 氢、烷基和 $-(CH=CH)_2-$;

A 为硫。

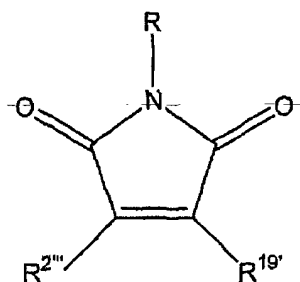
适宜地, $R^{11''''}$ 为氯或羟基。

$R^{11''''}$ 的实例为 3-Cl 和 3,5-二 Cl-4-羟基。

适宜地, $R^{18'}$ 为氢、 C_{1-6} 烷基或 $-(CH=CH)_2-$ 。

5 $R^{18'}$ 的实例包括氢、甲基和 3-甲基-4,5- $[(CH=CH)_2]-$ 。

如 WO 00/21927 所公开的, 有完全属于式(I)的、为式(IL)的化合物亚组:



其中 R 如式(I)所定义;

10 $R^{2'''}$ 为未取代或取代的杂环基或未取代或取代的芳基;

$R^{19'}$ 为未取代或取代的杂环基或其季铵盐。

有属于式(IL)的、为式(IL')的化合物亚组, 其中 R、 $R^{2'''}$ 和 $R^{19'}$ 如式(IL)所定义, 但条件是(IL')不包括以下在后文被称为名单 L' 的化合物:

15 3-吡啶-1-基-4-(1-甲基-1H-吡啶-3-基)-吡咯-2,5-二酮;

氯化 1-(1-甲基-2,5-二氧代-4-苯基氨基-2,5-二氢-1H-吡咯-3-基)-吡啶鎓;

氯化 1-1-(4-甲基-戊基)-2,5-二氧代-4-苯基氨基-2,5-二氢-1H-吡咯-3-基)-吡啶鎓;

20 氯化 1-(1-十二烷基-2,5-二氧代-4-苯基氨基-2,5-二氢-1H-吡咯-3-基)-吡啶鎓;

3-[2,5-二氢-4-(1H-咪唑-1-基)-1-甲基-2,5-二氧代-1H-吡咯-3-基]-1H-吡啶-1-羧酸, 1,1-二甲基乙酯;

3-(1H-咪唑并[4,5-b]吡啶-1-基)-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮;

3-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-4-(1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-1-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;

5 3-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-4-(1-哌啶基)-1H-吡咯-2,5-二酮;

3-[4-(二苯基甲基)-1-哌嗪基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮;

3-(1H-苯并咪唑-1-基)-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮;

10 3-(1H-苯并三唑-1-基)-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮;

3-(1H-咪唑-1-基)-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮;

3-(1H-吡啶-1-基)-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮;

3-(1H-咪唑-1-基)-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮;

15 3-[3-[(二甲氨基)甲基]-1H-吡啶-1-基]-4-(1H-吡啶-3-基)-1-甲基-1H-吡咯-2,5-二酮;

3-(1H-苯并咪唑-1-基)-4-(1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮;

3-(1H-吡啶-1-基)-4-(1-甲基-1H-吡啶-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮; 和

3-(3,5-二甲基-1-苯基-1H-吡唑-4-基)-4-(4-吗啉基)-1H-吡咯-2,5-二

20 酮。

适宜地, $R^{2''}$ 为噻吩基、苯基或一个或多个卤素基团取代的苯基。

$R^{2''}$ 的实例包括苯基、3-噻吩基、2-噻吩基、4-氯苯基和 2,4-二氯苯基。

有利地, $R^{2''}$ 为苯基、3-噻吩基、4-氯苯基或 2,4-二氯苯基。

25 适宜地, $R^{19'}$ 为二氢吡啶基、卤化吡啶鎓、氮杂双环辛基或三氮杂螺癸酮基。

$R^{19'}$ 的实例包括二氢吡啶-1-基、氯化 3-氨基-1-吡啶鎓、2-甲基二氢吡啶-1-基、1,3,3-三甲基-6-氮杂双环[3,2,1]辛-6-基和 1-苯基-1,3,8-

三氯杂螺-[4,5]-癸-4-酮-8-基。

有利地，R^{19'}为二氢吲哚-1-基或2-甲基二氢吲哚-1-基。

式(I)的某些化合物可包含至少一个手性碳，因此其可存在一种或多种立体异构形式。本发明包括式(I)化合物的所有立体异构形式，
5 无论是单个的异构体还是异构体的混合物，包括外消旋物。

本发明特别优选的化合物包括 3-(2,4-二氯苯基)-4-(1-甲基-1H-吲哚-3-基)-1H-吡咯-2,5-二酮和 3-(3-氯-4-羟基苯基氨基)-4-(2-硝基苯基)-1H-吡咯-2,5-二酮。这些马来酰亚胺分别以 9 nM 和 31 nM 的 K_s 体外抑制 GSK-3 α (Coghlan et al., *Chem. & Biol.* 7(10):793-803
10 (2000))。两种化合物抑制 GSK-3 β 同工型的效力相似。

已经使用自动化阵列方法学鉴别出 GSK-3 的其它马来酰亚胺抑制剂(即 3-苯胺基-4-芳基马来酰亚胺)(Smith et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11(5):635-9 (2001))。

本文还设想使用为蛋白激酶 C (PKC)抑制剂的马来酰亚胺化合物。这样的马来酰亚胺包括 RO-31-8220, 双吲哚基马来酰亚胺、吲哚并吡啶 K-252a、茚醌、Calphostin C、Calphostin C、Go 6976、Go 6983 和异喹啉磺酰胺 H7。关于这些马来酰亚胺的活性, 参见 Debais et al., *J. Cell. Biochem.* 81(1):68-81 (2001) 和 Yang et al., *Mol. Pharm.* 61(5):1163-73 (2002)。优选的物质是 PKC 选择性的, 例如 RO-31-
15 8220, 其对 PKC α 同工型具有显著的特异性(Schwaller et al., *Br. J. Cancer* 76(12):1554-7 (1997))。

抑制 GSK-3 的两种马来酰亚胺是 SB-216763 和 SB-415286。这些马来酰亚胺分别以 9 nM 和 31 nM 的 K_s 体外抑制 GSK-3 α (Coghlan et al., *Chem. & Biol.* 7(10):793-803 (2000))。两种化合物抑制 GSK-3 β
20 同工型的效力相似。

另一组马来酰亚胺是双吲哚基马来酰亚胺 I 和 IX, 其显示为有效的 GSK-3 抑制剂(Hers et al., *FEBS Lett.* 460(3):433-6 (1999))。已经使用自动化阵列方法学鉴别出 GSK-3 的其它马来酰亚胺抑制剂(即 3-

苯胺基-4-芳基马来酰亚胺)(Smith et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 11(5):635-9 (2001))。

另一组可调节 GSK-3 的化合物是 Akt-3 (也称为蛋白激酶 B 或 RAC-PK)调节化合物。例如, Akt-3 抑制剂 RO 31-8220、星孢素(Masure et al., *Eur. J Biochem.* 265(1):353-60 (1999))和托泊替康(Nakashio et al., *Cancer Res.* 60:5303-09 (2000))可用于调节 GSK-3。尽管 RO 31-8220 是 PKC 抑制剂, 而星孢素是广谱激酶抑制剂, 但它们两个都有效抑制 Akt-3 活性。

一组蛋白激酶 C 抑制剂也可能有效。优选的抑制剂是选择性抑制剂, 例如 RO 31-7549、RO 31-8220、Calphostin C 和伊莫福新(Amon et al., *Agents & Actions* 39(1-2):13-9 (1993))。

其它的 GSK-3 抑制剂和调节剂可使用以下的本领域技术人员已知的实验确定。然后, 对于使用这些实验鉴别的物质, 可使用本文公开的用于评价骨矿化增强的体内和体外实验进一步评价。

一种用于评价 GSK-3 调节化合物的实验使用 GSK-3 肽。用于所述实验的 GSK-3 特异性肽来源于糖原合酶的磷酸化位点, 该肽的序列为: YRRAAVPPSPSLSRHSSPHQ(S)EDEEE。该丝氨酸(S)是预磷酸化的。

用于制备糖原合酶肽和 $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]$ ATP 的缓冲液由 25 mM MOPS、0.2 mM EDTA、10 mM 乙酸镁、0.01% Tween-20 和 7.5 mM 巯基乙醇组成, pH 7。将化合物溶解在二甲基亚砜(DMSO)中, 终浓度为 100 mM。制备不同浓度的 DMSO 溶液, 并与底物(即 GSK-3 肽)溶液(至终浓度为 20 μM)连同兔或人 GSK-3 α 和 GSK-3 β (终浓度 0.5 U/ml 酶)混合。加入掺加 $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]$ ATP (500 cpm/pmol)的 ATP 混合物(终浓度 10 μM)启动反应。于室温 30 分钟后, 通过加入 10 μL H_3PO_4 /0.01% Tween-20 (2.5%)终止反应。将一定体积(10 μL)的混合物点在 P-30 磷酸纤维素纸上。该纸用 H_3PO_4 (0.5%)漂洗 4 次, 每次漂洗 2 分钟, 空气干燥, 放射性磷酸掺入结合 P-30 磷酸纤维素纸的合成糖原合酶肽中, 并使

用闪烁计数器计数。

另一种筛选 GSK-3 抑制化合物的方法是基于激酶磷酸化生物素化肽的能力，生物素化肽的序列来源于糖原合酶的磷酸化位点，其序列为：Biot-KYRRAAVPPSPSLSRHSSPHQ(S)EDEEE，其中“Biot”是指生物素部分。丝氨酸(S)是预磷酸化丝氨酸，如同体内的糖原合酶。然后将磷酸化的生物素化肽捕获在链霉抗生物素蛋白包被的 SPA 珠(Amersham Technology)上，其中 ^{33}P 的信号可通过珠中含有的闪烁体放大。

激酶以在 25 mM MOPS 缓冲液 pH 7.0 中的 10 nM 终浓度进行测定，该缓冲液含有 0.01% Tween-20、7.5 mM 2-巯基乙醇、10 mM 乙酸镁和 10 μM $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ 。于室温温育 60 分钟后，加入 50 mM 含链霉抗生物素蛋白包被的 SPA 珠的 EDTA 溶液终止反应，最终在 384 孔微量滴定板的每个测试孔中获得 0.5 mg 珠。适宜的话也可以使用其它板。

制备本发明化合物在 100% DMSO 中的 10 mM 母液，作为筛选程序的第一步。第二步包括创建剂量-反应板，其中整个板上的这些化合物都进行稀释，其中在激酶实验中的最终低和高浓度为 0.008 和 10 μM 。第三步包括创建实验板。这可通过将化合物由 4 个 96 孔剂量-反应板转移至 384 孔实验板实现。第四步是如所述进行实验，使用 Microbeta 液体闪烁和发光计数器计数所获得的板。最后一步是数据获取和分析，其中每个化合物都生成 IC₅₀ 值。

最有效的本发明化合物表现出的 IC₅₀ 值优选在约 1-10 nM 的范围内。

在再另一个实验中，使用蛋白激酶 C (PKC)。PKC 肽可为牛髓鞘碱性蛋白的片段(残基 4-14)。该序列为 PKC 特异性底物。用于制备髓鞘碱性蛋白和 $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]\text{-ATP}$ 的缓冲液由 pH 7.50 的 10 mM Tris、0.9 mM EGTA、200 μM 氯化钙、10 mM 氯化镁和终浓度 40 $\mu\text{g/ml}$ 的 L- α -磷脂酰-L-丝氨酸以及 1 $\mu\text{g/ml}$ 的 1,3-甘油二油酸酯组成。

将候选化合物或其它试剂溶解在二甲基亚砷(DMSO)中, 终浓度为 100 mM。制备不同浓度的 DMSO 溶液, 并与上述的底物(即髓鞘碱性蛋白)溶液(终浓度 0.1 mg/mL)连同相关的人重组 PKC 同工型(终浓度 88 mU/mL)混合。加入掺加 $[\gamma\text{-}^{33}\text{P}]$ ATP (500 cpm/pmol)的 ATP 混合物(终浓度 10 μM)启动反应。于室温 20 分钟后, 将 15 μL 反应物点在 P-30 磷酸纤维素纸上。该纸用 0.5% H_3PO_4 漂洗 4 次, 每次漂洗 2 分钟, 空气干燥, 放射性磷酸掺入结合 P-30 磷酸纤维素纸的髓鞘碱性蛋白中, 其用 Microbeta 闪烁计数器计数。这些实验可进行改良, 以用于鉴别调节本文所述任何参与骨重建的其它蛋白的化合物。

7.1.2 PKA 抑制剂

如上文对 GSK-3 抑制剂的论述, PKA 抑制剂应具有相似的用途。优选的 PKA 抑制剂包括但不限于 H89 (Calbiochem)。其它的 PKA 抑制剂包括但不限于: 蛋白激酶 A 抑制剂 5-24、抑制剂 6-22 Amide 和抑制剂 14-22 Amide (Calbiochem)。

7.1.3 PKC 抑制剂

如上文对 GSK-3 抑制剂的论述, PKC 抑制剂应具有相似的用途。设想的 PKC 抑制剂包括但不限于: 20-28 十四酰基化的 PKC 抑制剂、651-658 十四酰基化的 EGF-R 片段、Ro31-8425、Ro32-0432 等 (Calbiochem)。

7.1.4 MEK1/2 抑制剂

如上文对 GSK-3 抑制剂的论述, MEK 1/2 抑制剂应具有相似的用途。MEK 1/2 抑制剂包括但不限于 U0126 (Calbiochem)和 PD98059 (Calbiochem)。

7.1.5 MAPK 抑制剂

如上文对 GSK-3 抑制剂的论述, MAPK 抑制剂应具有相似的用

途。设想的 P38 MAPK 抑制剂包括但不限于: SB203580 (Ishizuka et al., *J. Immunol.* 167(4):2298-304 (2001), 可由 Calbiochem 获得)、SB202190 (Karahashi et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1502(2):207-23 (2000))、PD169316 (Paine et al., *J. Biol. Chem.* 275(15):11284-290 (2000))、fr-167653 (Matsuoka et al., *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 283:L103-12 (2002))、[反-1-(4-羟基环己基)-4-(4-氟苯基)-5-(2-甲氧基吡啶亚氨-4-基)咪唑](Underwood et al., *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 279(5):L895-902 (2000))和 2-(4-氟苯基)-4-(4-氟苯基)-5-吡啶-4-基-1,2-二氢吡唑-3-酮(Calbiochem)。

10

7.1.6 JNK 抑制剂

如上文对 GSK-3 抑制剂的论述, c-Jun 氨基激酶(JNK)通路抑制剂应具有相似的用途。设想使用的 JNK 抑制剂包括但不限于: SP-600125 (Calbiochem)、K252a 家族 CEP-1347/KT-7515 的咧啉并吡唑 (Saporito et al., *Prog. Med. Chem.* 40:23-62 (2002); 和 Maroney et al., *J. Neurochem.* 73(5):1901-12)), 和结合 JNK 的 JNK-相互作用蛋白-1 (JIP-1) 肽(Barr et al., *J. Biol. Chem.* 277(13):10987-97 (2002))。

15

7.1.7 钙动员抑制剂

如上文对 GSK-3 抑制剂的论述, 钙动员抑制剂应在调节骨矿化和 Wnt 通路及其研究方面具有相似的用途。一个优选的钙动员抑制剂是 Calbiochem 生产的[盐酸 3,4,5-三甲氧基苯甲酸 8-(二乙氨基)辛酯 (TMB-8)。

20

7.1.8 MAPKAPK2 抑制剂

25

促分裂原活化的蛋白激酶活化的蛋白激酶-2 (MAPKAPK2)抑制剂也可用于和所述 GSK-3 抑制剂相同的目的。MAPKAPK2 是上述的 MAPK 的下游底物。因此, MAPK 抑制剂也抑制 MAPKAPK2。MAPKAPK2 抑制剂包括但不限于: Hsp25 激酶抑制剂(Calbiochem, 目

录号 No. 385880)和 SB203580 (Ishizuka et al., *J. Immunol.* 167(4):2298-304 (2001))。

7.1.9 G-蛋白偶联的信号转导抑制剂

- 5 G-蛋白偶联信号转导抑制剂如百日咳毒素(Sigma), 可用于本文论述的用于 GSK-3 抑制剂的实验。也可使用其它的 G-蛋白偶联信号转导抑制剂。

7.1.10 一氧化氮合酶抑制剂

- 10 还设想以和本文论述的 GSK-3 抑制剂用途相似的方式使用一氧化氮合酶(NOS)抑制剂。设想的 NOS 抑制剂包括但不限于: N(G)-硝基-L-精氨酸(L-NNA)(Clark et al., *Resuscitation* 57(1):101-8 (2003))和 L-NAME (Sigma)。

15 7.1.11 COX-2 抑制剂

- 还设想了 COX-2 抑制剂类似于本文论述的 GSK-3 抑制剂的用途。COX 抑制剂包括但不限于: 吲哚美辛(Sigma)、VIOXX (罗非考昔, Merck & Co.)、CELEBREX (塞来考昔, G.D. Searle & Co.)、2-氨基磺酰基苯基-3-苯基-吲哚 5a (Hu et al., *Bioorg. Med Chem.* 11(7):1153-60 (2003))和 SC-560 (Pinheiro et al., *Inflamm. Res.* 51(12):603-10 (2002))。
- 20

7.2. 核酸和多肽

- 本文还考虑了核酸, 其调节(优选活化) Wnt 通路或任何所列单独或与其它物质组合的骨载荷作用下被上调和下调的蛋白/基因。这些核酸优选增强骨重建, 以使骨密度更大。本文考虑的核酸包括结合基因的有义或反义链或基因转录物的反义化合物。考虑的核酸还包括促进 RNA 干扰的小抑制 RNA (siRNA)。反义和 siRNA 分子的合适靶包括 GSK 和联蛋白、LRP5、LRP6、Axin 以及 Wnt 通路的
- 25

任何其它成员。

还考虑了调节 Wnt 通路的多肽。这样的多肽包括下文要进一步讨论的免疫球蛋白、肽适体、封闭性化合物等。

5 7.2.1. RNA 干扰

为了治疗目的, 还可以使用 RNA 干扰(RNAi)分析或调节在 Wnt 通路中参与骨矿化的蛋白。这是一种转录后基因沉默技术, 其中靶基因活性用关连双链 RNA (dsRNA)特异性消除。RNAi 在许多方面类似于植物中的 PTGS, 并且已经在许多无脊椎动物中被检出, 包括锥虫、水螅、涡虫、线虫和果蝇(*Drosophila melanogaster*)。RNA 干扰可参与调节转座因子活动和抗病毒状态形成。哺乳动物系统中的 RNA 干扰公开于 PCT 申请 WO 00/63364, 该申请通过引用整体结合到本文中。基本上, 将与靶(例如 GSK-3 或 β -联蛋白或本文任何表中描述的在单独或与其它物质组合的骨载荷作用下被上调和下调的任何基因 RNA)同源的 dsRNA 导入到细胞中, 并观察基因活性的序列特异性下降。设想将小干扰 RNA (siRNA)和短发夹 RNA (shRNA)用于这种用途。参见例如 Yu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 6047-6052 (2002); Paddison et al., *Genes & Dev.*, 16:948-58 (2002); Brummelkamp et al., *Science* 296:550-53 (2002); Tuschl, (2002) *Nature Biotechnology* 20:446-8 (2002); 以及其中提及的参考文献。这些部分可用作进一步表征骨重建的研究工具, 以及用作在患者中调节骨重建的试剂。

在 Wnt 通路中使用 RNAi 技术研究的一个具体目的基因是 β -联蛋白。 β -联蛋白是经典 Wnt 通路的基本组分。该通路一活化, β -联蛋白就不再被磷酸化, 因此在胞质中累积, 并转运入核中。一进入核中, β -联蛋白就解除靶向的转录因子的抑制剂, 包括 TCF 和 LEF, 然后再活化转录。

这些实验可使用图 15 示意的通路中的任何基因, 或者可使用任何表中列出的被上调和下调的基因。例如, β -联蛋白 RNAi 可被转染

入 MC3T3 细胞(或其它合适的骨细胞系)中。然后如前所述使细胞承受载荷 5 小时。然后可对基因进行实时 PCR (或其它 RNA 分析方法)。评价连接蛋白 43、骨粘连蛋白、OPG、eNOS、COX-2、PTGS、IL-6、细胞周期蛋白 D1、卷曲蛋白 2、Wnt 10B、SFRP1 和 SFRP4 之类的基因或本文论述的在骨载荷和/或 Wnt 通路调节作用下被调节的任何基因的基因表达。

为特异性鉴别依赖于 LRP5 表达的载荷反应型基因, 可用 LRP5 RNAi 转染 MC3T3 细胞。与使用 β -联蛋白 RNAi 的实验相类似, 评价在有和没有 LRP5 RNAi 情况下载荷细胞之间的基因表达反应。如果证实了 LRP5 表达被封闭, 并且观察不到 LRP5 RNAi 处理样品的差异, 则有可能是 LRP6 (LRP5 的紧密家族成员)可补偿 LRP5 功能。为验证这一点并获知是否可观察到 LRP6 对载荷反应的影响, 可用单独的 LRP6 RNAi 以及 LRP6 和 LRP5 RNAi 组合转染 MC3T3 细胞。因此, 在这种情况下, RNAi 可用于进一步表征 LRP5 和 LRP6 彼此之间的相对活性和骨重建。

更具体地说, 可如下进行 RNA 干扰实验。在 Bioflex 6 孔板中用生长培养基培养骨细胞如 MC3T3 细胞 3 天, 直至 80%汇合。然后去除培养基, 用 2 mL OptiMEM (Invitrogen)漂洗细胞。通过用 250 μ L OptiMEM 预稀释 10 μ L Lipofectamine 2000 (每孔), 制备 DNA/Lipofectamine 2000 混合物。然后将该混合物与 250 μ L OptiMEM 中的 4 μ g 双链 RNAi 混合。将 OptiMEM 从细胞中去除, 向细胞中加入混合的 DNA/Lipofectamine 混合物(共 500 μ L), 并于 37 $^{\circ}$ C 温育 4 小时。然后将培养基更换为生长培养基或含 0.25% BSA 的无血清培养基, 并温育 24 小时。随后如本文先前所述使细胞承受 50-5,000 μ E 的机械载荷(例如 3,400 μ E)。

然后收获 RNA。可在给予机械载荷后即时以及此后的任何时间点(例如载荷后 24 小时)收获 RNA。然后使用本文描述的任何方法如实时 PCR 分析 RNA。

7.2.2 反义化合物

在本发明的另一方面，可使用反义化合物改变参与 Wnt 通路调节(优选活化 Wnt 通路以及骨矿化)的蛋白，用于诊断、研究和治疗目的。

作为实例，可如下制备反义寡核苷酸。使用反义技术在成骨细胞样鼠细胞系 MC3T3 中进行研究。可触发这些细胞沿着骨分化顺序发育。初始增殖阶段的特征在于分化标记最小表达和胶原胞外基质开始合成。胶原基质合成需要随后的分化标记诱导。基质合成一开始，成骨细胞标记基因就以明确的时间顺序被活化：早期诱导碱性磷酸酶，而骨涎蛋白和骨钙蛋白在分化过程后期出现。基因表达的这种时间顺序用于监测成熟和矿化过程。基质矿化直至成熟开始后数天才开始，其包括矿物质沉积在胶原原纤维之上和之中，胶原原纤维位于基质内部，接近细胞层-培养板交界面。由培养的成骨细胞形成的结合胶原原纤维的矿物质类似于在体内编织骨中存在的物质，因此经常用作研究试剂。

按照生产商的说明(美国专利 No. 5,849,902)，用反义寡核苷酸转染分化第一周的 MC3T3 细胞(或其它合适的骨细胞系)。通常，将反义寡核苷酸转染入骨细胞如 MC3T3 中。然后按照生产商的说明或本领域已知的其它方法由细胞中分离出 RNA。进行 RNA 印迹、实时 PCR 或替代性 RNA 实验，分析反义多核苷酸的作用。另外，可进行转录谱分析，以研究参与 Wnt 信号转导的蛋白其编码基因的反义化合物对 Wnt 通路的影响。

7.3 多肽

除了调节(优选上调) Wnt 通路(由此增强骨矿化)的核酸之外，还考虑了多肽及其生物活性片段以及适体。合适的蛋白和生物活性片段包括多肽和适体(其调节图 16 所示通路的蛋白，例如 GSK-3 和 β -

联蛋白)。还考虑了可调节活性的任意类型的免疫球蛋白(例如抗体)(例如单克隆、多克隆、 λ 噬菌体抗体(Cat 技术)及其片段)。

5 以上论述的体外载荷实验也可用于研究载荷反应型基因及其编码蛋白(即骨载荷基因谱)对其它已知的合成 Wnt 通路激动剂(例如其它 GSK-3 抑制剂样化合物)、天然 Wnt 通路配体和合成配体的基因反应。

10 可在 MC3T3 细胞(或其它合适的骨细胞系)中用与 LRP5 相互作用并活化 Wnt 信号转导的已知 Wnt 通路活化剂评价 Wnt 通路活化的水平, 其中所述 Wnt 通路活化剂包括但不限于 Wnt 1 和 Wnt 3A、小分子 Wnt 模拟物以及肽适体(例如适体 262)。这样的实验还可用于研究 Wnt 拮抗剂。

15 Wnt 拮抗剂包括但不限于 Dkk1 和小分子 Dkk1 拮抗剂。同样, 可使用例如 TCF-荧光素酶报告基因构建物评价针对 Wnt 拮抗剂的基因活性和调节。TCF-荧光素酶报告基因可用于检测机械载荷自身对 Wnt 通路活性的作用。

20 例如, 可如上文先前所述平板接种 MC3T3 细胞, 并培养 3 天, 直至汇合。将培养基更换为含 BSA 的无血清培养基或含 α MEM 的低血清(1% FBS)培养基, 然后温育 24 小时。在载荷前 1 小时, 用一定剂量范围的 Wnt 激动剂(例如 GSK-3 抑制剂或 Dkk1 拮抗剂)预处理一组平板, 而相似的对照组不进行预处理。对于包含 Wnt1、Wnt3A 和 Dkk1 的实验, 用这些特异性 cDNA 构建物(或对照载体)瞬时转染的 293 细胞条件培养基可用作这些蛋白的来源。关于 Wnt1、Wnt3A 和 Dkk1 条件培养基的制备, 可如生产商所述使用 Lipofectamine 2000 (Invitrogen), 使用 10 μ g 质粒 DNA/100 mm 培养皿转染 293 细胞。293 细胞转染后 48 小时, 收集条件培养基(共 10 mL), 离心去除细胞碎片, 等量分装并冻存于-70 $^{\circ}$ C, 用于随后的 MC3T3 细胞 FlexerCell 实验。因此, 在用任意 Wnt 模拟物配体、小分子或其它 Wnt 通路调节物预处理 MC3T3 细胞后, 接着如本文所述对 MC3T3 骨细胞施加机

机械载荷。使用 Qiagen Rneasy 小型试剂盒或其它方法,在载荷后即时和在载荷后的几个时间点由载荷和未载荷对照样品中收集 RNA。在需要的时间点对载荷特征组基因进行实时 PCR,以观察处理情况下基因表达的变化。

- 5 对于包括检测 Wnt 通路活化的实验,可用例如 TCF-荧光素酶报告基因体系进行瞬时转染。更具体地说,如生产商所述,使用 TransFast 转染试剂(Promega, Madison WI),用约 2.5 μg 16x-TCF(TK)-荧光素酶和 0.5 μg TK-海肾-荧光素酶/孔转染 80%汇合的骨细胞。然后将预稀释的 DNA (在 1 mL 碱性 α MEM 中)与 8 μL TransFast 试剂混合,并温
- 10 育 30 分钟。此时,去除细胞的生长培养基,将 1 mL 碱性 α MEM 加入到每个孔中,并温育 30 分钟。在 30 分钟温育后,将培养基由细胞中吸出,然后向细胞中加入 TransFast/DNA 混合物,并于 37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 1 小时。对于一个样品组,加入含 0.25% BSA 的无血清培养基(2 mL)。在另一个组,加入 2 mL 生长培养基。然后过夜温育培养物,
- 15 去除培养基,并用 1 mL 含 BSA 的无血清 α MEM 替换。对细胞施加机械载荷,并温育 24 小时或其它合适的时间长度,用于随后的荧光素酶检测。用 300-500 μL 被动裂解缓冲液(Promega, Madison, WI)裂解细胞后,用双荧光素酶报告基因实验系统(Promega)检测荧光素酶活性。

20

7.4 免疫球蛋白

- 在另一方面,免疫球蛋白或单独或组合地用于治疗、诊断、筛选、联合治疗等。如果以蛋白阵列形式使用,则免疫球蛋白或其结合片段(例如 Fab)可用于结合至合适的基质,以筛选对骨载荷/压力、
- 25 骨载荷/压力的增大等起反应的蛋白。合适的免疫球蛋白是然后结合本文列出的对机械载荷或机械载荷增强起反应的蛋白或蛋白片段的免疫球蛋白。抗体包括单克隆抗体的商业生产商包括 Abcam、Bethyl Laboratories Inc.、BioSource International Inc.、Boston Biologicals Inc.、

Calbiochem-Novabiochem Corp.、ICN Biomedicals Inc.、MoBiTec、Oxford Biomedical Research、Promega Corp.、Research Diagnostics Inc.、Rockland Immunochemicals Inc.、Santa Cruz Biotechnology、Sigma-Aldrich、Sigma-RBI、Stratagene、United States Biological、Upstate
5 和 Zymed Laboratories Inc.。还已知有生产抗体的其它生产商，可以使用他们生产的抗体。

8. 联合治疗

还考虑了联合治疗，联合治疗可用于在需要其的患者中优化骨
10 矿化。这包括使用本文公开的物质和现有的疗法，例如激素替代疗法(HRT)、选择性雌激素受体调节物(SERMS)、降钙素、双膦酸盐、雷洛昔芬、降钙素和维生素 D 或以下讨论的任何试剂。还考虑将 Wnt 通路和骨谱基因的调节物与以下任何物质单独(例如 GSK-3 抑制剂和双膦酸盐)或组合(例如阿仑特罗、HRT 和 GSK-3 抑制剂)使用。这些
15 其它物质的量随患者变化，但很可能小于该药物作为单一物质使用时通常给予的量。

8.1 激素替代疗法

激素替代疗法(HRT)通常包括在具有完整子宫的绝经后妇女中使用
20 雌激素和黄体酮以及在实施过子宫切除术的妇女中仅使用雌激素。典型的雌激素及其替代剂量包括口服结合马雌激素(0.625 mg/天)、口服乙炔雌二醇(0.2 mg/天)和透皮雌二醇(0.05 mg/天，通常为每周两次，每次一片)。口服制剂最常用，但透皮雌激素替代疗法可能对吸烟个体更有效，因为她们口服雌激素的肝脏代谢增加。黄体酮
25 可周期性给予(作为甲羟孕酮, 10 mg/天, 每月 10-12 天)或连续给予(2.5 mg/天)。雌激素缺陷型妇女需要的剂量更大(例如 20 mg/天乙酸甲羟孕酮或 5 mg/天炔诺酮)。在和调节参与骨矿化的蛋白的试剂联用时，替代激素的量很可能较小。关于可利用的已批准药物剂型，参见以

下的表 6。

激素替代疗法以及维生素 D 和钙补充还用于患骨丢失的男性患者。在性腺机能减退的男性中，睾酮替代疗法已显示出增加骨质。因此，在一方面，这些物质与本文公开的调节骨矿化的试剂组合，
5 可共给予需要其的男性患者。

8.2 选择性雌激素受体调节物

选择性雌激素受体调节物(SERM)包括但不限于雷洛昔芬(Evista®)、他莫西芬、托瑞米芬、乙酸 bazedoxifene (1H-吡啶-5-醇, 1-
10 [[4-[2-(六氢-1H-氮杂庚因-1-基)乙氧基]苯基]甲基]-2-(4-羟基苯基)-3-
甲基-1-乙酸酯或 1-[对-[2-(六氢-1H-氮杂庚因-1-基)乙氧基]苄基]-2-
(对-羟基苯基)-3-甲基吡啶-5-醇-1-乙酸酯)、替勃龙及其药物可接受的盐。雷洛昔芬(一种非甾族苯并噻吩)是最常给予的 SERM，其它物质具有 FDA 批准使用的其它适应症。雷洛昔芬通常以 60 mg/天的剂量
15 给予。

8.3 降钙素

降钙素是一种具有抗再吸收特性的肽。生物活性形式含 32 个氨基酸，N-端二硫键位于残基 1 和 7 之间。鲑鱼降钙素是 FDA 批准的
20 降钙素形式，被批准作为雌激素的替代品，用于治疗但不预防骨质疏松。鲑鱼降钙素是最有效的，具有讽刺意义的是，人降钙素在可利用的降钙素中效力最低。

鲑鱼降钙素通常以 200 U/天鼻内给予，每天给予 1 次。但是，对于 Paget 病，鲑鱼降钙素以约 50 至约 100 IU 的剂量皮下或肌肉内给予，每周 3-7 次。人降钙素可以约 100 IU (0.5 mg)/天使用。鼻剂量比
25 较高，例如约 400 IU。对于骨质疏松，鲑鱼降钙素以 100 IU 速率通过注射给予，或以 200 IU 速率通过鼻内给予。至于其它的有关给予降钙素的信息，参阅 Zaidi et al., *Molecular and Clinical Pharmacology*

of *Calcitonin* 载于: PRINCIPLES OF BONE BIOLOGY 1423-40 (2nd ed., John P. Bilezikian et al., eds., 2002)。还设想将其它形式的降钙素用于联合药物治疗。

5 8.4 双膦酸盐

尽管双膦酸盐是有效的骨重建抑制剂, 但证明这些物质可防止骨丢失的原因迄今未知。双膦酸盐包括但不限于阿仑特罗、氯膦酸盐、EB-1053、依替膦酸盐、伊班膦酸盐、伊卡膦酸盐、米诺膦酸盐、奈立膦酸盐、奥帕膦酸盐、帕米膦酸盐、利塞膦酸盐、替鲁膦酸盐和唑来膦酸盐。双膦酸盐是特征为两个 C-P 键的化合物。当两个 C-P 键在同一个碳原子上时(即 P-C-P), 则它们是焦膦酸盐(即 P-O-P)的类似物。

在目前已批准用于治疗骨质疏松的双膦酸盐中, 阿仑特罗是研究最全面的。它是双膦酸盐或焦膦酸盐衍生物, 其对骨骼具有抗再吸收作用。对于骨质疏松预防, 阿仑特罗通常以约 5 mg/天的量给予, 对于骨质疏松治疗, 给予量为 10 mg/天, 而对于 Paget 病治疗, 给予量为 40 mg/天(参见以下的表 6)。阿仑特罗通常还与 HRT 共同给予(B. Dawson-Hughes, *Pharmacologic Treatment of Postmenopausal Osteoporosis* 载于: PRIMER ON THE METABOLIC BONE DISEASES AND DISORDERS OF MINERAL METABOLISM 283-288 (4th ed., Lippincott Williams & Wilkins, 1999)。关于双膦酸盐的其它信息, 参阅 H. Fleisch et al., *Bisphosphonates: Mechanisms of Action* 载于: PRINCIPLES OF BONE BIOLOGY 1361-85 (2nd ed., John P. Bilezikian et al., eds., 2002)和以下的表 6, 表 6 提供了目前可利用的双膦酸盐和剂量。

8.5 维生素 D 和维生素 D 类似物

目前只合成了代表维生素 D 活化主要通路的化合物用作药物。其包含维生素 D₃, 也称为 25-羟基维生素 D₃ 或 25-OH-D₃ (钙二醇

(calcidiol))和 $1\alpha,25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ (骨化三醇)。一个例外是 $24(\text{R}),25-(\text{OH})_2\text{D}_3$ (司骨化醇)。因此,也可以给予维生素 D 的天然前药和代谢物。维生素 D 的给予是年龄依赖性的。例如,维生素 D 的一般口服给予量是 200 IU 最高到 50 岁,400 IU 最高到 70 岁,70 岁以上为 600-800 IU。

5 关于维生素 D 及其类似物的其它信息,参阅 G. Jones, *Vitamin D and Analogs* 载于 PRINCIPLES OF BONE BIOLOGY 1407-22 (2nd ed. , John P. Bilezikian et al., eds., 2002)。关于其它的维生素 D 制剂,参见以下的表 6。

10 8.6 钙补充

还可以将 Wnt 通路调节物与以上的任何方法学和/或钙补充组合。可以以碳酸钙、柠檬酸钙、bionate 钙、葡萄糖酸钙、乳酸钙、磷酸钙和磷酸三钙的形式提供钙补充。常用的剂量包括但不限于表 6 提供的剂量或更小的剂量。

15

8.7 其它药物

一些其它药物已表现出它们可帮助预防骨丢失或增强骨矿化。黄体酮如替勃龙可用于治疗骨质疏松或其它骨丢失疾病。另一种替代物是抗雌激素他莫昔芬。他莫昔芬通常以约 20 至约 30 mg/天的剂量给予处于乳癌风险中的妇女。这些药物目前还没有被批准用于治疗骨矿化疾病。

20

其它的药剂如奥美拉唑、阿米洛利和 N-乙基马来酰亚胺,也已经表现出有效抑制骨吸收。阿米洛利和 N-乙基马来酰亚胺组合的抑制作用比它们单独给予时的抑制作用强得多。Matsuda, *J Osaka City Medical Ctr.* 41(2): 653-61 (1992)。

25

表 6

药物	在治疗骨和矿物质疾病中的用途	剂量(成人)
激素和类似物		
降钙素		0.25-0.5 mg 肌肉或皮下; 每 24 小时
人(Cibacalcin)	Paget 病	
鲑鱼 (Calcimar 、 Miacalcin)	Paget 病、骨质 疏松、高血钙	对于 Paget 病或骨质疏 松, 50-100 IU, 肌肉或皮 下, 每隔一天或每天; 对 于高血钙, 4-6 IU/kg 肌肉 或皮下, 每日四次
降钙素鼻喷雾剂	骨质疏松	每天 200 IU 鼻部
雌激素		
炔雌醇雌二醇	绝经后骨质疏松	每天 0.02-0.05 mg; 3/4 周
17 β 雌二醇(Estrace)		每天 0.5 mg
透皮贴剂(Estraderm)		0.05-0.1 mg 2x/周
结合马雌激素 (Premarin)		每天 0.625-1.25 mg 3/4 周
酯化雌激素(Estratab)		每天 0.3-1.25 mg
硫酸呋喃雌酮(Ortho- Est. 625)		每天 0.75 mg
结合马雌激素和乙酸 甲羟孕酮 (MPA) (Premphase)		在第 1-14 天每天 0.625 mg 雌激素, 在第 15-28 天每 天 0.625 mg 雌激素和 5 mg MPA
Prempro		每天 0.625 mg 雌激素和

2.5 或 5 mg MPA		
药物	在治疗骨和矿物质疾病中的用途	剂量(成人)
选择性雌激素受体调节物(SERM) 雷洛昔芬(Evista®)	绝经后骨质疏松 (预防)	每天 60 mg
糖皮质激素 泼尼松(Deltasone)	由于结节病、维生素 D 中毒和某些恶性肿瘤如多发性骨髓瘤和相关的淋巴增殖疾病引起的高血钙	每天 10-60 mg
甲状旁腺激素 人 1-34 (Parathor)	诊断假甲状旁腺机能减退	200 U; 在 10 分钟内输液
睾酮	男性性腺功能减退症	
环戊丙酸睾酮		每 2-3 周肌肉 200-300 mg
庚酸睾酮		每 2-3 周肌肉 200-300 mg
透皮贴剂		
Testoderm		每 24 小时 4-6 mg 阴囊片
Testoderm TTS		5-mg 身体片
Androderm		每 24 小时两片 2.5 mg 片
维生素 D 制剂		
维生素 D ₃	营养性维生素 D 缺乏、骨质疏松、吸收障碍、甲状旁腺功能减退、顽固性佝偻	400-1000 U; 以膳食补充

病		
药物	在治疗骨和矿物质疾病中的用途	剂量(成人)
维生素 D ₂ (Calciferol)		25,000-100,000 U; 3X/周至每天
骨化二醇或 25(OH)D ₃ (Calderol)	吸收障碍、肾性骨营养不良	20-50 µg; 3X/周至每天
骨化三醇或 1,25(OH) ₂ D ₃ (Rocaltrol)	肾性骨营养不良、甲状旁腺功能减退、顽固性佝偻病	0.25-1.0 µg; 每天至每日两次
(Calciject)		
二氢速甾醇(DHT)	肾性骨营养不良、甲状旁腺功能减退	0.2-1.0 mg; 每天
双膦酸盐		
依替膦酸盐	Paget 病、异位骨化、恶性肿瘤的高血钙	对于 Paget 病, 6/12 月内每天口服 5 mg/kg; 全髋置换前 1 个月至之后 3 个月每天 20 mg/kg; 对于异位骨化, 脊髓损伤后 3 个月内每天 10/20 mg/kg; 对于恶性肿瘤的高血钙, 每天以 250-500 mL 生理盐水溶液静脉内给予 7.5 mg/kg, 共 3 天; 对于骨质疏松预防, 每天 5 mg。
阿仑特罗(Fosamax)	骨质疏松预防和治疗、Paget 病	骨质疏松预防每天 5 mg; 骨质疏松治疗每天 10

mg; Paget 病每天 40 mg		
药物	在治疗骨和矿物质疾病中的用途	剂量(成人)
帕米膦酸盐(Aredia)	恶性肿瘤的高血钙、Paget 病	对于恶性肿瘤的高血钙, 以 24 小时内 60-90 mg 单剂静脉输液给予; 对于 30 或 60 mg 剂量, 4 小时输液也有效。对于 Paget 病, 连续 3 天在 4 小时内给予 30 mg 剂量, 共 90 mg
利塞膦酸盐(Actonal)	Paget 病	每天 30 mg, 两个月
替鲁膦酸盐(Skelid)	Paget 病	每天 400 mg, 三个月
矿物质		
碳酸氢钠	导致骨病的慢性代谢性酸中毒	必须对每个患者滴定
钙制剂	低血钙(如果有症状的话, 应静脉治疗)、骨质疏松、佝偻病、骨软化症、慢性肾衰竭、甲状旁腺功能减退、吸收障碍、肠源性草酸尿	
碳酸钙(40% Ca)		以分剂量每天口服 400-2000 mg 元素钙
柠檬酸钙(21% Ca)		
氯化钙(36% Ca)		

bionate 钙(6.5% Ca)		
药物	在治疗骨和矿物质疾病中的用途	剂量(成人)
葡萄糖酸钙(9% Ca)		在几小时内静脉给予 2-20 mL 10%葡萄糖酸钙
乳酸钙(13% Ca)		
磷酸氢钙(23% Ca)		
磷酸三钙(39% Ca)		
镁制剂		
氧化镁 (Mag-Ox, 低血镁 Uro-Mag) , 口服 (84.5, 241.3 Mg)		每天 240-480 mg 元素 Mg
磷酸盐制剂		
Neutra-Phos , 口服 (250 mg P、278 mg K、164 mg Na)	低磷酸盐血、维生素 D 抗性佝偻病、高血钙、高钙尿	以分开的剂量每天口服 1-3 g
Neutra-Phos-K, 口服 (250 mg P、556 mg K)		
Fleet Phospha-Soda 口服(815 mg P、760 mg Na 的 5 mL 溶液)		
In-Phos, 静脉(1 g P 的 40 mL 溶液)		6-8 小时内静脉给予 1.5 g
Hyper-Phos-K, 静脉 (1 g P 的 15 mL 溶液)		
利尿剂		
噻嗪类		

药物	在治疗骨和矿物质疾病中的用途	剂量(成人)
氯噻嗪、口服(25、50、100 mg) 氯噻酮，口服(25、50 mg)	高钙尿、肾石病	25-50 mg; 每天或每天两次
髓祥利尿剂		
呋塞米，口服(20、40、80 mg)，静脉(10 mg/mL)	高血钙; 如果有症状的话，使用静脉给予	根据需要每 6 小时一次口服 20-80 mg; 在几分钟内静脉给予 20-80 mg，根据需要重复给予
混杂		
光辉霉素或普卡霉素 光辉霉素，静脉(2.5 mg/瓶)	高血钙或恶性肿瘤	25 µg/kg 的 1 L D5W 或生理盐水溶液，在 4-6 小时内

5 以上试剂可与调节并优选活化 Wnt 通路(并由此增强骨重建)的化合物和组合物以任意组合方式组合。最常见的是，现有的治疗性化合物在与一种 Wnt 通路调节化合物一起给予时，其给予剂量低于现有的治疗性化合物单独给予时推荐的剂量。

9. 药用制剂

10 本发明的药用制剂包括单独的或组合的小化合物或免疫球蛋白。设想的组合为小化合物以及与现有疗法组合的小化合物和组合物。

9.1 小化合物制剂

当本发明的化合物用作药物时，其通常以药物组合物的形式给予。本发明的药用制剂包括小化合物组合以及小化合物与本文讨论的多肽(例如免疫球蛋白)或核酸的组合。

5 这些化合物和联合疗法可通过各种途径给予，包括口服、胃肠外、透皮、局部、直肠和鼻内。这些化合物和联合疗法作为注射和口服的组合物都是有效的。这样的组合物可以药学领域众所周知的方式制备，其包含至少一种活性化合物。

10 本发明还包括含一种或多种与药物可接受载体相结合的上述化合物作为活性成分的药物组合物。在制备本发明组合物时，活性成分通常与赋形剂混合、由赋形剂稀释或封装入载体中，载体可为胶囊、小药囊、纸或其它容器。使用的赋形剂通常为适于给予人类患者或其它哺乳动物的赋形剂。当赋形剂用作稀释剂时，其可为固体、半固体或液体材料，起活性成分的溶媒、载体或介质的作用。因此，
15 组合物的形式可为片剂、丸剂、散剂、锭剂、小药囊剂、扁囊剂、酏剂、悬浮剂、乳剂、溶液、糖浆、气雾剂(为固体或在液体介质中)、含例如最多 10%(重量)活性化合物的软膏、软和硬明胶胶囊、栓剂、无菌注射液和无菌包装的粉剂。

20 在制备制剂时，可能必须将活性化合物磨细，以提供合适的颗粒大小，然后和其它成分混合。如果活性化合物基本上不溶，则通常将其磨细为小于 200 目的颗粒大小。如果活性化合物基本上溶于水，则通常通过研磨调节颗粒大小，以在制剂中提供基本均一的分布，例如约 40 目。

25 合适赋形剂的一些实例包括乳糖、葡萄糖、蔗糖、山梨糖醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯树胶、磷酸钙、藻酸盐、黄芪胶、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、无菌水、糖浆和甲基纤维素。制剂可另外包括：润滑剂，例如滑石粉、硬脂酸镁和矿物油；湿润剂；乳化剂和悬浮剂；防腐剂，例如羟基苯甲酸甲酯和

羟基苯甲酸丙酯；甜味剂和调味剂。通过使用本领域已知的方法可对本发明的组合物进行配制，以在给予患者后提供快速、持续或延迟的活性成分释放。

5 在药物组合物中为本发明化合物的活性成分的量及其单位剂量可根据具体的应用、具体化合物的效力和需要的浓度大范围变化或调节。

组合物优选配制为单位剂型，每剂含约 5 至约 100 mg 活性成分，更通常含约 20 至约 30 mg 活性成分。术语“单位剂型”指物理上分离的单位，适合以单一剂量用于人患者和其它哺乳动物，每单位含
10 预定量的估计产生所需治疗效果的活性材料，其与合适的药用赋形剂组合。使用的上述本发明化合物优选不超过药物组合物的约 20%(重量)，更优选不超过药物组合物的约 15%(重量)，并以药学惰性载体相平衡。

15 活性化合物在广泛的剂量范围内是有效的，一般以药学或治疗有效量给予。但是，应当理解地是，实际给予的化合物的量由医师根据相关情况确定，包括治疗的病症、要治疗的细菌感染的严重性、选择的给予途径、给予的实际化合物、个体患者的年龄、体重和反应、患者症状的严重性等。

20 在治疗或对抗温血动物细菌感染的治疗应用中，化合物及其药物组合物以获得和维持浓度的量，即在进行治疗的动物中抗细菌有效的活性组分量或血液水平，口服、局部、透皮和/或胃肠外给予。一般来说，活性成分的这种抗细菌或治疗有效剂量(即有效剂量)在约 0.1 至约 100 mg/kg 体重/天的范围内，更优选为约 1.0 至约 50 mg/kg 体重/天。

25 为制备固体组合物如片剂，将主活性成分与药用赋形剂混合，以形成含本发明化合物的均质混合物的固体预制剂组合物。当谈到这些预制剂组合物为均质时，意思是活性成分均匀地分布在整個组合物中，使得组合物可容易地被再分为同等有效的单位剂型，例如

片剂、丸剂和胶囊。然后将此固体预制剂再分为以上描述类型的单位剂型，其包含例如 0.1 至约 500 mg 本发明的活性成分。

5 本发明的片剂或丸剂可包衣或复合，以提供具有延长作用优势的剂型。例如，片剂或丸剂可包含内部剂量组分和外部剂量组分，后者为覆盖前者的形式。两种组分可通过肠衣层分隔，肠衣层在胃部起抵抗分解的作用，并允许内部组分完整地通过十二指肠或延迟释放。有多种物质可用作这样的肠衣层或包衣，这样的物质包括多种高分子酸以及高分子酸与紫胶、鲸蜡醇和乙酸纤维素之类物质的混合物。

10 本发明新组合物可掺入其中以口服或注射给予的液体形式包括水溶液、适宜味道的糖浆、水或油性悬浮液和用食用油(例如玉米油、棉籽油、芝麻油、椰子油或花生油)的调味乳浊液，以及酞剂和类似的药用载体。

15 用于吸入或吹入的组合物包括在药物可接受的水性或有机溶剂或其混合物中的溶液和悬浮液，以及粉末。液体和固体组合物可含有合适的药物可接受的前述赋形剂。为起到局部或全身作用，组合物优选通过口服或鼻吸途径给予。在优选的药物可接受溶剂中的组合物可通过使用惰性气体喷雾。喷雾溶液可直接由喷雾装置吸入，或可将喷雾装置连接至面罩或间歇式正压呼吸机。溶液、悬浮液或
20 粉末组合物可由以合适方式传递制剂的装置给予，优选口服或鼻部给予。

以下的制剂实施例例举了代表性的本发明药物组合物。

制剂实施例 1

25 制备含以下成分的硬明胶胶囊：

<u>成分</u>	<u>量(mg/胶囊)</u>
活性成分	30.0
淀粉	305.0

硬脂酸镁 5.0

以上的成分混合，并以 340 mg 的量注入硬明胶胶囊中。

制剂实施例 2

5 使用以下成分制备片剂：

<u>成分</u>	<u>量(mg/片剂)</u>
-----------	-----------------

活性成分	25.0
------	------

微晶纤维素	200.0
-------	-------

胶体二氧化硅	10.0
--------	------

10 硬脂酸	5.0
--------	-----

将组分共混，压制成片剂形式，每片重 240 mg。

制剂实施例 3

制备含以下组分的干粉吸入制剂：

15 <u>成分</u>	<u>重量(%)</u>
--------------	--------------

活性成分	5
------	---

乳糖	95
----	----

将活性成分与乳糖混合，将混合物加入到干粉吸入装置中。

20 制剂实施例 4

如下制备每片含 30 mg 活性成分的片剂：

<u>成分</u>	<u>量(mg/片剂)</u>
-----------	-----------------

活性成分	30.0 mg
------	---------

淀粉	45.0 mg
----	---------

25 微晶纤维素	35.0 mg
----------	---------

聚乙烯吡咯烷酮

(为 10%的无菌水溶液)	4.0 mg
---------------	--------

羧甲基淀粉钠	4.5 mg
--------	--------

硬脂酸镁	0.5 mg
------	--------

滑石粉 1.0 mg

合计 120 mg

5 使活性成分、淀粉和纤维素通过 20 目美国筛，并彻底混合。将聚乙烯吡咯烷酮溶液与获得的粉末混合，然后通过 16 目美国筛。如此生产的颗粒于 50℃-60℃干燥，并通过 16 目美国筛。先前使羧甲基淀粉钠、硬脂酸镁和滑石粉通过 30 目美国筛，然后将其加入到颗粒中，混合后在压片机上对其进行压制，获得每片重 120 mg 的片剂。

制剂实施例 5

10 如下制备每粒含 40 mg 药物的胶囊：

<u>成分</u>	<u>量(mg/胶囊)</u>
-----------	-----------------

活性成分	40.0 mg
------	---------

淀粉	109.0 mg
----	----------

硬脂酸镁	<u>1.0 mg</u>
------	---------------

15 合计	150.0 mg
-------	----------

将活性成分、淀粉和硬脂酸镁共混，通过 20 目美国筛，并以 150 mg 的量填入硬明胶胶囊中。

制剂实施例 6

20 如下制备每粒含 25 mg 活性成分的栓剂：

<u>成分</u>	<u>量</u>
-----------	----------

活性成分	25 mg
------	-------

饱和脂肪酸甘油酯至	2,000 mg
-----------	----------

25 将活性成分通过 60 目美国筛，并悬浮在先前用最小必须热量溶解的饱和脂肪酸甘油酯中。然后将混合物注入标称 2.0 g 容量的栓剂模中，并使其冷却。

制剂实施例 7

如下制备每份含 50 mg 药物/5.0 mL 剂量的悬浮剂：

	<u>成分</u>	<u>量</u>
	活性成分	50.0 mg
	黄原胶	4.0 mg
	羧甲基纤维素钠(11%)	
5	微晶纤维素(89%)	50.0 mg
	蔗糖	1.75 g
	苯甲酸钠	10.0 mg
	调味剂和着色剂	适量
	纯化水至	5.0 mL
10	共混活性成分、蔗糖和黄原胶，通过 10 目美国筛，然后和预先制备的微晶纤维素和羧甲基纤维素钠水溶液混合。用一些水稀释苯甲酸钠、调味剂和着色剂，在搅拌的情况下加入。然后加入足量的水，获得需要的体积。	

15	<u>制剂实施例 8</u>	
	<u>成分</u>	<u>量(mg/胶囊)</u>
	活性成分	15.0 mg
	淀粉	407.0 mg
	硬脂酸镁	<u>3.0 mg</u>
20	合计	425.0 mg
	将活性成分、淀粉和硬脂酸镁共混，通过 20 目美国筛，并以 425.0mg 的量填入硬明胶胶囊中。	

	<u>制剂实施例 9</u>	
25	可如下制备皮下制剂：	
	<u>成分</u>	<u>量</u>
	活性成分	5.0 mg
	玉米油	1.0 mL

制剂实施例 10

可如下制备局部制剂：

	<u>成分</u>	<u>量</u>
	活性成分	1-10 g
5	乳化蜡	30 g
	液体石蜡	20 g
	白色软石蜡	至 100 g

加热白色软石蜡直至熔化。加入液体石蜡和乳化蜡，搅拌，直至溶解。加入活性成分，继续搅拌，直至分散。然后冷却混合物，直至成为固体。

制剂实施例 11

可如下制备静脉内制剂：

	<u>成分</u>	<u>量</u>
15	活性成分	250 mg
	等渗盐水	1000 mL

用于本发明方法的另一种优选制剂使用透皮传递装置(“贴片”)。这样的透皮贴片可用于提供以可控量连续或不连续输送的本发明化合物。用于传递药物的透皮贴片的构成和使用在本领域众所周知。参见例如美国专利 5,023,252，该专利通过引用结合到本文中。这种贴片可制作用于连续、脉动或以需要方式传递药物。

其它适用于本发明的制剂可见于 REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, Mace Publishing Company, Philadelphia, PA, 17th ed. (1985)。

如上所述，本文描述的化合物适用于以上描述的各种药物传递系统。另外，为了增强给予化合物的体内血清半衰期，可将化合物囊化、导入到脂质体腔中、制备成胶体，或者可使用其它提供延长的化合物血清半衰期的常规技术。有多种方法可用于制备脂质体，

如 Szoka, et al., 美国专利 No. 4,235, 871、4,501,728 和 4,837,028 所述, 这些专利每个都通过引用结合到本文中。

5 如上所述, 给予患者的化合物为上述药物组合物形式。这些组合物可通过常规灭菌技术灭菌, 或者可进行除菌过滤。获得的水溶液可包装起来原样使用, 或者冻干, 冻干制剂和无菌水性载体在给予前混合。化合物制剂的 pH 通常在 3-11 之间, 更优选在 5-9 之间, 最优选为 7-8。应当理解地是, 使用前述的某些赋形剂、载体或稳定剂可导致形成药物的盐。

10 一般来说, 以对于起相似作用的物质可接受的任何给予方式以治疗有效量给予本发明化合物。这种化合物的毒性和治疗效果可通过标准药理学方法在细胞培养物或实验动物中确定, 例如测定 LD₅₀ (使群体的 50%致死的剂量)和 ED₅₀ (对群体的 50%治疗有效的剂量)。毒性和治疗作用之间的剂量比率是治疗指数, 其可表示为 LD₅₀/ED₅₀ 比率。优选具有大治疗指数的化合物。

15 由细胞培养物实验和动物研究获得的数据可用于制定人中使用剂量范围。这种化合物的剂量优选处于计算浓度范围内, 计算浓度包括基本没有或没有毒性的 ED₅₀。剂量可在该范围内变化, 这取决于使用的剂量和采用的给予途径。对于在本发明方法中使用的任何化合物, 可首先由细胞培养物实验估计治疗有效剂量。剂量可在动物模型中制定, 以获得包括在细胞培养物中确定的 IC₅₀ (测试化合物的浓度达到了对症状的一半最大抑制)的循环血浆浓度范围。这种信息可用于更精确地确定人中的有用剂量。血浆水平可通过例如高效液相层析检测。

25 9.2 免疫球蛋白制剂

本发明的一方面设想使用免疫球蛋白, 其识别并结合参与骨矿化的蛋白, 例如本文讨论的任何蛋白。免疫球蛋白优选调节成骨细胞-破骨细胞稳态, 使得骨矿化增强。在某些疾病中, 优选降低骨矿

化的化合物和组合物。

优选的免疫球蛋白是抗体及其片段。优选的抗体是单克隆抗体，但是也考虑了使用多克隆抗体的实施方案。优选的单克隆抗体包括人、人源化和灵长类动物源化TM单克隆抗体。

5 术语“药学或药理学可接受的”是指当合适地给予动物或人时，不产生副反应、变态反应或其它不适当反应的分子实体和组合物。兽用同样包括在本文中，而“药物可接受的制剂”包括临床和/或兽用都可使用的制剂。例如，可将组合物给予某些农业动物，例如家禽，以增加骨矿化，从而防止骨裂和骨折。

10 本文使用的“药物可接受的载体”包括任何和全部溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。这些介质和物质用于药学活性物质的用途在本领域众所周知。除去与活性成分不相容的任何常规介质或物质之外，还设想了其在治疗组合物中的用途。为给予人，制剂应当满足 FDA 生物标准办公室要求的
15 无菌、致热原、一般安全性和纯度标准。辅助活性成分也可以掺入到组合物中。

“单位剂量”剂型是含有一定剂量或亚剂量给予成分的剂型，其适于具体定时传递。例如，代表性的“单位剂量”剂型含每日剂量或单位，或每日亚剂量或每周剂量或单位，或每周亚剂量等。

20 例如，人源化抗体可用作药物组合物中的活性成分，以治疗骨矿化疾病。药物组合物更可能被配制成静脉内、肌内的形式或可局部给予的其它形式。组合物可包含通常用于药用制剂的无活性成分，例如稀释剂、填充剂、崩解剂、甜味剂、润滑剂和调味剂。药物组合物优选被配制成通过快速浓射或持续滴入静脉内给予，或者由可
25 植入胶囊释放。典型的静脉内给予制剂利用生理盐水作为稀释剂。

还设想使用调节骨矿化的免疫球蛋白片段。优选的片段是得自单克隆抗体的片段或重组合成的片段。这些抗体片段的制剂在本领域被认为是已知的。

用于患者的免疫球蛋白组合物的剂量取决于使用的具体抗体、体重、年龄、性别、健康状况、饮食、给予时间和组合物剂型、给予途径和要治疗的疾病。典型剂量是 0.1 mg/kg/天至 100 mg/kg/天。更典型的剂量是 1 mg/kg/天至 50 mg/kg/天。

5

9.2.1 诊断性免疫球蛋白

本发明抗体还可用于诊断实验。用于本发明诊断实验的一种优选形式是定量样品中在细胞表面上表达与骨矿化相关的任何蛋白的细胞。计数携带特定表面标记的细胞的方法在本领域众所周知。例如，可使用荧光激活细胞分选法(FACS)。本发明诊断实验的另一种形式是定量样品中目的骨矿化蛋白的量。本领域已知有许多进行这类实验的形式，例如抗原固定化或夹心形式的酶联免疫吸附实验。

10

9.2.2 可注射剂型

识别并结合参与骨矿化的蛋白的抗体、免疫球蛋白或免疫缀合物最常被配制为胃肠外给予，例如配制为通过静脉(i.v.)、肌肉(i.m.)、皮下(s.c.)、透皮或其它这种途径注射，包括蠕动(peristaltic)给予和直接滴注到部位(即给予长骨区域)。本领域技术人员根据本说明书公开内容知道如何制备含这种免疫球蛋白作为活性成分的水性组合物。通常，这种组合物可制备成可注射的液体溶液或悬浮液；还可以制备固体形式，其适用于在注射前加入液体而制备溶液或悬浮液；还可以乳化制备物。

15

20

25

适于注射用途的药用剂型包括无菌水溶液或分散液；包含芝麻油、花生油或水性丙二醇的制剂；和用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉剂。在所有情况下，制剂应当是无菌的，其流动性能达到注射的程度。其在生产和储存条件下应当是稳定的，应当被保藏得可抵抗微生物(例如细菌和真菌)的污染作用。

识别并结合参与骨矿化的蛋白的免疫球蛋白可被配制为中性或

盐形式的无菌水性组合物。可在与表面活性剂(例如羟丙基纤维素)适当混合的水中制备为游离碱或药物可接受盐的溶液。药物可接受盐包括酸加成盐(与蛋白的游离氨基形成), 以及和无机酸(例如为盐酸或磷酸)或有机酸(例如乙酸、三氟乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等)形成的酸加成盐。与游离羧基形成的盐还可以由无机碱(例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁)或有机碱(例如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等)获得。

适用于免疫球蛋白的载体包括溶剂和分散介质, 其含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其合适的混合物以及植物油。在许多情况下, 其优选包含等渗剂, 例如糖或氯化钠。可保持适当的流动性, 例如通过使用包衣如卵磷脂、维持需要的颗粒大小(在分散剂的情况下)和/或使用表面活性剂。

在普通储存和使用条件下, 所有这种制剂都应含有防腐剂, 以防止微生物生长。可通过各种抗细菌剂和抗真菌剂, 例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等, 防止微生物生长。可通过在组合物中使用延迟吸收的物质(例如一硬脂酸铝和明胶), 延长可注射组合物的吸收。

通过将需要量的活性物质连同以上列举的各种其它成分(如果需要的话)混合到合适的溶剂中, 然后除菌过滤, 制备无菌可注射溶液。一般来说, 通过将各种无菌活性成分掺入到含基本分散介质和以上讨论的其它需要成分的无菌载体中, 制备分散剂。

对于用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末, 优选的制备方法是真空干燥和冻干技术, 由先前过滤除菌溶液产生活性成分粉末加上任何其它所需的成分。

9.2.3 缓释制剂

识别、结合蛋白并由此调节骨矿化的免疫球蛋白的制剂易于以各种剂型给予, 例如上述的可注射溶液形式, 但也考虑了其它的药

物可接受形式，例如片剂、丸剂、胶囊或其它用于口服给予的固体、栓剂、阴道栓、鼻溶液或喷雾剂、气溶胶、吸入剂、局部制剂、脂质体形式等。给予的剂型与要治疗的疾病或病症应匹配。

5 可以使用药学“缓释”胶囊或“缓释”组合物或制剂，并且其一般都适用。缓释制剂一般设计用来在延长时间内产生稳定的药物水平。缓释制剂通常植入病灶附近，例如在长骨中。

10 缓释制剂的合适实例包括固体疏水聚合物的半透性基质，其含有抗体或免疫缀合物，其中基质为成形物品形式，例如薄膜或微胶囊。缓释基质的实例包括聚酯；水凝胶，例如聚(甲基丙烯酸 2-羟乙酯)或聚乙烯醇；聚交酯；L-谷氨酸和 L-谷氨酸- γ -乙酯的共聚物；不可降解的乙烯-乙酸乙烯酯；可降解的乳酸-乙醇酸共聚物，例如 Lupron Depot™(由乳酸-乙醇酸共聚物和乙酸亮丙瑞林组成的可注射微球体)；以及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

15 尽管聚合物如乙烯-乙酸乙烯酯和乳酸-乙醇酸能够释放分子超过 100 天，但某些水凝胶释放蛋白的时间长度较短。当囊化抗体长时间保留在体内时，它们可由于接触 37℃ 的湿气而变性或聚集，因此降低了生物活性和/或改变了免疫原性。可利用的合理策略是根据涉及的机制稳定化。例如，如果聚集机制包括通过巯基-二硫化物互换形成分子间 S-S 键，则通过修饰巯基残基、由酸性溶液冻干、控制含水量、使用合适的添加剂、开发特异性聚合基质组合物等实现稳定化。
20 含所需免疫球蛋白的组合物还可配制成脂质体或纳米颗粒。

实施例

实施例 1

25 使用 GSK 抑制剂的 TCF-荧光素酶实验

某些 GSK 抑制剂是已知的。锂通常以氯化锂(LiCl)的形式给予，其特异性低，仅在高毫摩尔剂量时可抑制 GSK-3 (Stambolic *et al.*, *Curr. Biol.* 6:1664-68 (1996))。选择性更强的 GSK 抑制剂 3-(3-Cl-4-羟基苯

基氨基)-4-(2-硝基苯基)-1H-吡咯-2,5-二酮对 GSK-3 的 β 同工型更具选择性。该化合物、其衍生物、同系物和类似物可用于标定实验，以鉴别生骨分子。例如，GSK-3 抑制剂可用于标定基于骨细胞和非骨细胞的 TCF 实验，以鉴别 LRP5/6 激动剂、Wnt 激动剂、LRP5/6-Dkk1 拮抗剂和其它含报告基因的干扰通路特异性顺式/反式元件。这些化合物还可用于研究生骨基因活性，关于成骨细胞/破骨细胞功能、增殖、分化和凋亡的次级实验；有或没有应变或机械载荷的体外或体内成骨细胞基因谱分析实验；使用颅盖模型的体内局部作用实验；活体外颅盖或其它骨源的骨代谢实验；使用例如幼龄大鼠模型的系统作用评价实验；或体内废用/卵巢切除型实验也可以使用这些化合物。

TCF 报告基因实验包括含 16 个拷贝(即 16X) Wnt- β -联蛋白信号反应型 TCF 元件的 TCF 报告基因、基本 TK-启动子和荧光素酶基因。在 Dulbecco 最低必须培养基(DMEM, Invitrogen)或补加 10%热失活 FBS、1% GlutaMAX (Invitrogen)和 1%青霉素-链霉素(Invitrogen)的 RPMI (Invitrogen)中培养人胚肾(HEK)-293A 细胞(ATCC)或其它骨肉瘤衍生的骨细胞系(例如 U2OS)。平板接种 HEK-293A 细胞(约 40,000 细胞/孔)或 U2OS 细胞(25,000 细胞/孔)。温育 24 小时后(即直至 80-90% 汇合)，将培养基更换为 100 μ L 新鲜无血清 OPTIM (Gibco/BRL)或 RPMI 或 DMEM 培养基。如生产商所述，使用 Lipofectamine 2000 转染试剂(Promega, Madison, WI)，用 16X-TCF (TK)-萤火虫荧光素酶(0.3 μ g/孔)和 TK-海肾-荧光素酶(0.06 μ g/孔)转染两种细胞类型。然后于室温温育 DNA 混合物和试剂 20 分钟。将 50 μ L/孔的 DNA-试剂混合物加入到每孔 100 μ L OPTIM 中，并于 37 $^{\circ}$ C 温育 4 小时。用 140 μ L 新鲜 DMEM 或 RPMI 培养基分别替换 293A 或 U2OS 细胞的转染培养基。将 GSK 抑制剂(3-(3-Cl-4-羟基苯基氨基)-4-(2-硝基苯基)-1H-吡咯-2,5-二酮)稀释在相应的培养基中，得到每孔最终量 150 μ L 的 10X 母液。每孔加入 10 μ L 的 10X 母液以及适当稀释的溶媒(即 DMSO)对照。

在 CO₂ 培养箱中于 37℃ 温育 20-24 小时后，去除含化合物的培养基。通过加入 150 μL 的 1X Dual Luci Reagent 裂解缓冲液(Promega Corp., Madison, WI)裂解转染并 GSK-3 抑制剂处理的细胞单层。10 分钟后，将 20 μL 裂解物转移至 96 孔白板(Packard/Costar)中。将细胞裂解物与 100 μL/孔的 LARII 缓冲液(Dual Luci Reagent)混合，检测相对荧光素酶单位(RLU)。然后加入 100 μL/孔的“stop & glo”试剂(Dual Luci Reagent)，并检测内部对照海肾荧光素酶。计算 TCF-萤火虫-荧光素酶对海肾的比率，并示于图 1-2。

图 1A 和 1B 表明，当将 TCF-报告基因构建物转染入 HEK-293A 和 U2OS 骨细胞时，iGSK-3 可以剂量依赖方式反式激活报告基因。TCF-荧光素酶信号的诱导以及由此产生的 Wnt-信号在 U2OS 骨细胞中比在 HEK-293 细胞中更显著。另外，图 1B 显示，在 U2OS 细胞中，10 μM 浓度的 iGSK-3 观察到 TCF-信号显著诱导，30 μM 时几乎达到最大，与 293A 细胞不同。这表明 U2OS 骨细胞对 Wnt 信号调节比 HEK-293A 细胞更敏感。

实施例 2

GSK 抑制剂在 U2OS 人成骨细胞中解除

Dkk1 介导的 TCF 信号转导抑制

该实施例表明，GSK 抑制剂(3-(3-Cl-4-羟基苯基氨基)-4-(2-硝基苯基)-1H-吡咯-2,5-二酮)可用于解除 U2OS 细胞中 Dkk1 介导的 TCF 信号转导抑制。如图 2 所示，Wnt1 和 Wnt3A 以对照的约 10-15 倍活化 TCF-信号。加入 Dkk1 抑制 Wnt 介导的 TCF 信号转导。但是，GSK-3 抑制剂可逆转该抑制。而且，这些数据表明，iGSK-3 可用作小分子工具来检验和标定基于另一种细胞的 TCF-实验，该实验用于鉴别可在 Wnt 配体(例如 Wnt 3A)存在下封闭 Dkk1 和 LRP5 相互作用的化合物。最终的读数是 Dkk1 介导的 TCF-信号抑制的活化。在没有已知可封闭 Dkk1-LRP5 相互作用并接着活化 TCF-信号的小分子的情况

下, iGSK-3 显示活化 TCF-信号。这表明即使在内部调节通路, 人们也可以解除 Dkk1 通过 LRP5 在外部表现出的抑制。图 2 列出的实验包括 U2OS (ATCC)骨细胞, 并基于 LRP5/6 受体的内源表达。将细胞以 25,000 细胞/孔平板接种, 然后温育 24 小时(即直至 80-90%汇合)。

5 将培养基更换为 100 μ L 新鲜无血清 OPTIM (Gibco/BRL)或 RPMI 培养基。如生产商所述, 使用 Lipofectamine 2000 转染试剂(Promega, Madison, WI), 用 16X-TCF (TK)-萤火虫荧光素酶(0.3 μ g/孔)、TK-海肾-荧光素酶(0.06 μ g/孔)、Wnt1 或 Wnt3a (0.0025 μ g/孔)和 Dkk1 (0.1 μ g/孔)共转染细胞。然后于室温温育 DNA 混合物和试剂 20 分钟。将

10 50 μ L/孔的 DNA-试剂混合物加入到每孔 100 μ L OPTIM 中, 并于 37 $^{\circ}$ C 温育 4 小时。用 140 μ L 新鲜 RPMI 培养基替换转染培养基。将 GSK-3 抑制剂稀释在 RPMI 培养基中, 得到每孔 150 μ L、终浓度 30 μ M 的 15X 母液。每孔加入 10 μ L 的 15X 母液以及适当稀释的溶媒(即 DMSO)对照。在 CO₂ 培养箱中于 37 $^{\circ}$ C 温育 20-24 小时后, 去除含化合物的

15 培养基。通过加入 150 μ L 的 1X Dual Luci Reagent 裂解缓冲液(Promega Corp., Madison, WI)裂解转染且 GSK-3 抑制剂处理的细胞单层。10 分钟后, 将 20 μ L 裂解物转移至 96 孔白板(Packard/Costar)中。将细胞裂解物与 100 μ L/孔的 LARII 缓冲液(Dual Luci Reagent)混合, 检测相对荧光素酶单位(RLU)。然后加入 100 μ L/孔的“stop & glo”试剂(Dual

20 Luci Reagent), 并检测内部对照海肾荧光素酶。计算 TCF-萤火虫-荧光素酶对海肾的比率, 并示于图 2。

结果表明, 用 Wnt1 或 Wnt 3A 分别使 TCF 信号比基础水平增加约 10-15 倍。当用 Dkk1 与 Wnt1 或 Wnt 3A 共转染时, TCF 活性几乎完全被抑制。但是, 当将 iGSK-3 加入到 Wnt1/Wnt 3A 和 Dkk1 转

25 染的细胞中时, 对于 Wnt1 抑制几乎完全被解除, 而对于 Wnt 3A 抑制被解除约 75%。即便该实验基于 LRP5/6 受体的内源表达, 但这种实验可通过过量表达转染的 LRP5/6 或利用特异性 siRNA 抑制内源 LRP5/6 再设计, 以表现出分子和 LRP5/6 的特异性相互作用。

实施例 3

糖原合酶激酶-3 (GSK-3)抑制剂在小鼠颅盖模型中对骨生成的作用

为确定在体内通过 GSK-3 抑制活化 Wnt 通路是否诱导骨生成，
5 研究局部给予 GSK-3 抑制剂(iGSK-3)(即 3-(3-Cl-4-羟基苯基氨基)-4-(2-硝基苯基)-1H-吡咯-2,5-二酮)对小鼠颅盖的作用。

每天对 4 周龄雄性 Swiss-Webster 小鼠的颅盖右侧皮下注射 1 mg/kg 的 iGSK-3 或单独的载体，持续 7 天和 18 天。通过利用碱性磷酸酶(ALPase)组织化学染色的组织学切片、定量组织形态测量学和利
10 用免疫组织化学的 β -联蛋白表达，评价 iGSK-3 对颅盖骨的作用。在利用 CO₂ 麻醉处死后，完整地取出颅盖，轻轻地分离软组织，将骨固定在 70%乙醇中达 24 小时，以进一步加工和分析。然后将颅盖垂直于矢状缝、与人字缝和冠状缝平行地通过头顶骨中央部分切成两半。颅盖的前部用于石蜡切片，而颅盖的后部用于冰冻切片。切下 4-5
15 片 5 μ m 厚的代表性非连续步骤的切片。石蜡切片用苏木精和曙红(H&E)常规染色，以检测颅盖厚度。冰冻切片用于碱性磷酸酶检测。为便于组织形态测量学检测，使用每块骨外侧缘由矢状缝边缘至肌肉附着点的 2 mm 标准长度的各个切片。所有检测都使用 R&M Biometrics Inc. Bioquant Image Analysis System 进行。

20 固定后，用 Surgipath Decalcifier II (Richmond, IL)对颅盖前部脱钙 7-8 小时，然后用分级醇脱水。切下 4-5 片 5 μ m 厚的代表性非连续冠状步骤石蜡切片。使用小鼠单克隆抗体检测组织切片中的非磷酸化 β -联蛋白，其中小鼠单克隆抗体由 Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY)使用合成肽 CGGSYLDSGIHSGATTTAPSLSGK 作为免疫
25 原生产。该单克隆抗体识别非磷酸化形式的 β -联蛋白(目录号 06-734, Upstate Biotech)。使用连接抗生物素蛋白的 AP 系统(Vector Laboratories, Burlingame, CA)目测(1 μ g/ml)抗体与表位的结合。对照包含没有第一抗体的样品和抗生物素蛋白-AP。

对于 70%乙醇固定后的小鼠顶骨 6 μm 冷冻切片,使用 Vector Red 碱性磷酸酶底物试剂盒(Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA)进行组织化学染色,以此评价碱性磷酸酶(ALPase)活性。

5 实验(图 3-4)表明,注射 18 天 GSK-3 抑制剂的右半颅盖的颅盖厚度比同一小鼠的未注射的左半颅盖有统计学意义的增加(11.8%, $p<0.005$)。但是,当与仅用载体对照(载体为含 2% Tween 80 和 0.5% 甲基纤维素的 50% DMSO)处理的小鼠对比 GSK3 抑制剂对颅盖厚度的作用时,颅盖厚度仅有 6%非统计学意义的增加(图 5)。重要之处在于,当将 GSK-3 抑制剂溶解在含 10% DMSO (含 2% Tween 80 和
10 0.5%甲基纤维素)的不同载体中并每天以 1 mg/kg/天皮下注射 7 天时,与载体对照处理的颅盖相比,颅盖厚度有统计学显著的 10%增加(图 6)。

为在机制上确定 GSK3 抑制剂如何激发其合成代谢作用,对碱性磷酸酶、成骨细胞分化 and 功能标记进行组织化学染色。与载体对照相比,在局部给予 GSK-3 抑制剂 7 天的颅盖的成骨细胞中观察到
15 碱性磷酸酶显著增加(图 7)。注射 GSK-3 抑制剂的颅盖的免疫组织化学(IHC)揭示, β -联蛋白在覆盖骨外膜的前成骨细胞和成骨细胞中强烈表达(图 7)。总之,这些结果表明,通过局部注射 iGSK 抑制 GSK-3 具有骨合成代谢作用,该作用与导致成骨细胞活性诱导的 β -联蛋白
20 水平增加有关。

实施例 4

成骨细胞中的 Flexercell[®]载荷和基因表达

Flexercell[®]实验可使用以下的成骨细胞系: U2OS (ATCC)、MG-
25 63 (ATCC)、SAOS-2 (ATCC)、HOS-TE85 (ATCC)、HOB03CE6 (Wyeth)、HOB01C1 前骨细胞(Wyeth)和人初级成骨细胞。该实验还可使用 MC3T3 细胞(ATCC)和小鼠初级成骨细胞。另外,同样也可使用例如 UMR-106 (ATCC)、ROS17/2.8 和大鼠初级成骨细胞的大鼠

细胞系。可使用的其它哺乳动物细胞系对一般技术人员来说是显而易见的。

在该实验中, 对小鼠成骨细胞 MC3T3 细胞进行体外细胞载荷和基因分析。使用本文讨论的 Flexercell®系统对 MC3T3 细胞施加机械应变(5 小时), 结果表明, 与未载荷对照相比, 载荷后立即诱导 COX-2 (2.5 倍)、eNOS (2.5 倍)、连接蛋白 43 (3.5 倍)、Jun (3.5 倍)、细胞周期蛋白 D1 (3.5 倍)、Wnt 10B (3 倍)、SFRP1 (3 倍)、c-Fos (3.5 倍)和卷曲蛋白 2 (3 倍)(图 8)。给予载荷后对 WISP2 基因表达的诱导最小。

对于这些实验, 在补加 10%热失活 FBS、1% GlutaMAX (Invitrogen) 和 1%青霉素-链霉素 (Invitrogen) 的 α 最低必须培养基 (α MEM) (Invitrogen) 中培养小鼠 MC3T3 成骨细胞。将 MC3T3 细胞以 80,000-100,000 细胞/孔平板接种在胶原 I 型包被的 Bioflex 6 孔平板(Flexcell International Corp., McKeesport, PA)中, 然后培养 3-4 天或直至汇合。在载荷前 24 小时, 用 2 mL 新鲜生长培养基或含 α MEM、0.25% BSA (Serologicals Proteins Inc., Kankakee, IL)、所示 GlutaMAX 和青霉素/链霉素的无血清培养基替换培养基。对于在无血清培养基中预处理的样品, 用 2 mL 基础 α MEM 培养基各清洗细胞两次, 然后加入含 BSA 的培养基。就在机械载荷之前, 去除培养基(即用基础 α MEM 培养基清洗含生长培养基的样品两次), 并向每孔中加入 1 mL 有或没有化合物(即 GSK-3 β 抑制剂 3-(3-Cl-4-羟基苯基氨基)-4-(2-硝基苯基)-1H-吡咯-2,5-二酮)的 α MEM/BSA。然后使用 FX-3000 Flexercell®应变装置(Flexcell International Corp)对细胞施加等于 3,400 $\mu\epsilon$ (2 Hz, 7200 循环/小时)的机械扭曲达 5 小时。然后在载荷后即时或载荷后 24 小时收集(使用 Qiagen Rneasy 小型试剂盒)机械应变样品以及非应变对照的 RNA。在利用 FlexerCell 的实施例中显示的所有数据都得自载荷后即时收获的 RNA。尽管 Wnt/ β -联蛋白靶基因表达的调节程度仅中等变化, 但在载荷后 24 小时收集 RNA 时受载荷调节的基因也一样(未列出数据)。

然后使用以上描述的小鼠基因特异性引物和探针对指定的基因进行实时 PCR。使用的引物和探针列于表 13。

实施例 5

5 通过先活化 Wnt 通路增强骨载荷

基于实施例 4 所观察到的基因表达结果, 下一步是观察先活化 Wnt 通路是否增强骨载荷反应。在此, 用糖原合酶激酶-3 抑制剂(即 3-(3-Cl-4-羟基苯基氨基)-4-(2-硝基苯基)-1H-吡咯-2,5-二酮)处理 MC3T3 细胞, 以增强 β -联蛋白核转运, 并由此活化经典 Wnt/ β -联蛋白通路。在给予 GSK-3 抑制剂后立即使细胞承受载荷(如以上实施例 4 描述的 3,400 μg , 2 Hz, 72000 循环/小时) 5 小时。GSK-3 抑制剂(5 μM) 对连接蛋白 43、细胞周期蛋白 D1、Wnt 10B、SFRP1、FZD2、WISP2、COX-2、eNOS、FOS 和 JUN 产生协同诱导, 其高于在不给予抑制剂的细胞中达到的载荷反应基因表达(图 9)。而且, 我们证明, 载荷存在下这些 Wnt/ β -联蛋白靶基因的协同诱导对 iGSK-3 浓度是剂量依赖性的(参见图 10 和表 4)。

基于这些数据, 应用活化 Wnt 通路的物质可增强骨载荷刺激作用下产生的基因表达反应。骨载荷刺激的这种增强作用可用于鉴别具有相似增强特性的其它物质, 以及鉴别可用于预防骨丢失或治疗骨丢失疾病的物质。

实施例 6

在体内机械载荷作用下活化骨中 β -联蛋白介导的信号转导通路

骨质的增加和降低都与 Wnt 共受体低密度脂蛋白受体相关蛋白 (LRP) 5 的突变有关。在使用胫骨 4 点(4-pt.)弯曲系统对 LRP5 G171V 转基因小鼠及其非转基因同窝小鼠的胫骨施加机械载荷后, 观察到骨细胞信号转导通路的几种重要组分的基因表达模式有显著变化(表 2)。 β -联蛋白介导的基因转录与成骨细胞活性增加有关, 其在载荷后

的非转基因和 LRP5 G171V 转基因小鼠中都被上调,但在 LRP5 G171V 转基因(也称为 HBM 转基因)小鼠中观察到的上调更大。还观察到 LRP5 G171V 突变抑制 RANKL/OPG 信号转导,该信号转导削弱成骨细胞的募集和功能。结果表明, HBM 突变(G171V)反向影响骨中的分解代谢活性,由此增强骨生长。

用例如用于啮齿动物胫骨的 4 点弯曲系统的装置对骨施加循环机械载荷,刺激荷重训练的作用,并增加骨膜成骨细胞的增殖、分化和活性(Tanner et al., *J. Bone Miner. Res.* 16: S203 (2001); Boppart et al., *Bone* 23 (5): 409-415 (1998); Raab-Cullen et al., *Calcif Tissue Int.* 55: 473-78 (1994); Cullen et al., *J Appl. Physiol.* 88: 1943-48 (2002))。尽管 4 点弯曲刺激几种生长因子的基因表达,但几乎不了解控制机械信号转变为生物化学反应的准确分子事件,该转变在活化骨重建过程中达到最高。

低密度脂蛋白受体相关蛋白(LRP)是一个参与各种生物过程的细胞表面受体家族。LRP5 和 6 是这些家族的两个成员,它们是公认的 Wnt 共受体,帮助将信号由 β -联蛋白转导至 TCF/LEF 活化的启动子。骨质降低与 LRP5 基因突变失活有关。LRP5 敲除小鼠显示成骨细胞增殖和功能下降,造成低骨矿物质密度,尽管 Runx2/CBFA1 正常表达。另一方面,骨质增加与该基因的其它突变有关。在 LRP5 基因中的一种具体点突变是甘氨酸 171 突变为缬氨酸(G171V),该突变在两个独立的人类家族的所有受影响成员中都产生高骨质表型(即 HBM)。表达人 LRP5 G171V 基因的转基因小鼠(LRP5 G171V TG)忠实地复制了高骨质表型。因此,成骨细胞生物学、增殖和分化似乎与 LRP5/Wnt 介导的信号转导有关。

以下的数据表明,在载荷后,LRP5 G171V 转基因(TG)小鼠比非-TG 小鼠表现出更强的骨形成和压力活化反应。而且,在载荷后, β -联蛋白介导的基因转录在非转基因(非-TG)和 LRP5 G171V TG (HBM TG)小鼠中都被诱导。HBM TG 小鼠经 β -联蛋白信号转导途径(甚至

在没有载荷时)基因型依赖性地增强信号转导,该小鼠通过进一步上调 β -联蛋白介导的基因转录对载荷起反应。本文还证明 LRP5 中的 HBM 突变(即 G171V)下调参与破骨细胞增殖和活性的基因。我们还讨论了迄今未明的 LRP5 中 G171V 突变的作用,其下调参与破骨细胞增殖和活性的关键基因的表达,由此抑制骨吸收。

对于涉及小鼠骨体内载荷的实验,使用描述于 Babij et. al., *J. Bone Mineral Res.* 18(6): 960-974 (2003)的杂合 TIC-LRP5 G171V 小鼠。这些动物在总体骨密度方面表现出统计学显著的增加(30-55%)。用小鼠 4 点弯曲装置(Akhter et al., *Calcif. Tissue Int.* 63(5): 442-9 (1998)将机械载荷传递至右胫骨。特征鉴定并标定该装置,以精确的在体内施加外部力。出处同上; Pedersen et al., *Calcif. Tissue Int.* 65(1):41-6 (1999); Akhter et al., *J Clin. Densitom.* 5(2):207-16 (2002)。该装置通过 4 个圆垫施加力,该圆垫由轻木构成,覆盖有 1 mm 厚的外科用橡皮管。上部的垫相隔 4.5 mm,并处于下部垫的中央,下部垫相隔 12 mm,在中侧方向产生弯曲。在负载过程中,用异氟烷麻醉动物,以允许进行正确地腿部定位。

在这些实验中,左腿用作未载荷对照,来证明尺寸差异是缘于突变。右胫骨以 4 点弯曲载荷 5 天。在第 5 天和第 12 天注射钙荧光素,第 15 天收集组织。雌性载荷 6 牛顿(N)(即非-TG $2,231 \pm 110 \mu\epsilon$; HBM TG $1,525 \pm 81 \mu\epsilon$),而雄性为 7 N(即非-TG $2,740 \pm 157 \mu\epsilon$; HBM TG $1,841 \pm 131 \mu\epsilon$)。由 LRP5 G171V TG 和非-TG 小鼠的载荷区获得胫骨的横截面。使用荧光显微镜测定骨中产生的两个钙荧光素前端的距离,计算矿化沉积率(MAR)。提取出单标记表面(SLS)、双标记表面(DLS)和骨表面(BS)的线性检测结果,使用公式 $DLS+(1/2 SLS)/BS \times 100$ 计算 MS/BS 百分率。使用 0.03 mm^2 像框并覆盖约 1.67 mm^2 的区域,以 40X 放大倍数对未染色的 $10 \mu\text{m}$ 切片进行检测。所有的检测都使用 R&M Biometrics Inc. Bioquant Image Analysis System 进行。

- 为获得初级成骨细胞，将未载荷的约 4 周龄 TIC-系 19 LRP5 G171V TG 小鼠及其野生型非-TG 同窝小鼠的胫骨切除，将其切成小碎片，用溶解在 DMEM 中的胶原酶(1 mg/mL)在振荡水浴中于 37℃ 消化 30 分钟。离心去除消化上清液；再另外重复两次胶原酶消化。
- 5 将第三次消化后获得的碎片转移至新鲜生长培养基(补加 10%胎牛血清的 DMEM)，并按照标准技术培养，直至获得细胞的汇合平板。该平板称为种子 1。然后将碎片再接种培养，又多收集了两次种子。

- 使用分离自前两次骨碎片种子的 RNA 生产 cRNA (即互补 RNA)，用于和 Affymetrix MGU74Av2 阵列杂交。使用 QIAGEN RNA
- 10 试剂盒按照生产商的说明由 80%汇合平板分离总 RNA。靶互补 RNA (cRNA)制备和与 Affymetrix MGU74Av2 阵列的杂交基本如所述进行。Hill et. al., *Science* 290(5492): 809-12 (2000)。

数据使用一组 Spike-in 对照归一化，并按较早的描述分析。Hill et. al., *Genome Biol.* 2(12): RESEARCH0055 (2001)。

- 15 对于 TaqMan®分析，使用 AMBION RNA 试剂盒按照生产商的说明由骨分离总 RNA。对总 RNA 进行 DNA 酶 I 处理，然后在 TaqMan® 反应中按照以下论述的标准方法进行分析：

- | | | |
|-----|----------------------|-----------------------|
| 1. | ABI 4322171 | 大容量 cDNA Archive 试剂盒 |
| 2. | ABI 4313663 | 粘型上盖启动包 |
| 3. | ABI 4311971 | 粘型上盖，100/PK |
| 4. | ABI 4318157 | 2x 主混合物(Master Mix) |
| 5. | ABI 450025 或 4316034 | 标记为 6FAM 或 VIC 的探针 |
| 6. | ABI 4304971 | 序列检测引物，最小 40,000 pmol |
| 7. | Marsh AB-0626 | 粘性 PCR 箔密封 |
| 8. | Matrix 8095 25 mL | Reservoir w/Divider |
| 9. | Ambion 9937 | 无核酸酶的水 |
| 10. | Ambion 2684 | RNA 酶抑制剂 |

逆转录(ABI 4322171 大容量 cDNA Archive 试剂盒)

如下制备 cDNA 混合物:

试剂	体积/反应(孔)
10X RT 缓冲液	10 μL
25X dNTP 混合物	4 μL
Multiscribe RTase (50 U/ μL)	5 μL
10X 随机引物	10 μL
RNA 酶抑制剂	2 μL
H ₂ O	X (至 100 μL)
DNA 酶处理的 RNA	Y (至 10 μL)
合计	100 μL

搅匀, 并于室温温育 10 分钟, 于 37℃ 温育 2 小时。平板可于 -80℃ 储存最多 1 年。

5

II. QC 和 PCR

平板 50 ng/10 μl cDNA 每孔。稀释的 cDNA 可于 -20℃ 储存 1 周。制备 50 μM 引物混合物。使用等份的 ABI (100 μM) 探针。

如下制备 PCR 混合物:

试剂	体积/反应(孔)
2X PCR 主混合物	12.5 μL
50 μM 引物混合物	0.2 μL
100 μM 探针	0.05 μL
H ₂ O	2.25 μL
cDNA	10 μL
合计	25 μL

简单地说, 旋转平板, 并放入 ABI 7000 中, 按照 ABI 的说明分析数据。其它要考虑的方面包括:

10

1. 引物稀释液和 PCR 混合物应在前 PCR 区制备, 优选在使用当天制备。

2. 对于低水平表达的基因，基线可能需要调整。
3. 如果可能的话，每块板都应包含阳性对照，这有助于归一化不同板和设备的数据。

(用于体内载荷实验)

5 DNA 酶 1 消化
Ambion 的试剂

小规模

RNA 10 μg

10X DNA 酶 1 缓冲液 5 μL

10 RNA 酶抑制剂 1 μL

DNA 酶 1 2 μL

DEPC H₂O 至 50 μL

合计 50 μL

于 37℃ 温育 45 分钟至 1 小时。加入 1X 苯酚 CHCl₃ 提取(以 14,000 旋转 15 分钟)。

沉淀

EA

DNA 酶 1 消化 全部

DEPC H₂O 至 200 μL

20 5 M NaOAC 5 μL

糖原 5 μL

冷的 100% ETOH 600 μL

25 搅匀。在 -80℃ 保持 3 小时或在干冰中保持 20 分钟。于 4℃ 旋转 15 分钟。用 75% ETOH 清洗 1 次。在 DEPC H₂O 中重悬浮。为定量，进行 1: 50 稀释，并检测 OD。也可以使用其它方法，例如 Qiagen 的方法。Arnold et al., *BioTechniques* 25(1):98-106 (1998)。所有的探针-引物对都得自 Applied Biosystems。用于本研究的 TaqMan® 探针-引

物对的清单可见于表 13。

与非-TG 小鼠相比，在 LRP5 G171V TG 小鼠中观察到骨尺寸增加。此结果与股骨和椎骨的结构强度特性较大直接相关，LRP5 G171V TG 小鼠中每牛顿(N)外部载荷的实际应变远低于非-TG 小鼠。因此，
5 与其非-TG 同窝小鼠相反，LRP5 G171V TG 小鼠仅感受到实际施加载荷的约 70%作为应变。

使用组织形态检测学方法，在 4 点弯曲系统载荷后，评价非转基因和 LRP5 G171V 转基因雄性和雌性小鼠的骨生成。雌性小鼠载荷 6 N (在非-TG 小鼠中的相当应变为 $2,231 \pm 110 \mu\epsilon$ ，而在 LRP5 G171V TG 小鼠中的相当应变为 $1,525 \pm 81 \mu\epsilon$)。雄性小鼠载荷 7 N (在非-TG 小鼠中的相当应变为 $2,740 \pm 157 \mu\epsilon$ ，而在 LRP5 G171V TG 小鼠中的相当应变为 $1,841 \pm 131 \mu\epsilon$)。在载荷后的两种基因型和性别的小鼠胫骨中观察到的骨生成反应比未载荷对照强，证据是骨膜中钙荧光素标记的表面增加(图 11)。载荷非-TG 和载荷 LRP5 G171V 转基因小鼠中钙荧光素标记增加没有显著差异。但是，考虑到 LRP5 G171V TG 小鼠感受到的应变比非-TG 小鼠低约 30%，所以在施加外部载荷时 LRP5 G171V TG 小鼠的骨生成反应较大。
10
15

根据我们先前关于机械载荷作用和合成代谢骨生长的研究，测试 LRP5 G171V 突变改变骨细胞对骨载荷敏感性并由此增加骨形成的能力。参见 Boppart et al., *Bone* 23(5):409-415 (1998); Cullen et al., *Exercise: Basic and Applied Science* 227-237 (Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD 2000); Akhter et al., *Calci. Tissue Int.* 63(5): 442-9 (1998); 和 Akhter et al., *J. Clin. Densitom.* 5(2): 207-16 (2002)。体外循环机械载荷诱导前列腺素 E (PGE)的释放以及前列腺素合酶 (COX-2)、前列腺环素合酶(PTGIS)和内皮一氧化氮合酶(eNOS)基因的表达，这对成骨细胞功能起重要作用。使用实时 PCR (TAQMAN®) 进一步分析骨载荷作用下基因转录的 RNA，RNA 得自体内施加载荷 (雌性小鼠 6 N，雄性小鼠 7 N)后 4 和 24 小时的 17 周龄雄性和雌性
20
25

LRP5 G171V TG 小鼠和非-TG 小鼠的胫骨。所有小鼠骨中的全部三种基因(即 COX-2、eNOS 和 PTGIS)的转录都被上调(P<0.01)(图 12)。但是, 这种上调在 LRP5 G171V TG 小鼠中是其非-TG 同窝小鼠的约 4-10 倍高。

5 在载荷后的非-TG 和 LRP5 G171V TG 小鼠中, 几种骨细胞标记基因如骨粘连蛋白(SPARC)、组织蛋白酶 K (CTSK)和金属蛋白酶组织抑制剂(TIMP)的转录都被上调。这可使用表 13 的引物和探针通过 TaqMan®测定。但是, 如在上文讨论的基因的情况下, LRP5 G171V TG 小鼠中的反应更大, 表明这些小鼠中的骨生成活性增加。表 7 描述了这些小鼠中在骨载荷作用下被上调和下调的基因。

10

表 7
基因型和载荷诱导的 HBM 特征基因的转录

通路	基因名称	基因型作用	载荷作用
Wnt	细胞周期蛋白 D1	无显著变化	在 TG 和非-TG 小鼠中都增加。在 HBM TG 小鼠中更多。
	连接蛋白 43	无显著变化	在 TG 和非-TG 小鼠中都增加。在 HBM TG 小鼠中更多。
	WISP2	在 HBM TG 小鼠中增加	在 TG 和非-TG 小鼠中都增加。在 HBM TG 小鼠中更多。
	卷曲蛋白 2	无显著变化	在 TG 和非-TG 小鼠中都增加。在 HBM TG 小鼠中更多。
	SFRP1	在 HBM TG 小鼠中增加	在 TG 和非-TG 小鼠中都增加。在 HBM TG 小鼠中更多。
	SFRP4	在 HBM TG 小鼠中增加	在 TG 和非-TG 小鼠中都增加。在 HBM TG 小鼠中更多。
	Wnt10B	在 HBM TG 小鼠中增加	在 TG 和非-TG 小鼠中都增加。在 HBM TG 小鼠中更多。
HBM1 特	IGFBP6	在 HBM TG	在 TG 和非-TG 小鼠中都增

征基因		小鼠中增加	加。在 HBM TG 小鼠中更多。
<u>通路</u>	<u>基因名称</u>	<u>基因型作用</u>	<u>载荷作用</u>
	CTSK	在 HBM TG 小鼠中增加	在 TG 和非-TG 小鼠中等量增加。
	骨粘连蛋白	无显著变化	在 TG 和非-TG 小鼠中都增加。在 HBM TG 小鼠中更多。
	IGF2	在 HBM TG 小鼠中下降	
	GADD45 A	在 HBM TG 小鼠中下降	
	CollA1	无显著变化	
	TGF β	在 HBM TG 小鼠中增加	
	TIMP3	在 HBM TG 小鼠中增加	
	ACP5	在 HBM TG 小鼠中增加	
载荷传感物基因	eNOS	无显著变化	在 TG 和非-TG 小鼠中都增加。在 HBM TG 小鼠中更多。
	PTGS	无显著变化	在 TG 和非-TG 小鼠中都增加。在 HBM TG 小鼠中更多。
	IL-6	在 HBM TG 小鼠中下降	在 TG 和非-TG 小鼠中都增加。在 HBM TG 小鼠中更多。
压力和破骨细胞功能基因	IL-8	在 HBM TG 小鼠中下降	在 TG 和非-TG 小鼠中都增加。在 HBM TG 小鼠中更多。
	MK2	在 HBM TG 小鼠中下降	只在非-TG 小鼠中增加。在 HBM TG 小鼠中无显著变化。
	OPG	无显著变化	只在 HBM TG 中增加。在非-

TG 中无显著变化。

<u>通路</u>	<u>基因名称</u>	<u>基因型作用</u>	<u>载荷作用</u>
	RANKL	无显著变化	在二者中均没有显著变化。
	LRP5	在 HBM TG 小鼠中稍微增加	在二者中均没有显著变化。

所述“基因型作用”是指 HBM TG 或非-TG 同窝小鼠骨中的基因活性怎样反应。还分析了在骨中监测的蛋白表达(题为“载荷作用”的列)。

在统计学上，观测的基因表达产生以下结果，如表 8-10 所示。

5

表 8

Wnt/ β -联蛋白靶基因在非-TG 和 LRP5 G171V TG 小鼠中的基因型依赖性转录变化倍数
Wnt 相关的靶基因 HBM TG: 非-TG 动物

CCND1	1.17
DKK3	0.33
MT2	3.00
NOTCH1	1.67
SFRP1	7.00
SFRP2	2.36
WISP2	2.33
WNT10B	1.55

表 9

NF- κ B 和 JNK 信号转导途径基因在非-TG 和 LRP5 G171V TG 小鼠中基因型依赖性转录

10

<u>NF-κB 和 JNK 信号转导基因</u>	变化倍数
	<u>HBM TG: 非-TG 小鼠</u>
GRO1	0.63
Jun B	0.38
MAPKAPK5	0.50
NFkB1	0.35

表 10

在非-TG 和 LRP5 G171V TG 小鼠中
骨细胞功能基因转录的差异

<u>骨功能相关基因</u>	变化倍数
	<u>HBM TG: 非-TG 小鼠</u>
BGN	1.67
BMP1	0.52
Col1A1	1.64
Col3A1	3.14
CSF1R	0.42
CSPG2	5.00
CTSK	2.42
IGFBP5	0.48
LUM	4.20
MMP-14	1.56
MMP-9	5.29
OGN	3.00
PCOLCE	2.00
PLAT	0.45
S100A10	1.89
SDF1	6.80
SERPINE1	3.09
SPP1	2.16
TOB1	0.66

在以上三个表中报告的所有变化倍数的相关 P 值均小于 0.05。

观察到 Wnt 拮抗剂 SFRP1 基因转录的诱导最大。这可能表明骨细胞中的稳态反应防止慢性活化的 β -联蛋白信号转导的高增殖作用。

5 还观察到 Wnt10B RNA 在 HBM 小鼠骨中被上调。深入研究了 Wnt/ β -联蛋白信号转导在早期发育中的作用，并且表明其在肿瘤中起作用。因此，令人感兴趣地是，Wnt 共受体(即 LRP5)中的突变产生高骨质，在受影响个体或动物中没有出现恶性表型。另外，尽管 β -联蛋白被广泛描述为参与发育，但这是首次提出 β -联蛋白信号转导途径在正常成人骨中被活化，并参与机械感觉信号作用下的骨密度调节。

10

β -联蛋白靶基因的表达被证实没有载荷的情况下在 HBM TG 小鼠(即含 G171V 突变的小鼠)的骨细胞中被上调。为理解 LRP5 G171V TG 或非-TG 小鼠骨细胞转录谱的基因型特异性差异可能影响骨生成的差异，分析胫骨骨碎片种子的 RNA (如以上的材料和方法所述)。观测了许多影响成骨细胞活性的基因的转录，这些基因包括：

15 原胶原 C-蛋白酶增强蛋白(PCOLCE)、胶原 1 和 3、骨特异性双糖链蛋白聚糖(BGN)、osteoglycin (OGN)、基质金属蛋白酶 9 和 14 (分别为 MMP-9 和 MMP-14)、硫酸软骨素蛋白多糖(CSPG2)、集落刺激因子 1 受体(CSF1R)、ErbB-2.1 转导蛋白(TOBI)和基膜聚糖(LUM)。这些列出的基因在 G171V LRP5 TG 小鼠骨中被诱导，表明这些小鼠骨中的成骨活性增加。这些基因中有一些基因的转录活性述于表 8-10。

20

除了这些骨特异性基因之外，观察到 Wnt/ β -联蛋白信号转导相关基因的优势是在 LRP5 G171V TG 小鼠中差异性转录。Wnt 信号转导组成蛋白(例如 Wnt 10B、SFRP1、SFRP2 和 DKK3)和 β -联蛋白靶

25 基因(即金属硫蛋白 2 (MT2)、细胞周期蛋白 D1 (CCND1)和 WNT1 诱导性信号转导途径蛋白 2 (WISP2))的转录在 LRP5 G171V TG 小鼠的骨中被诱导(表 8-11)。这些观测结果与对 Wnt 信号转导途径中 LRP5 G171V 突变的作用进行的研究一致。我们还注意到，在这些小鼠中

NF- κ B 和 JNK 通路的几个信号转导组分和靶基因(即 NF- κ B1、GRO1、JUN B)的转录下调。因此, LRP5 G171V 突变可通过调节几个通路中的信号转导来影响骨密度, 但最明显地是 β -联蛋白信号转导途径。

5 在对非-TG 和 HBM TG 小鼠的骨施加机械载荷后, β -联蛋白介导的信号转导显示被活化。LRP5 依赖性 Wnt/ β -联蛋白信号转导的上调与成骨细胞增殖和功能的增强有关。为评价施加机械载荷后 β -联蛋白通路对成骨活性的作用, 如前所述用 TaqMan®分析 HBM TG 和非-TG 小鼠的未载荷和载荷胫骨的几个通路组分和靶基因的 RNA 水平。

10 在非-TG 小鼠的骨中, 在施加机械载荷后 4 小时和 24 小时, Wnt 10B、SFRP1、CCND1、连接蛋白 43 和 WISP2 RNA 的水平都被显著上调(平均增加 Log_2 1-2)(图 13A 和 13B)。卷曲蛋白 2 的转录在载荷后 4 小时被诱导, 但卷曲蛋白 2 的 RNA 水平在 24 小时时回到基线。非-TG 小鼠载荷后 4 小时或 24 小时的 SFRP4 基因转录都没有显著变化。这些数据表明, 机械压力在非-TG 野生型小鼠的骨细胞中诱导 β -联蛋白信号转导途径的几种信号转导组分和下游靶基因的转录。

15 在 LRP5 G171V TG 小鼠中, 观察到所分析的所有 Wnt 相关的和 β -联蛋白靶基因(包括 SFRP4)的转录都有更明显的增加(即 Log_2 1.5-5.0)。卷曲蛋白 2 的 RNA 水平在载荷后 4 小时的非-TG 和 HBM TG 小鼠中都被诱导至大约相同的水平。但是, 与非-TG 小鼠不同, HBM TG 小鼠即使在 24 小时时也保持这种增加。基因转录的这些变化在两个时间点都是统计学显著的, $P<0.01$ (图 13A 和 13B)。这些观测结果表明, 机械载荷活化 β -联蛋白介导的信号转导, LRP5 G171V 突变在 Wnt 通路中起功能获得型突变的作用。

20 还在 HBM TG 和非-TG 小鼠中研究了机械载荷对 OPG/RANKL 介导的信号转导的作用。在 HBM TG 小鼠骨中观察到参与 NF- κ B 和 Jun/Fos 介导的信号转导的基因下调。此观察结果可能表明, 上游因子如 RANK 配体(RANKL)表达的改变刺激破骨细胞中 NF- κ B 和

Jun/Fos 驱动的通路(Romas et al., *Bone* 30(2): 340-6 (2002))。RANKL 是 NF- κ B 受体活化物(即 RANK)的配体。RANK/RANKL 相互作用驱使破骨细胞分化。该过程被诱捕(decoy) RANKL 受体护骨蛋白(OPG)有效阻断。如在体外和体内观察到的那样, 成骨细胞和基质细胞中的 OPG 和 RANKL 水平经常被相互调节。假定存在这种相互调节, 分析非-TG 和 LRP5 G171V TG 小鼠骨中的 RANKL 和 OPG 水平。在没有载荷的情况下, 观察到非-TG 和 G171V LRP5-TG 小鼠的 RANKL 和 OPG RNA 水平没有差异。两种基因型的 RANKL RNA 水平都不受施加的机械载荷的影响。尽管在非-TG 小鼠中没有观察到 OPG RNA 水平被显著诱导(0.9 Log₂ 倍数, $P<0.01$), 但 HBM TG 小鼠中的 OPG RNA 水平显著增加(即 3.5 Log₂ 倍数, $P<0.01$)(图 14)。在 HBM TG 小鼠中 RANKL 没有任何同时增加的情况下 OPG 水平的显著增加表明, 破骨细胞分化和活性受到 LRP5 G171V 突变的抑制。

15 实施例 7
施加重力载荷后的 MC3T3 细胞转录谱

通过离心 15 分钟对 MC3T3 细胞施加重力载荷(即 1 G、6 G、12 G 和 25 G)。在载荷后 15 分钟收获细胞, 并处理获得总 RNA。使用 RNA 生产用于和 Affymetrix MG U74Av2 阵列杂交的靶。

20 在实验条件下, ERK (也称为 p42/44 MAPK)磷酸化; 磷酸化于 25 G 时最大。对 Fos、Jun 和 COX-2 的 RNA 水平全部进行评价, 并测定出所有三个基因的最大诱导也出现在 25 G。另外, 大多数被上调的基因是 Wnt/ β -联蛋白通路组分。表 11 提供了被鉴别为在重力载荷作用下被上调或下调的主要基因。

25 表 11
在施加重力载荷后 MC3T3 小鼠成骨细胞中的
几种 Wnt/ β -联蛋白靶基因的转录被诱导

上调基因	基因种类	下调基因	基因种类
AP1	Wnt 靶基因	BMP4	Wnt 靶基因
AXIN	Wnt 信号转导中间体	BTG2	生长抑制剂
BMP1	GSK 抑制剂诱导型基因	IDB2	Wnt 靶基因
CBFA1	成骨细胞功能	IDB3	Wnt 靶基因
CK1	Wnt 靶基因	NRA1	Wnt 靶基因
连接蛋白 31	Wnt 靶基因	TOB 1	生长抑制剂
连接蛋白 43	Wnt 靶基因		
CRABP2	成骨细胞分化		
CTGF	生长因子		
DVL	Wnt 信号转导中间体		
EPHB6	Wnt 信号转导基因		
FOS	Wnt 靶基因		
GADD45B	Wnt 靶基因		
GADD45G	细胞周期调节剂		
HERPUD1	Wnt 靶基因		
IKK α	β -联蛋白核转运		
IL1R1	炎症		
JUN	压力信号转导		
LDLR	脂蛋白受体		
MAPKAPK2	激酶-压力信号转导		
MSX-1	Wnt 靶基因		
MYC	Wnt 靶基因		
NCAM1	Wnt 靶基因		
OPG	Wnt 靶基因		
PTGS1	炎症		
PTGS2	Wnt 靶基因		
STAT3	细胞生长和增殖		

上调基因	基因种类	下调基因	基因种类
TIMP1	基质金属蛋白酶		
TIMP3	基质金属蛋白酶		
WISP1	Wnt 靶基因		

关于载荷上调和下调的基因的更详细总结参见以下的表 12。所述“Wnt 靶基因”是指包括但不限于其转录在 Wnt/ β -联蛋白信号转导活化作用下被诱导的基因(图 16)。所述“Wnt 信号转导中间体”是指包括但不限于涉及活化 Wnt 细胞信号转导下游的蛋白的编码基因。

5 表 11 使用的术语“炎症”是指参与炎症反应的蛋白的编码基因。表 11 使用的术语“细胞生长和增殖”是指包括但不限于参与细胞生长和增殖的蛋白的编码基因。表 11 使用的术语“生长因子”是指包括但不限于细胞生长需要的蛋白的编码基因。表 11 使用的术语“基质金属蛋白酶”是指包括但不限于参与切割基质金属蛋白的蛋白酶的编码基因。

10 表 11 使用的术语“激酶-压力信号转导”是指包括但不限于参与压力作用的信号转导级联下游(例如 p38 MAPK 通路)的激酶的编码基因。表 11 使用的术语“脂蛋白受体”是指包括但不限于脂蛋白受体的编码基因。表 11 使用的术语“ β -联蛋白核转运”是指包括但不限于参与胞质 β -联蛋白转运至核的蛋白的编码基因。

15 表 11 使用的术语“细胞周期调节剂”是指包括但不限于参与细胞周期调节的蛋白的编码基因。表 11 使用的术语“成骨细胞功能”是指包括但不限于参与成骨细胞功能和活性的蛋白的编码基因。表 11 使用的术语“成骨细胞分化”是指包括但不限于参与成骨谱系细胞分化为成熟成骨细胞和骨细胞的蛋白的编码基因。表 11 使用的术语“生长抑制”是指包括但不限于抑制细胞生长的蛋白的编码基因。

20 表 11 使用的术语“iGSK 诱导的”是指包括但不限于其转录被观测到由 iGSK 诱导的基因。

表 12
施加重力载荷后的 MC3T3 小鼠成骨细胞差异性转录谱

索引号	平均 1G	平均 6G	6G/1G	FC2	6G 得分	平均 1G	平均 12G	12G/ 1G	FC2	12G 得分	平均 1G	平均 25G	25G/ 1G	FC2	25G 得分	名称	基因描述
102044_ at	18.98	22.25	1.17	1.17	-3.00	18.98	134.47	7.08	7.08	15.73	18.98	184.53	9.72	9.72	16.00	WISP1- Wnt 靶基 因	WNT1 诱导型 信号转导途径 蛋白 1
103039_ at	1.19	1.84	1.55	1.55	6.31	1.19	9.15	7.70	7.70	9.17	1.19	25.46	21.42	21.42	16.00	ITGA5	整联蛋白 α5 (纤连蛋白受体 α)
92368_ at	1.19	2.84	2.39	2.39	-1.61	1.19	15.66	13.16	13.16	15.79	1.19	18.56	15.60	15.60	16.00	RAMP3	受体(降钙素) 活性修饰蛋白 3
93294_ at	17.82	26.66	1.50	1.50	7.25	17.82	183.10	10.28	10.28	15.92	17.82	238.20	13.37	13.37	16.00	CTGF	结缔组织生长 因子
160519_ at	38.36	49.86	1.30	1.30	-1.00	38.36	191.87	5.00	5.00	15.87	38.36	248.46	6.48	6.48	15.91	TIMP3	金属蛋白酶组 织抑制剂 3
102209_ at	2.55	2.68	1.05	1.05	-9.00	2.55	31.58	12.36	12.36	15.80	2.55	50.67	19.84	19.84	15.89	NFATC1	活化 T 细胞核 因子, 胞质 1
102021_ at	9.45	12.07	1.28	1.28	-7.00	9.45	101.60	10.76	10.76	15.81	9.45	104.49	11.06	11.06	15.89	IL4RA	白介素 4 受 体, α

索引号	平均1G	平均6G	6G/1G	FC2	6G得分	平均1G	平均12G	12G/1G	FC2	12G得分	平均1G	平均25G	25G/1G	FC2	25G得分	名称	基因描述
99603_g_at	2.66	3.58	1.35	1.35	-9.00	2.66	16.02	6.03	6.03	15.05	2.66	20.24	7.61	7.61	15.81	TIEG	TGFB诱导型早期生长应答
104232_at	5.32	6.16	1.16	1.16	-9.00	5.32	38.39	7.21	7.21	15.33	5.32	47.19	8.87	8.87	15.63	GJB3-Wnt靶基因	缝隙连接膜通道蛋白β3
94147_at	62.32	104.83	1.68	1.68	8.63	62.32	207.98	3.34	3.34	15.30	62.32	245.17	3.93	3.93	15.49	SERPINE1	丝氨酸(或半胱氨酸)蛋白酶抑制剂, 进化枝E(连接蛋白, 纤溶酶原活化物抑制剂1型), 成员1
100064_f_at	55.07	57.32	1.04	1.04	-3.00	55.07	133.29	2.42	2.42	9.42	55.07	222.29	4.04	4.04	15.48	GJA1-Wnt靶基因	缝隙连接膜通道蛋白α1
104601_at	44.37	56.90	1.28	1.28	-3.00	44.37	135.61	3.06	3.06	13.19	44.37	159.78	3.60	3.60	15.43	THBD	凝血调节蛋白
92676_at	7.76	7.92	1.02	1.02	-9.00	7.76	24.15	3.11	3.11	15.36	7.76	26.85	3.46	3.46	15.39	RUNX2/CBFA1	runx 相关转录因子2

索引号	平均1G	平均6G	6G/1G	FC2	6G 得分	平均1G	平均12G	12G/ 1G	FC2	12G 得分	平均1G	平均25G	25G/ 1G	FC2	25G 得分	名称	基因描述
100130_at	8.13	12.15	1.49	1.49	-0.04	8.13	40.63	5.00	5.00	12.53	8.13	47.19	5.80	5.80	15.36	JUN-Wnt 靶基因	Jun 癌基因
160832_at	12.31	16.87	1.37	1.37	-3.00	12.31	45.82	3.72	3.72	15.44	12.31	95.71	7.77	7.77	15.29	LDLR	低密度脂蛋白 受体
161666_f_at	3.83	5.29	1.38	1.38	-9.00	3.83	32.10	8.37	8.37	13.91	3.83	27.28	7.12	7.12	15.27	GADD45B -Wnt 靶基 因	生长停滞和 DNA 损伤诱导 蛋白 45β
161177_f_at	38.98	40.69	1.04	1.04	-3.00	38.98	55.16	1.42	1.42	-3.00	38.98	87.84	2.25	2.25	15.25	LOX	赖氨酰氧化酶
101526_at	3.40	14.08	4.14	4.14	11.00	3.40	18.45	5.43	5.43	13.96	3.40	21.18	6.23	6.23	15.18	MSX1- Wnt 靶基 因	同源框, msh 样 1
98500_at	9.66	11.56	1.20	1.20	-1.84	9.66	22.33	2.31	2.31	9.31	9.66	41.00	4.25	4.25	15.15	IL1RL1	白介素 1 受体 样 1
102887_at	6.52	6.37	0.98	1.02	-9.00	6.52	28.05	4.30	4.30	15.39	6.52	48.38	7.42	7.42	15.13	TNFRSF1 1B/OPG- Wnt 靶基 因	肿瘤坏死因子 受体超家族, 成员 11b (护骨 蛋白)
92877_at	18.14	19.18	1.06	1.06	-3.00	18.14	49.18	2.71	2.71	12.65	18.14	67.91	3.74	3.74	15.09	TGFB1	转化生长因 子, β诱导, 68 kDa

索引	平均 1G	平均 6G	6G/1 G	FC2	6G 得分	平均 1G	平均 12G	12G/ 1G	FC2	12G 得分	平均 1G	平均 25G	25G/ 1G	FC2	25G 得分	名称	基因描述
9850 1_at	41.72	47.42	1.14	1.14	-1.00	41.72	163.79	3.93	3.93	15.63	41.72	208.34	4.99	4.99	15.08	ILIRL1	白介素-1 受体 体样 1
9236 4_at	7.02	10.58	1.51	1.51	5.96	7.02	10.64	1.52	1.52	-1.91	7.02	18.88	2.69	2.69	14.96	CELSR2	钙粘着蛋白 EGF LAG 七跨膜 G 型 受体 2
9493 2_at	11.61	19.40	1.67	1.67	5.02	11.61	63.00	5.43	5.43	15.38	11.61	90.48	7.79	7.79	13.99	PDGFA	Cluster Incl M29464 ; 血小板衍生 的生长因子 α /cds=(62,6 52)/gb=M29 464/gi=2002 72/ug=Mm. 2675/len=90 6/STRA=for 前列腺素- 内过氧化物 合酶 1
9559 7_at	5.17	7.10	1.37	1.37	-9.00	5.17	11.45	2.22	2.22	5.22	5.17	15.19	2.94	2.94	13.88	PTGS 1	TGFB 诱导 性早期生长 应答
9960 2_at	5.74	6.42	1.12	1.12	-9.00	5.74	24.64	4.30	4.30	12.22	5.74	30.38	5.30	5.30	13.58	TIEG	

索引号	平均1G	6G	6G/1G	EC2	6G 得分	平均1G	平均12G	12G/1G	EC2	12G 得分	平均1G	25G/1G	FC2	25G 得分	名称	基因描述
103328_at	7.20	12.43	1.73	1.73	1.36	7.20	13.92	1.93	1.93	2.60	7.20	28.12	3.91	13.56	TANK	TRAF 家族成员相关的 NF- κ B 活化剂
100065_r_at	13.95	10.52	0.75	1.33	-7.00	13.95	34.44	2.47	2.47	12.03	13.95	42.27	3.03	13.51	GJA1-Wnt 靶基因	GJA1-Wnt 缝隙连接膜通
100127_at	42.07	44.53	1.06	1.06	-1.00	42.07	83.88	1.99	1.99	8.99	42.07	117.86	2.80	13.18	CRABP2	视黄酸结合蛋白 II
93546_s_at	34.86	40.83	1.17	1.17	-3.00	34.86	64.06	1.84	1.84	8.03	34.86	106.90	3.07	13.08	CBFB	核结合因子 β
96033_t	8.55	9.08	1.06	1.06	-9.00	8.55	18.68	2.19	2.19	9.19	8.55	24.30	2.84	13.04	SDCI	多配体聚糖 1
99070_a_t	9.12	10.15	1.11	1.11	-7.00	9.12	17.39	1.91	1.91	6.44	9.12	27.50	3.02	13.00	CHUK/IKK	保守螺旋-环-K α -促进螺旋在激酶 β -联蛋白核转运
93914_a_t	16.86	21.65	1.28	1.28	-3.00	16.86	42.12	2.50	2.50	9.50	16.86	53.40	3.17	12.89	IL1R1	白介素-1 受体, I 型
92399_a_t	3.38	2.47	0.73	1.37	-9.00	3.38	10.45	3.09	3.09	9.44	3.38	15.52	4.59	12.39	RUNX1	runx1 相关转录因子 1
162371_r_at	3.47	9.72	2.80	2.80	1.80	3.47	8.63	2.49	2.49	1.49	3.47	23.30	6.72	12.19	EPHB6-Wnt 靶基因	Eph 受体 B6 Wnt 靶基因

索引	平均 1G	平均 6G	6G/1 G	FC2	6G 得分	平均 1G	平均 12G	12G/1G	FC2	12G 得分	平均 1G	平均 25G	25G/1G	FC2	25G 得分	名称	基因描述
9307 6_at	44.37	49.28	1.11	1.11	-3.00	44.37	71.31	1.61	1.61	2.64	44.37	110.55	2.49	2.49	11.99	CK1 α - Wnt 通 1, α 1 路组分	酪蛋白激酶
1027 79_at	1.24	1.40	1.13	1.13	-9.00	1.24	23.06	18.63	18.63	15.13	1.24	12.48	10.08	10.08	11.81	GADD4 5B-Wnt 靶基因	生长停滞和 DNA 损伤诱 导蛋白 45 β
1603 19_at	9.21	12.56	1.36	1.36	-5.00	9.21	15.26	1.66	1.66	2.94	9.21	19.30	2.10	2.10	11.57	SPARCL 1 (mast9, hevin)	SPARC-样 1
1039 04_at	56.45	86.00	1.52	1.52	8.10	56.45	91.28	1.62	1.62	2.70	56.45	124.06	2.20	2.20	11.55	IGFBP6	胰岛素样生 长因子结合 蛋白 6
9570 4_at	1.33	4.81	3.61	3.61	2.00	1.33	1.26	0.95	1.06	-9.00	1.33	10.30	7.72	7.72	11.49	APIB1- Wnt 靶 基因	接头蛋白复 合物 AP-1, β 1 亚单位
1019 18_at	1.25	2.33	1.87	1.87	-0.30	1.25	5.34	4.28	4.28	4.00	1.25	7.93	6.35	6.35	10.00	TGFB1	转化生长因 子, β 1
9501 0_at	6.69	7.70	1.15	1.15	-9.00	6.69	10.17	1.52	1.52	-1.88	6.69	18.54	2.77	2.77	9.77	TRAF3	TNF 受体相 关因子 3

索引号	平均 1G	平均 6G	6G/1 G	FC2	6G 得分	平均 1G	平均 12G	12G/ 1G	FC2	12G 得分	平均 1G	平均 25G	25G/ 1G	FC2	25G 得分	名称	基因描述
98427_s_at	18.20	22.39	1.23	1.23	-3.00	18.20	41.13	2.26	2.26	9.26	18.20	50.30	2.76	2.76	9.76	NFKB1	B 细胞中的κ 轻链基因增 强子的核因 子 1, p105
93547_a_t	32.35	36.22	1.12	1.12	-1.00	32.35	56.86	1.76	1.76	7.55	32.35	87.52	2.71	2.71	9.71	CBFB	核结合因子β
160701_at	10.08	15.90	1.58	1.58	2.47	10.08	15.96	1.58	1.58	2.50	10.08	27.07	2.69	2.69	9.69	AXIN- Wnt 靶 基 因 (?); Wnt 通 路组分	轴蛋白
95557_a_t	10.82	12.21	1.13	1.13	-7.00	10.82	18.24	1.69	1.69	3.12	10.82	28.59	2.64	2.64	9.64	BMP1- 观察到 被 iGSK 诱导	骨形态发生 蛋白 1
95721_a_t	14.59	21.14	1.45	1.45	1.99	14.59	29.03	1.99	1.99	8.99	14.59	38.34	2.63	2.63	9.63	MAPKA PK2	MAP 激酶活 化的蛋白激 酶 2
103975_at	1.37	1.75	1.28	1.28	-14.00	1.37	4.37	3.20	3.20	9.29	1.37	9.33	6.83	6.83	9.50	PRDC- PENDIN G	与 DAC 和 Cerberus 相 关的蛋白

索引号	平均IG	平均6G	6G/1G	FC2	6G得分	平均IG	平均12G	12G/1G	FC2	12G得分	平均IG	平均25G	25G/1G	FC2	25G得分	名称	基因描述
98418_at	7.19	9.09	1.26	1.26	-1.65	7.19	11.40	1.59	1.59	0.51	7.19	17.97	2.50	2.50	9.50	DVL1-Wnt通路组分	Disheveled, dsh 同系物 (果蝇)
10197_9_at	14.76	20.79	1.41	1.41	-3.00	14.76	33.81	2.29	2.29	9.29	14.76	33.55	2.27	2.27	9.27	GADD45 G	生长停滞和DNA损伤诱导蛋白45γ
92701_at	8.04	8.16	1.01	1.01	-9.00	8.04	10.36	1.29	1.29	-7.00	8.04	17.70	2.20	2.20	9.20	BMP1-观察到的被蛋白1 iGSK-3诱导	骨形态发生蛋白1
10146_4_at	267.45	308.38	1.15	1.15	-3.00	267.45	451.79	1.69	1.69	8.01	267.45	587.13	2.20	2.20	9.20	TIMP1	金属蛋白酶组织抑制剂
99100_at	19.86	27.06	1.36	1.36	-3.00	19.86	34.24	1.72	1.72	3.35	19.86	43.36	2.18	2.18	9.18	STAT3	RIKEN cDNA 1110034C02 基因
95057_at	8.47	7.95	0.94	1.07	-9.00	8.47	22.90	2.71	2.71	9.71	8.47	18.10	2.14	2.14	9.14	HERPUD1-Wnt靶基因	高半胱氨酸诱导的、内质网压力诱导的泛素样结构域成员1

索引	平均 1G	平均 6G	6G/1 G	FC2	6G 得分	平均 1G	平均 12G	12G/1G	FC2	12G 得分	平均 1G	平均 25G	25G/1G	FC2	25G 得分	名称	基因描述
99835_at	58.37	72.72	1.25	1.25	-1.00	58.37	53.64	0.92	1.09	-3.00	58.37	116.08	1.99	1.99	8.99	FOSL1	Fos-样抗原 1
10015_2_at	2.28	3.76	1.65	1.65	3.71	2.28	3.41	1.50	1.50	-4.51	2.28	8.79	3.86	3.86	8.85	NCAM1-Wnt 靶基	神经细胞粘附分子
93126_at	3.15	3.79	1.20	1.20	-9.00	3.15	6.30	2.00	2.00	5.82	3.15	6.52	2.07	2.07	8.70	CKB	肌酸激酶, 脑
10236_4_at	68.18	93.10	1.37	1.37	-1.00	68.18	86.33	1.27	1.27	-3.00	68.18	128.57	1.89	1.89	8.31	JUND1	Jun 原癌基因
10435_4_at	1.78	2.54	1.43	1.43	-12.00	1.78	6.32	3.55	3.55	6.43	1.78	10.49	5.89	5.89	8.02	CSF1R	相关基因 d1 集落刺激因子 1 受体
10464_7_at	73.47	76.91	1.05	1.05	-3.00	73.47	88.97	1.21	1.21	-3.00	73.47	129.55	1.76	1.76	7.58	PTGS2-Wnt 靶基	前列腺素-内过氧化氧化物合酶 2
94231_at	9.85	9.49	0.96	1.04	-9.50	9.85	11.24	1.14	1.14	-7.50	9.85	17.92	1.82	1.82	5.41	CCND1-Wnt 靶基	细胞周期蛋白 D1
16054_5_at	6.70	13.85	2.07	2.07	10.83	6.70	11.95	1.78	1.78	3.69	6.70	14.13	2.11	2.11	5.11	CCND3	细胞周期蛋白 D3
10258_l_at	3.02	3.26	1.08	1.08	-9.00	3.02	4.18	1.38	1.38	-9.50	3.02	7.86	2.60	2.60	6.45	MYCS-Wnt 靶基	Myc-样癌基因, s-myc 蛋白

索引	平均 1G	平均 6G	6G/1 G	FC2	6G 得分	平均 1G	平均 12G	12G/ 1G	FC2	12G 得分	平均 1G	平均 25G	25G/ 1G	FC2	25G 得分	名称	基因描述
16237 l_r_at	3.47	9.72	2.80	2.80	1.80	3.47	8.63	2.49	2.49	1.49	3.47	23.30	6.72	6.72	12.19	EPHB6- Wnt 靶基 因	Eph 受体 B6
99532 _at	33.19	37.56	1.13	1.13	2.03	33.19	15.81	0.48	2.10	9.10	33.19	34.25	1.03	1.03	-3.00	TOB1	ErbB-2.1 的 转导物
10237 l_at	154.66	172.23	1.11	1.11	-3.00	154.66	9.31	0.06	16.62	15.71	154.66	36.71	0.24	4.21	16.00	NR4A1- Wnt 靶基 因; 根据 细胞类型 上调/下调	核受体亚家 族 4, A 组, 成员 1
92614 _at	64.65	92.80	1.44	1.44	-1.00	64.65	3.01	0.05	21.46	15.98	64.65	2.88	0.04	22.45	16.00	IDB3	DNA 结 合 抑制剂 3
93013 _at	27.81	31.19	1.12	1.12	-3.00	27.81	3.11	0.11	8.95	16.00	27.81	3.27	0.12	8.49	15.73	IDB2-Wnt 靶基 因; 根据 细胞 类型上调/ 下调	DNA 结 合 抑制剂 2
16090 l_at	224.53	258.08	1.15	1.15	-3.00	224.53	12.27	0.05	18.30	16.00	224.53	35.45	0.16	6.33	15.64	FOS	FBJ 骨肉瘤 癌基因

索引	平均	平均	6G/1	FC2	6G	平均	平均	12G/1G	FC2	12G	平均	平均	25G/1G	FC2	25G	名称	基因描述
号	1G	6G	G		得分	1G	12G	1G		得分	1G	25G	1G		得分		
94820	22.51	6.05	0.27	3.72	10.00	22.51	13.15	0.58	1.71	5.28	22.51	5.85	0.26	3.85	12.40	CCN1	细胞周期蛋白 I
93456	20.57	20.29	0.99	1.01	-3.00	20.57	7.90	0.38	2.61	12.51	20.57	7.14	0.35	2.88	9.88	BMP4-Wnt 靶基因；根据细胞类型上调/下调	骨形态发生蛋白 4
10158	140.08	182.43	1.30	1.30	-3.00	140.08	18.54	0.13	7.56	15.87	140.08	49.79	0.36	2.81	9.81	BTG2	B 细胞易位基因 2, 抗增殖
3_at																	

可用于进行转录谱分析的其它实验(即评价骨载荷作用下的基因上调和下调)可使用 Metrigenix 等制备的其它寡核苷酸阵列、使用 cDNA 阵列(例如 Incyte、Becton Dickinson、Clontech 等)或本文讨论的阵列、蛋白和抗体阵列(例如 Becton Dickenson、Clontech 和其它供应商的阵列)、使用传统方法(参见例如 PCR PROTOCOLS: A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS (Michael Innis et al., ed., 1990)) 或使用 TaqMan®(即 ABI 的实时 PCR)的聚合酶链反应、eTAG (ACLARA Biosciences)、RNA 印迹分析、S1 核酸酶分析、RNA 酶保护实验和蛋白质印迹。进行这些实验的方法在本领域是已知的。参见例如 USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Harlow, Ed and Lane, David (Cold Spring Harbor Press, 1999); Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL (2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989); 和 Maniatis et al., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 1982)。

表 13 提供了用于分析基因的引物和探针。

表 13
用于 TaqMan® 分析的探针-引物清单

基因	符号	登录号	正向引物	反向引物	探针
100064_f_at	GJA1	M63801	F1: TGAAGGGAAGAAAGCATCCTT	R1: GGAGATCCGCAGTCTTTGGA	ACGCCACCACCGGGCCCACT
连接蛋白 43		X61576	F1: GGCCGGAAGCACCATCT	R1: TGGCTGTCGTACGGGAATC	CAAGTCCCACGCCCAGC CGTT
101918_at	TGFB1	AJ008862	F1: GGAGCCTGGACACACAGTACAG	R1: GCTTGGGACCCACGCTAGTAGA	ACCAACACAAACCCGGGGCGCTT
102801_at	BGLAP-RS1	L24430	F1: TGCATGTTGAAAGGTTCCGTGAA	R1: CACCCCTCCTGTTGCCTCTGA	AGTGTGCTGCTTTCTTTCTGCTGGTCA
103709_at	COL1A1	AA763466	F1: AGTTCCTGGGCCATCTGATCTC	R1: CCTGATGCAGGACAGACCAA	GA
103904_at	IGFBP6	X81584	F1: CGGCCCAATCCTGTTCAA	R1: CGCCTCGGAAGACCTCAGT	TCCCCTCTTGTGCTGCTCCCTC
103991_at	AKP5	M61704	F1: TGTGGCAGGGAAAATGTTGA	R1: GGCACGTGAACAAGCCCAACAA	CCCCTGGCCGCAGACACTTGGGA
160406_at	组织蛋白 磷 K	AJ006033	F1: GGTGCAAGATATTGGTGGCTTT	R1: TCGCTGCTGCCCTCTCA	TTCAAGCCGGCCGCCATCAGC
160519_at	TIMP3	U26437	F1: AGTCGGCTGTTGGGTTGAG	R1: ACAGCTGGCTTGTCTAGAGAA	AGCGCCATGCCCACTCCCTTC
161515_l_at	TIMP2	AV156389	F1: TCCCGGATGAGTGCTT	R1: ATTTGGCCTGGTGTCTCATTA	CCCAGGAAATGACCATGCTCTGG
161666_f_at	GADD45B	AV138783	F1: TCGGGAACAGTGAAATGTGTATAA	R1: AGATTTGCTGTAGCTGCGAAGTC	TGCTCTTCTGTGTGACCCAGTCCATCC
92469_at	SFRP4	AF117709	F1: TGGAGCCACCCTTACAGGAT	R1: GCAAGTGGTATGTGGCCTTCTG	ACGACCCCTTGCCCGGGGAC
94231_at	CCND1	M64403	F1: AGAAATGTACTCTGCTTTGCTGAA	R1: GGGCTGTAGGCACCTGAGCAA	AGGCTGTCCCAGGCAGCACCA
94704_at	WISP2	AF100778	F1: GGTGACCTTGTAAAGTGTGCCCTT	R1: TCCATCTCTCATGTTCCAGAA	AGGCCCTCAGCCTCACTCCCTGG
97997_at	SFRP1	U88566	F1: CCTCCAGGCTTGAGTAAAG	R1: AGCACATGCATAGGCGGTGTA	TCTGAGAACACCCCTGCCGGCT
98623_g_at	IGF2	X71922	F1: CCTCCCTTTGTCATCATGTGAA	R1: GGACAGTGGCACAGGTGACA	TCGTTGACTGCCCCAAGGCTGCC
98859_at	ACP5	M99064	F1: TCATATATGTGGAAGCCTCTGGAA	R1: GCAGGACTCTGTTGGTGTCA	TTCCACGCGCTCGAACGCC
					CCAGCCTCCCAAGAGAGACCCAGA

基因	符号	登录号	正向引物	反向引物	探针
卷曲蛋白 2	卷曲蛋白 2	af363723	F1: GCCCGACTTCACAGTCTACATG	R1: GCCGGACCAGATCCAGAA	CCGACGTGATGCCACGATGA
	Catnip1	NM_023465	F1: GGAGCAAGGACAGTGGAGAATC	R1: CCTGAGAGGAGAGCGTCAATTG	CCAAACCCAGCCCTGACCAGCAA
	骨粘连蛋白	M20692	F1: CGGGCGTTTCTTTCCATGT	R1: GCCCAATTGCAGTTGAGTGA	TTCTGGCCCCACCCCATGGCTCA
	beta2 M		F1: GAGAAATGGGAAGCCGGAACATAC	R1: TTTCCCGTTCTTCAGCATTTG	CACAGTTCACCCCGCCTCACATTG
mLPR5	Lp5	AF064984	F1: CCCCTCTATACCGGAATCAC	R1: CGGATATAGTGTGGCCTTTGTG	CATCCAGCAGCTCGT(MGB)
104647	PTGIS	M88242	F1: AGGCTGTTGGAATTTACGCATAA	R1: CATGCTTGGGTCAGTCAATATTG	AGCAGACTGCATAGAT(MGB)
104538	PTGS2	AB001607	F1: TGGCTTCGGTCTGATGCA	R1: CCCAGGTGAGTGTGCTCCAT	CCAGAGGAAGACGTGCCCATCCG
	eNOS	nm_008713	F1: TCTGGCGGATGTCACATG	R1: GCCCTCTGTTGCCAGAATTC	AGCGTCTGCAAAACCGTGCA
Wnt10B	Wnt10B	AF029307	F1: CCTCGGGCTCAGGTTCTCTA	R1: AAGAGGAGTGGCCAAAAGATAGACT	CCCTATCCAAAGGAAG(MGB)
	MK2	XM_129464	F1: CATTTTCATGCATCTCCCTGAT C	R1: GCGAAGACTGTCCCATCCA	CACGTGGTCCTGCCCTTTGTGGA
95348_at	GRO1	J04596	F1: CCCCAAGTAACGGAGAAAGAAGA	R1: GTTGTGAGAAAGCCAGCGTTCA	CAGACTGCTCTGATGGCACCCTCTG
	OPG	NM_008764	F1: CCACCTCGAACCTCACCACAGA	R1: CAATCTCTTCTGGGCTGATCTTC	CAGGCAGGCTCTCCATCAAGGCA
93416_at	RANKL		F1: GACTTGTCAAAACTATGCAAGCAA	R1: TGGCTATGTCAGCTCCTAAAGTCA	TGTTGGTCACCAGGTGCCTTTCAAATT
					T
	H_mk2		F1: ACCAGCCCGTCTTCTCTCTCT	R1: CAGCACCAGGAAGGATACAGA	TGCCGCTCACCTGCCCTTGT
99333_at	E 选择蛋白	M80778	F1: TGTTCGTGTCTCCTGGCACTGA	R1: TTGACCCCTTGAGCTGACATAAGAA	CCAGCATGAGATCCA(MGB)
102802_at	mIL18	D49949	F1: GGACACTTTCTTGCTTGCCAA	R1: CAGATTTATCCCCATTTTTCATCCT	TGAAAGCATCATCTTC(MGB)
96574_at	mIL9	M30136	F1: AAGCCATGCAACCAGACCCAT	R1: GTCCCCAGGAGACTCTTTCAGAA	AGGCAACACACTGTCTCA(MGB)
97497_at	mNOTCH1	Z11886	F1: TCCGAACCAAGTAGCTCCTAA	R1: ACTTGGTGGGAGCAGATG	AGCACAACCCAGGATG(MGB)
92560_at	mVCAM	U12884	F1: CCCTCCACAAGGCTTCAAGA	R1: GGTAGACCCCTCGCTGGAACA	TGCTGTGACAATGAC(MGB)
mIL6	IL6	PDAR_#4329			

<u>基因</u>	<u>符号</u>	<u>登录号</u>	<u>正向引物</u>	<u>反向引物</u>	<u>探针</u>
hIL6	hIL6	592F PDAR:	得自 ABI-无序列信息		
mFOS	mFOS	#4327040F PDAR	得自 ABI-无序列信息		
mJUN	mJUN	PDAR	得自 ABI-无序列信息		

实施例 8

COX-2 抑制剂诱导对 Wnt 通路活性的调节和对骨载荷的影响

如上所述, COX-2 基因转录由体外和体内施加的机械骨载荷的诱导。COX-2 表达可由 Wnt 1 诱导(Howe et al., *J Biol. Chem.* 276(23): 20108-15 (2001))。进一步已知 COX-2 的启动子具有 TCF-4 结合位点 (Araki et al, *Cancer Res.* 63(3):728-34 (2003))。因此, 要探究地是 COX-2 活性是否是载荷诱导的 Wnt/ β -联蛋白靶基因转录所必需的。以下的实验和相关的实验数据回答了这个问题。

MC3T3 细胞或者放任不处理, 或者在用先前讨论的 Flexercell® 载荷前 1 小时用 1、10 和 60 μ M COX-2 抑制剂 NS-398 ([N-(2-环己基氧基-4-硝基苯基)甲磺酰胺])处理。

在施加载荷后立即分离 RNA 并处理, 以进行 TaqMan® 分析。分析的转录物为 COX-2、eNOS、连接蛋白 43、SFRP1、Wnt10B、细胞周期蛋白 D1、卷曲蛋白 2、WISP2、Fos 和 Jun (图 15)。

结果表明, 载荷诱导 Fzd2、eNOS、FOS、JUN、COX-2、连接蛋白 43、细胞周期蛋白 D1、SFRP1 和 Wnt10B 转录。后 4 种基因全部是 COX-2 活性依赖性的, 因为在 COX-2 抑制剂存在的情况下, 载荷不诱导这些基因转录。载荷诱导的卷曲蛋白 2、eNOS、Fos 和 Jun 转录与 COX-2 活性无关(图 15)。MC3T3 细胞中的 WISP2 基因表达不受载荷诱导。这些利用 COX-2 抑制剂的实验以及由这些实验得出的结论, 仅仅是如何使用该信号转导途径调节物和其它信号转导途径调节物鉴别载荷的骨合成代谢作用和活化 Wnt/ β -联蛋白通路作用所需要的必需元件/因子的一个实例。

实施例 9

Wnt 3A 协同诱导 β -联蛋白靶基因表达

和以上的包括在载荷存在下用 GSK3- β 抑制剂处理 MC3T3 细胞 (参见实施例 1)及其对 β -联蛋白靶基因表达的作用的实验一样, 进行

以下的载荷实验，以观察另一种化合物是否能够增强骨载荷。该实验在存在天然 Wnt 配体 Wnt 3A 的情况下进行。目的是测定在 LRP5/6/卷曲蛋白共受体水平上活化 Wnt/ β -联蛋白通路是否对载荷存在下的 β -联蛋白靶基因表达具有和用 GSK-3 抑制剂观察到的结果(以上实施例)相似的协同诱导。

在此，由鼠 Wnt 3A 转染的小鼠 L-细胞获得 Wnt 3A 条件培养基。如上所述，接种 MC3T3 细胞，并在生长培养基中培养 3 天，直至汇合。然后将 MC3T3 细胞的培养基更换为含 BSA 的培养基，并温育细胞 24 小时。然后去除含 BSA 的培养基，替换为终体积 1 mL 的新鲜 BSA 培养基，该培养基含各种量的 L-细胞 Wnt 3A 条件培养基或得自未转染 L-细胞的对照条件培养基。在终体积 1 mL 的无血清 BSA 培养基中，Wnt 3A 条件培养基的量从 0.5、2.0、5.0、10.0、20.0 到 100 μ L 不等。然后如先前的实施例所述，以 2 Hz、7200 循环/小时使 MC3T3 细胞承受 3,400 μ ε 达 5 小时。

如以上实施例所述收获并处理细胞。结果示于图 17，其表明单独的 Wnt 3A (即无载荷)对细胞周期蛋白 D1、连接蛋白 43、SFRP1、Wnt 10B、WISP2、COX-2、FOS 和 JUN 基因表达没有作用。但是，在载荷存在下，Wnt 3A 剂量独立地(即以双相方式)和协同地诱导细胞周期蛋白 D1、连接蛋白 43、SFRP1、Wnt 10B、WISP2、COX-2、FOS 和 JUN 表达。以上单独载荷的诱导倍数在 1.8 倍至 2.6 倍诱导的范围内。增强载荷最有效的 Wnt 3A 条件培养基的量在约 2 μ L 至 20 μ L 的范围内，更优选在 2-10 μ L 之间。不含 Wnt 3A 的对照 L-细胞条件培养基在载荷存在下对 β -联蛋白靶基因表达没有额外的作用。

这些数据进一步支持了用天然 Wnt 配体活化 Wnt/ β -联蛋白通路使骨细胞对机械载荷的反应更强的观点。因此，Wnt 3A 及其模拟物可用于和本文讨论的 GSK 抑制剂的目的相同的目的。例如，增强 Wnt3A 表达或使用 Wnt 3A 模拟物或功能变体可用于增强骨载荷，以便增加患者骨质。

实施例 10

全身给予 GSK 抑制剂对体内机械载荷反应的作用

我们提出了一种假说：用 GSK 抑制剂全身处理将激活 Wnt 信号转导，由此模拟针对机械载荷的骨反应。预期反应类似于用高骨质（“HBM”）转基因动物模型观察到的结果，即作用于骨的应变量低于野生型动物时 HBM 动物中骨经历合成代谢载荷作用（即活化的 Wnt 信号转导）（参见图 12、13a 和 13b；实施例 6）。使用以下的材料和方法检验该假说。

材料和方法。 分别以 10 $\mu\text{g/mL/kg}$ (低)、50 $\mu\text{g/mL/kg}$ (高)或载体(对照)注射 17 周龄的野生型雌性小鼠。注射皮下给予，每天两次，周期为 14 天。每个分组共有 20 只小鼠。使用的 GSK 抑制剂为 3-(3-Cl-4-羟基苯基氨基)-4-(2-硝基苯基)-1H-吡咯-2,5-二酮。

小鼠的右胫骨载荷 6 N，36 个循环，2 Hz。小鼠的左胫骨为未载荷对照。在此步骤后，于载荷后 4 小时处死小鼠。此时处理组织，并在液氮中快速冻结。将各个分组的载荷(左)和未载荷(右)胫骨合并为 4 组，每组 5 只小鼠。由胫骨(载荷的和未载荷的)、肝、脾、肾、脑、结肠和皮肤纯化 mRNA。通过 Taqman®实时 RT-PCR 对胫骨样品中选择的载荷和 Wnt 反应型基因进行转录分析(描述于图 12、13a 和 13b；实施例 6)。使用 Affymetrix®基因芯片，使用生产商的基因芯片说明，进行更全面的转录谱分析。

所有的小鼠都完成了完整方案。监测胫骨中以下基因的表达：Cox2、eNos、Wnt10B、SFRP1、Cxn43、CCND1、Fzd2 和 WISP2。在 GSK 抑制剂处理小鼠中观察到转录强烈变化，给予低剂量和高剂量 GSK 抑制剂的小鼠之间存在剂量依赖性趋势。在高剂量 GSKi 处理时，与未载荷胫骨相比，载荷胫骨中监测的所有基因都被显著诱导。在该对比中，COX-2 被诱导约 27 倍，eNOS 5 倍、Wnt10B 7 倍、SFRP1 2.5 倍、Cx43 5 倍、CCND1 4 倍、Fzd2 7 倍，而 WISP2 3 倍。

在存在载荷时，与载体处理相比，用高剂量 GSKi 处理协同诱导以下基因的基因表达：Cox2、eNos、Wnt10B、SFRP1、Cx43、CCND1 和 Fzd2。总之，这些数据证实了先前的 HBM 转基因小鼠(实施例 6)和体外 Flexercell 研究(实施例 9)的观察结果，该结果证实：Wnt 信号转导途径的活化增强了针对机械载荷的正常骨反应，导致在同等载荷下骨体验或感知到的应变低。

尽管参照以上实施例详细描述了本发明，但应当理解地是，可进行各种修改而不偏离本发明的精神，这对技术人员来说是容易了解的。

本申请涉及 2003 年 6 月 6 日提交的美国临时申请 No. 60/476,164 和 2003 年 9 月 10 日提交的美国临时申请 No. 60/501,398，其整体内容通过引用整体结合到本文中。对于所有目的，本申请参考的所有引用专利和出版物都通过引用整体结合到本文中。

GSK-3 抑制剂在 HEK-293A 细胞中剂量依赖性
活化 TCF-信号

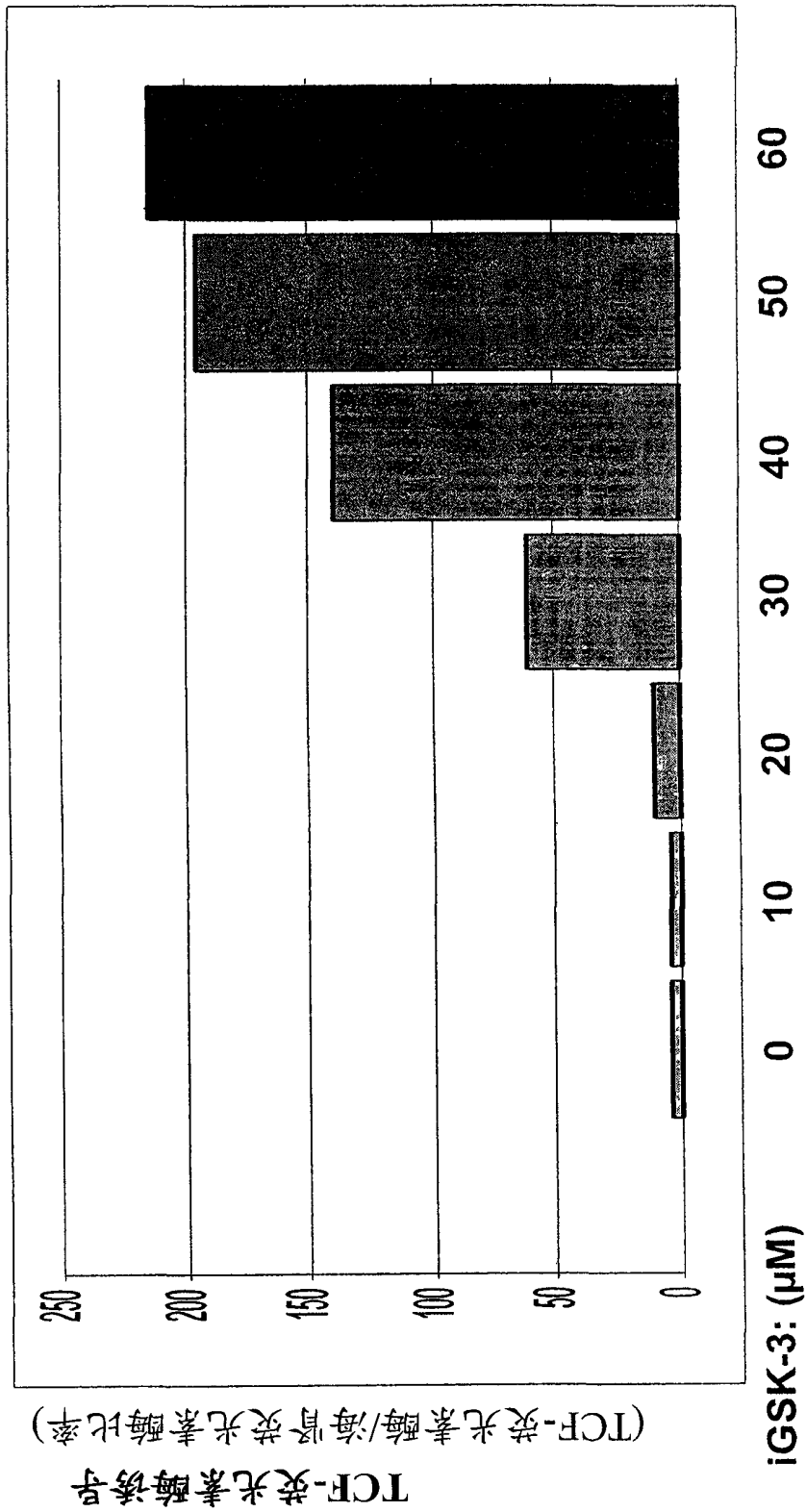


图 1A

对比 GSK-3 抑制剂在 HEK-293A 细胞和 U2OS 骨细胞中
剂量依赖性活化 TCF-信号

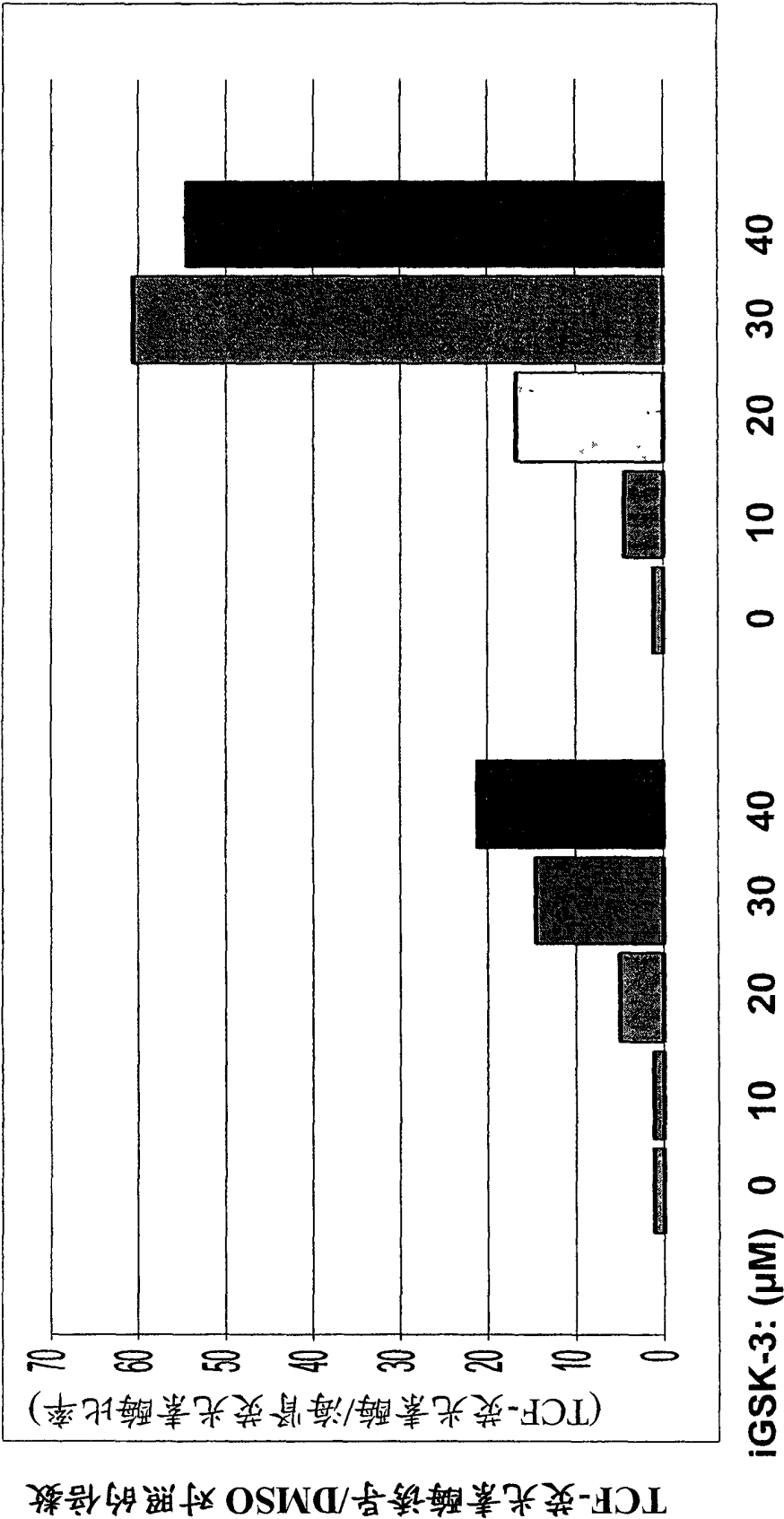


图 1B

GSK-3 抑制剂在 U2OS 细胞中解除 Dkk1 介导的 TCF-信号抑制

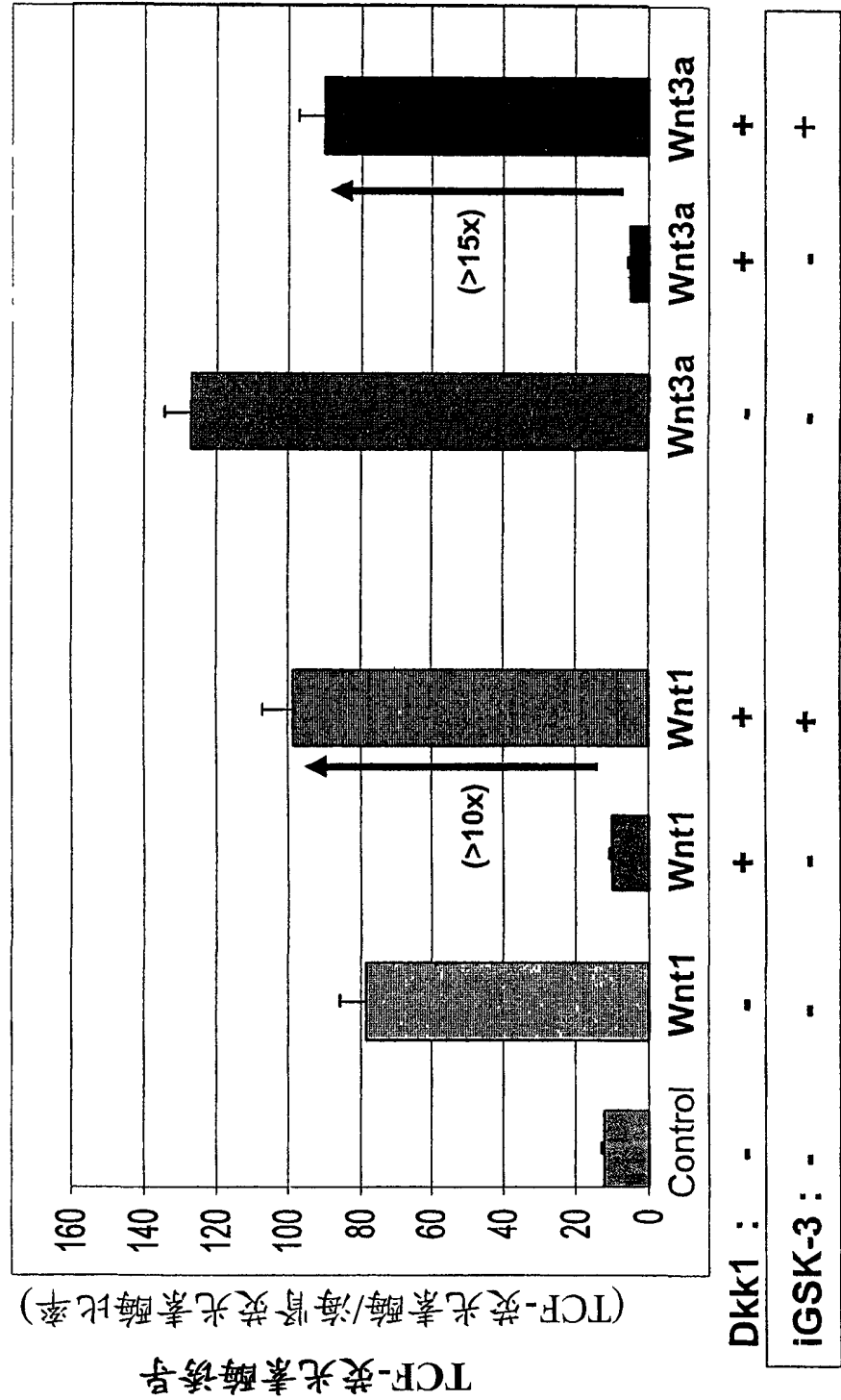
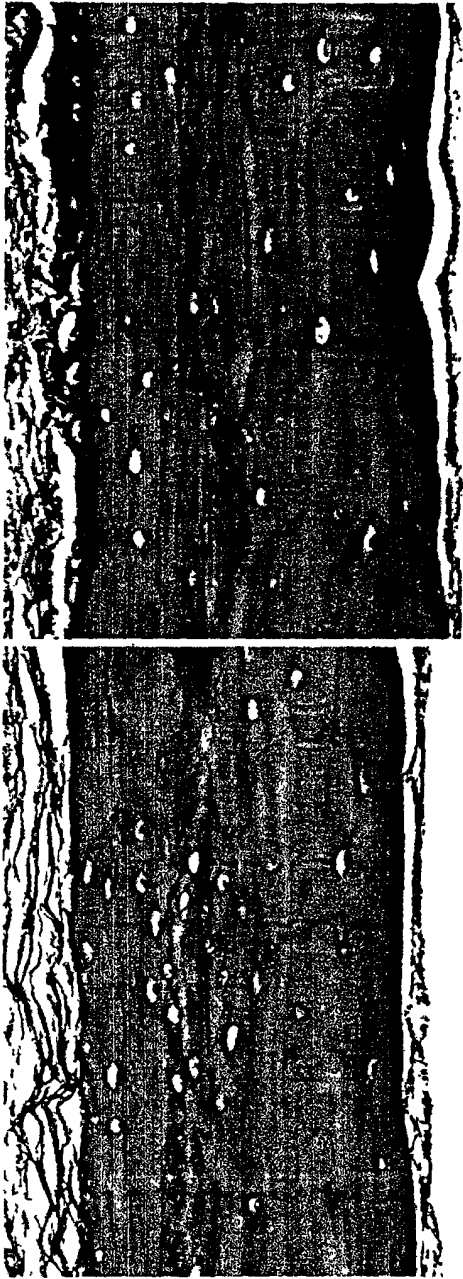


图 2

颅盖厚度

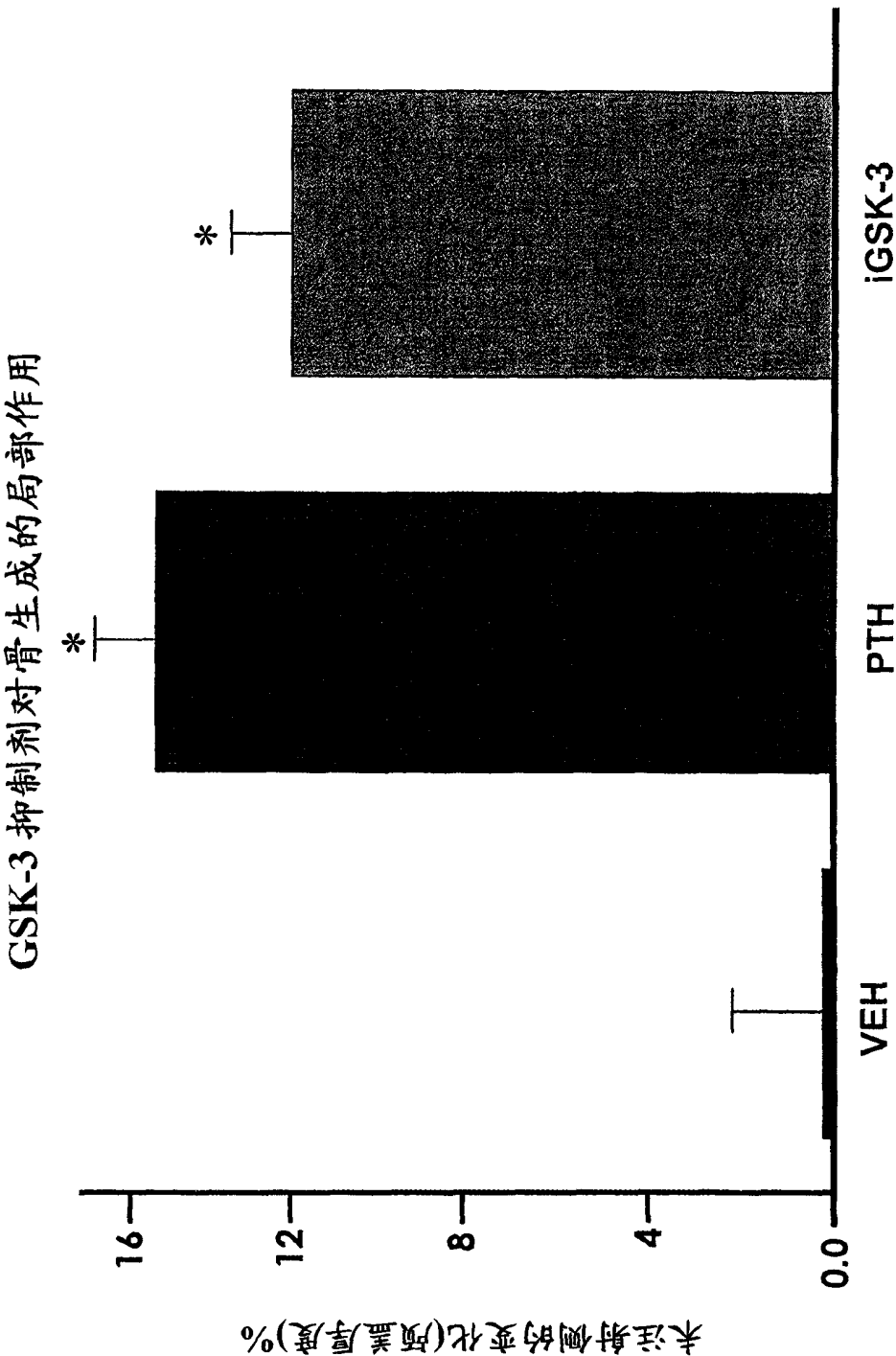


左

右/iGSK-3

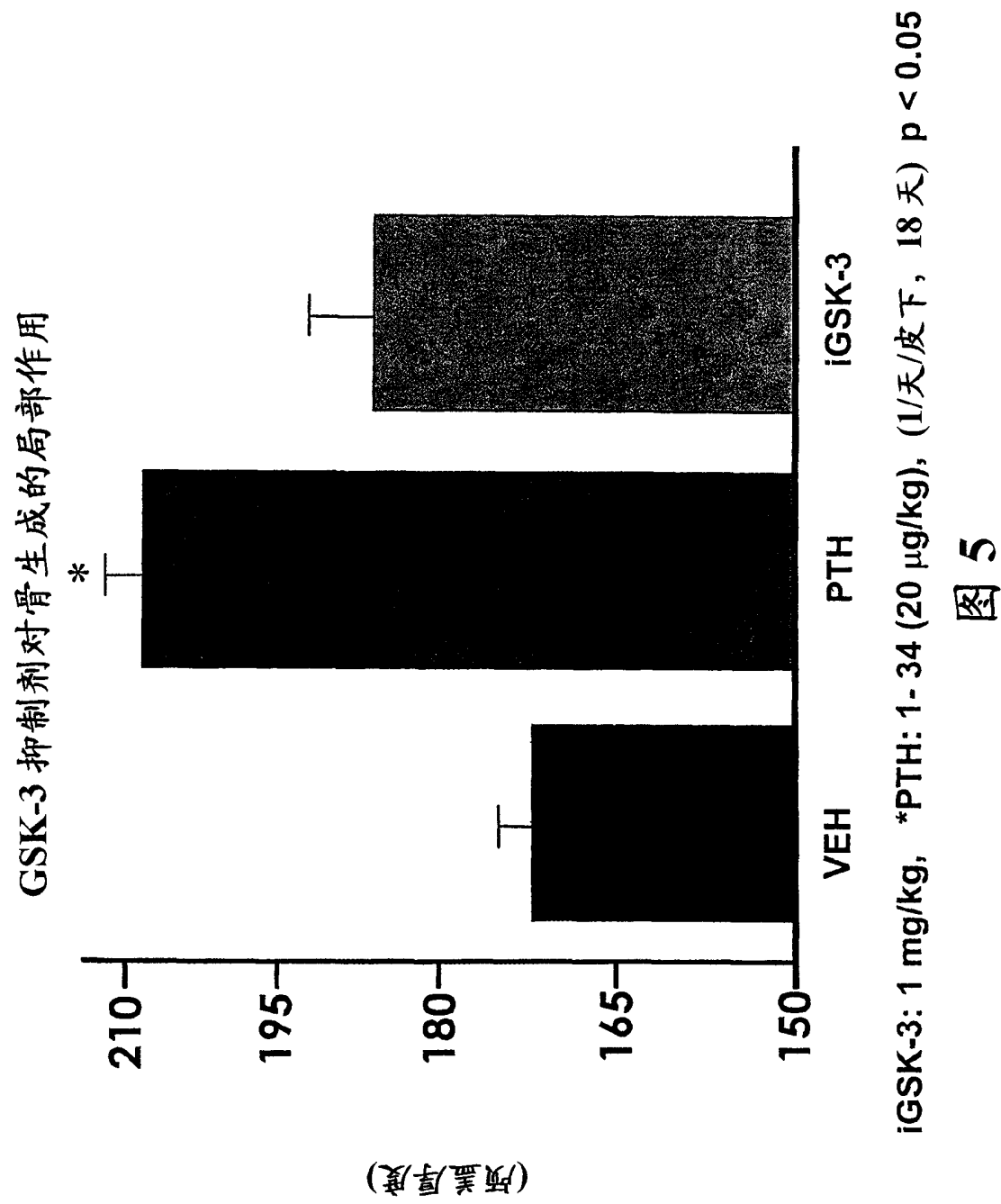
iGSK-3: 1 mg/kg (1/天/皮下, 18 天)

图 3



* iGSK-3: 1 mg/kg, PTH: 1-34 (20 μ g/kg), 1/天/皮下, 18 天 $p < 0.005$

图 4



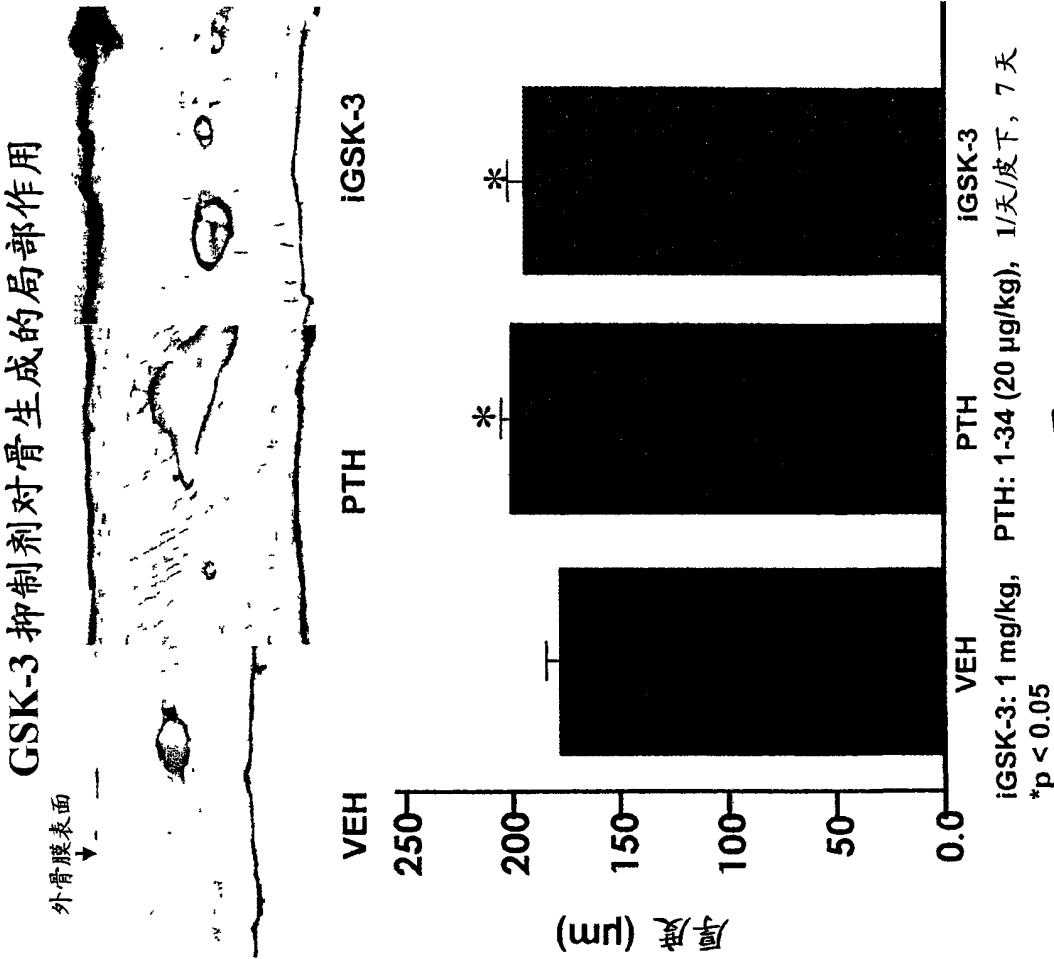
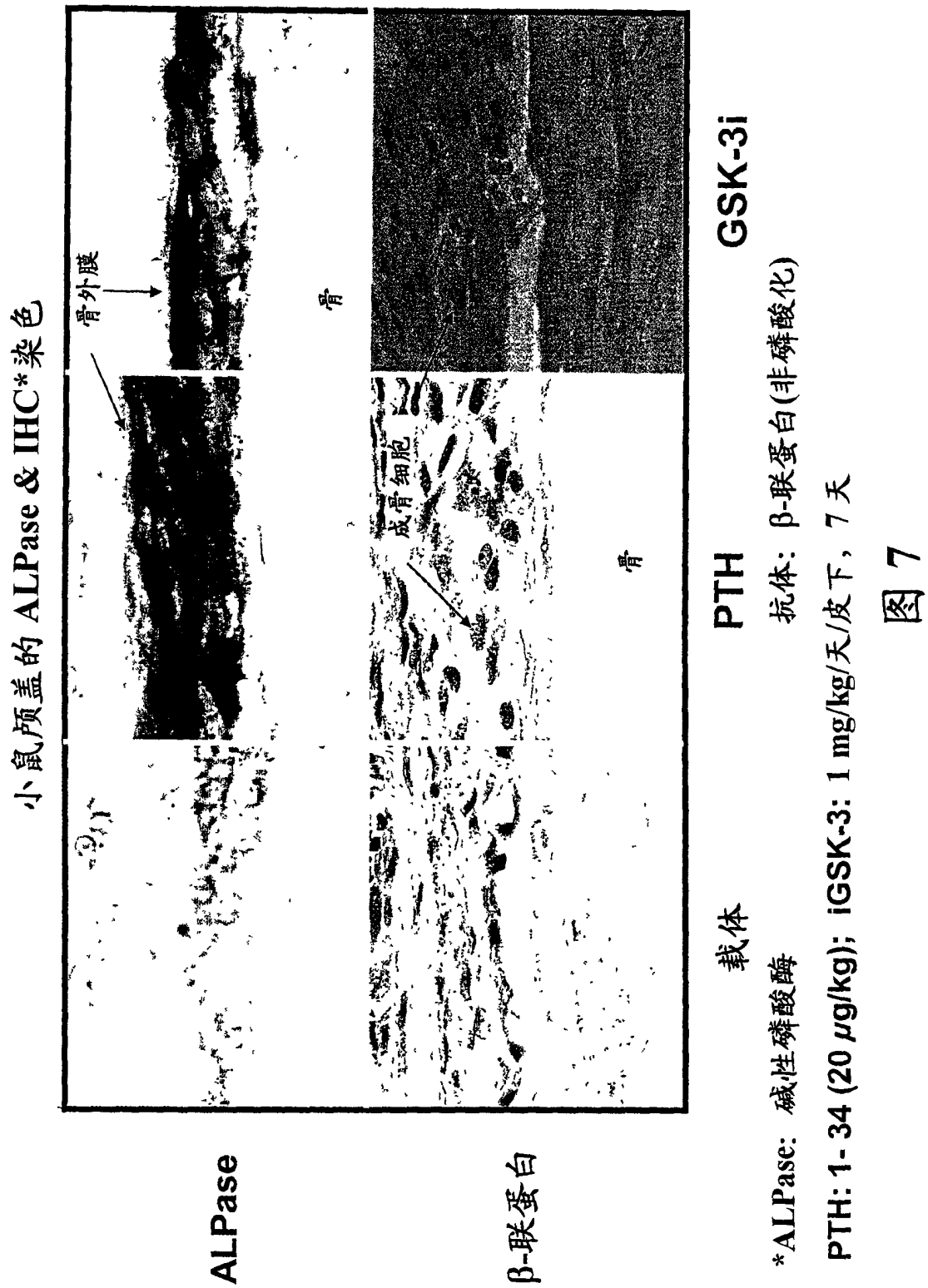
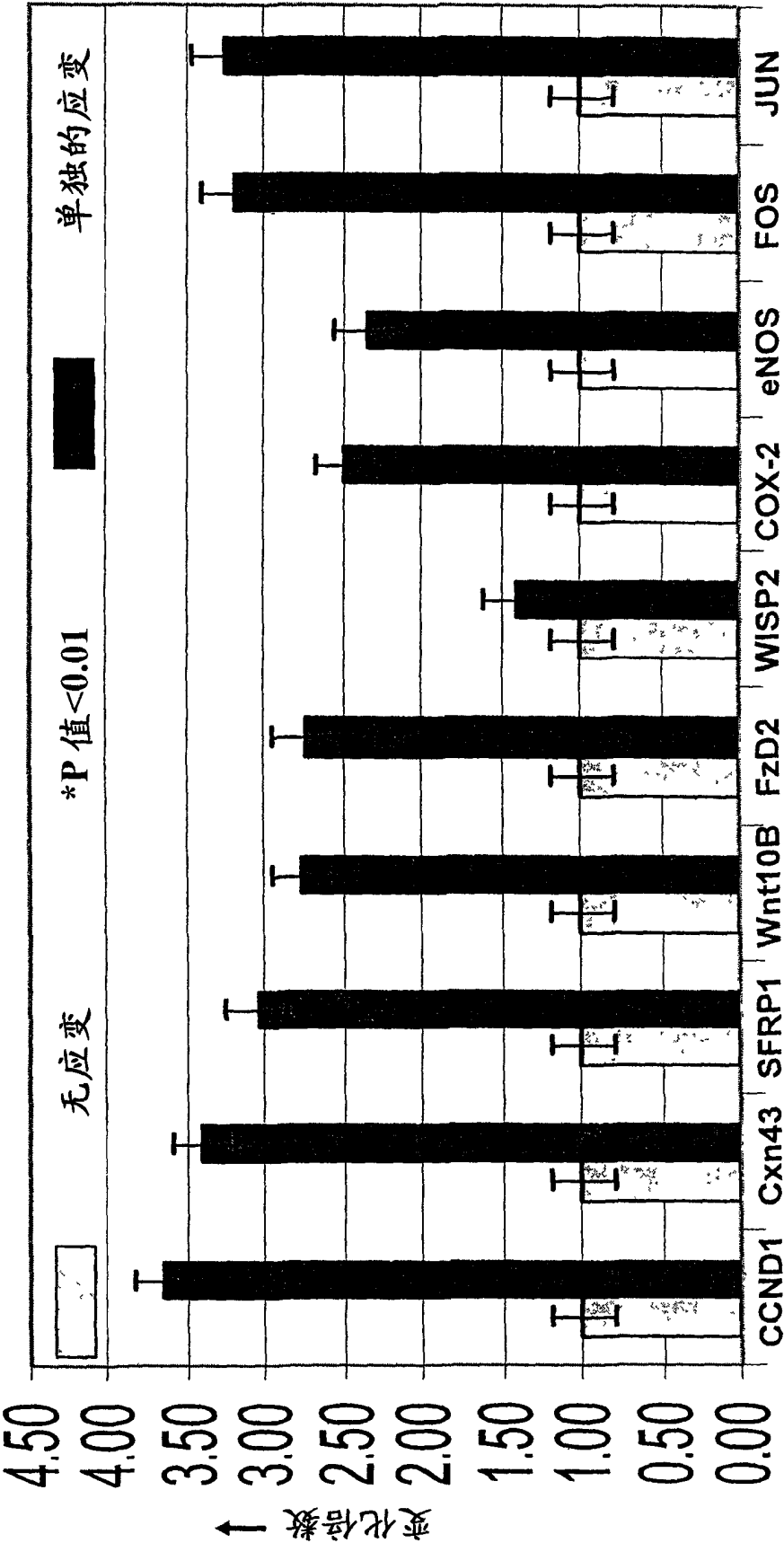


图 6

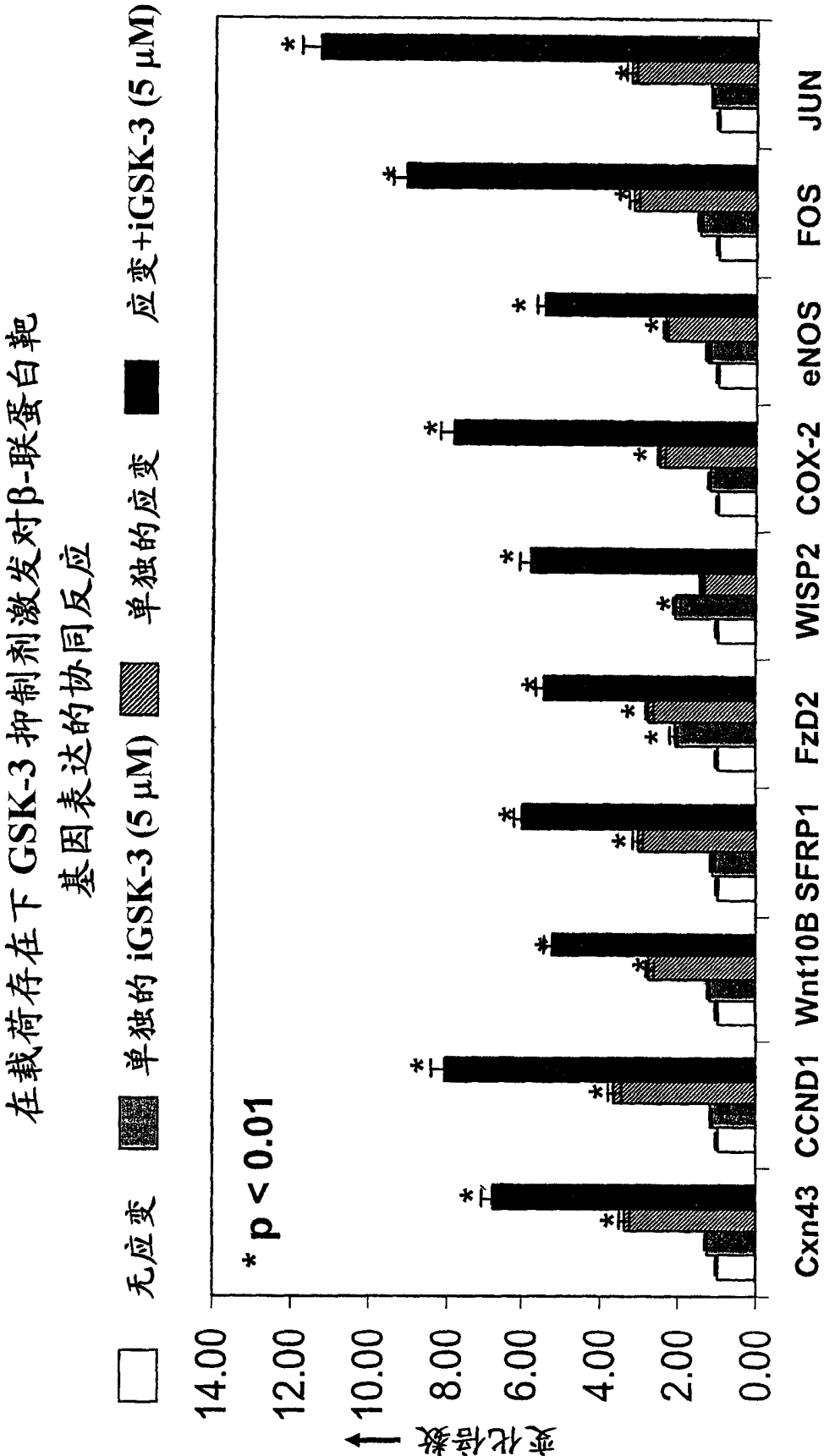


β-联蛋白靶基因在机械载荷的 FlexeCell®
体外模型中被诱导



应变: 等于 3,400 μ ε 应变/5 小时的载荷

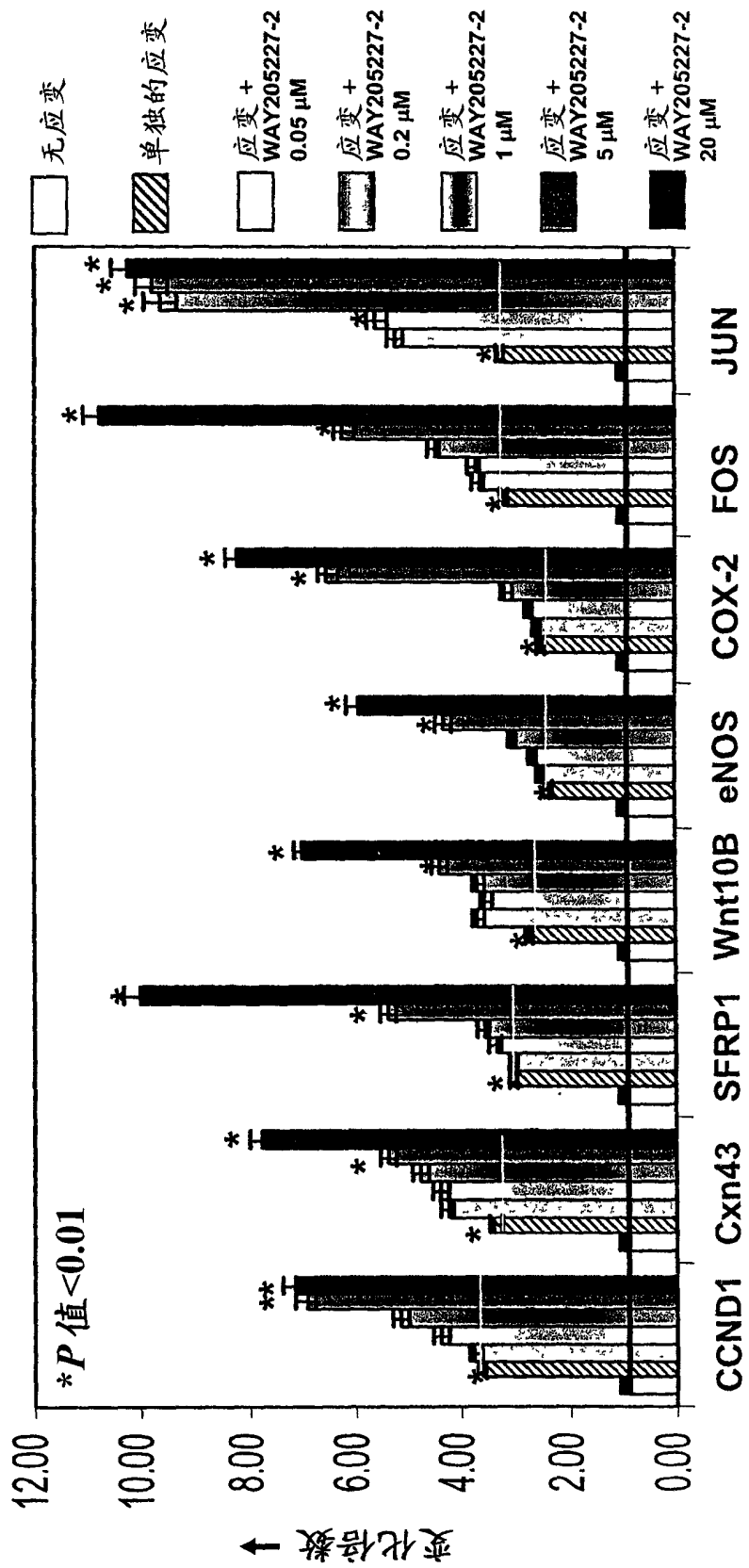
图 8



应变: 等于 3,400 μE 应变/5 小时的载荷

图 9

GSK-3 抑制剂对载荷诱导的β-联蛋白靶基因的
的协同作用是剂量依赖性的



应变: 等于 3,400 με 应变/5 小时的载荷

图 10

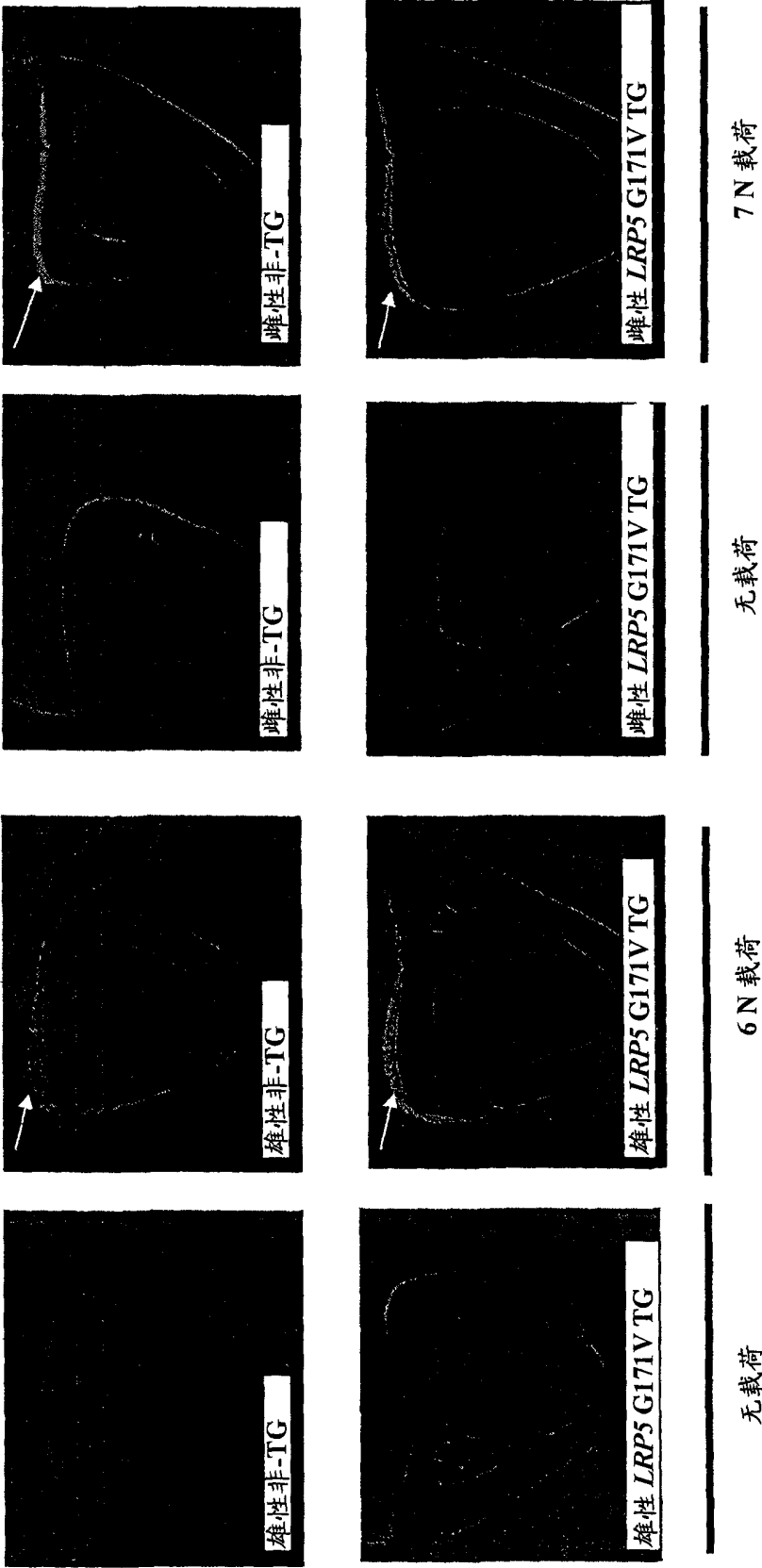


图 11

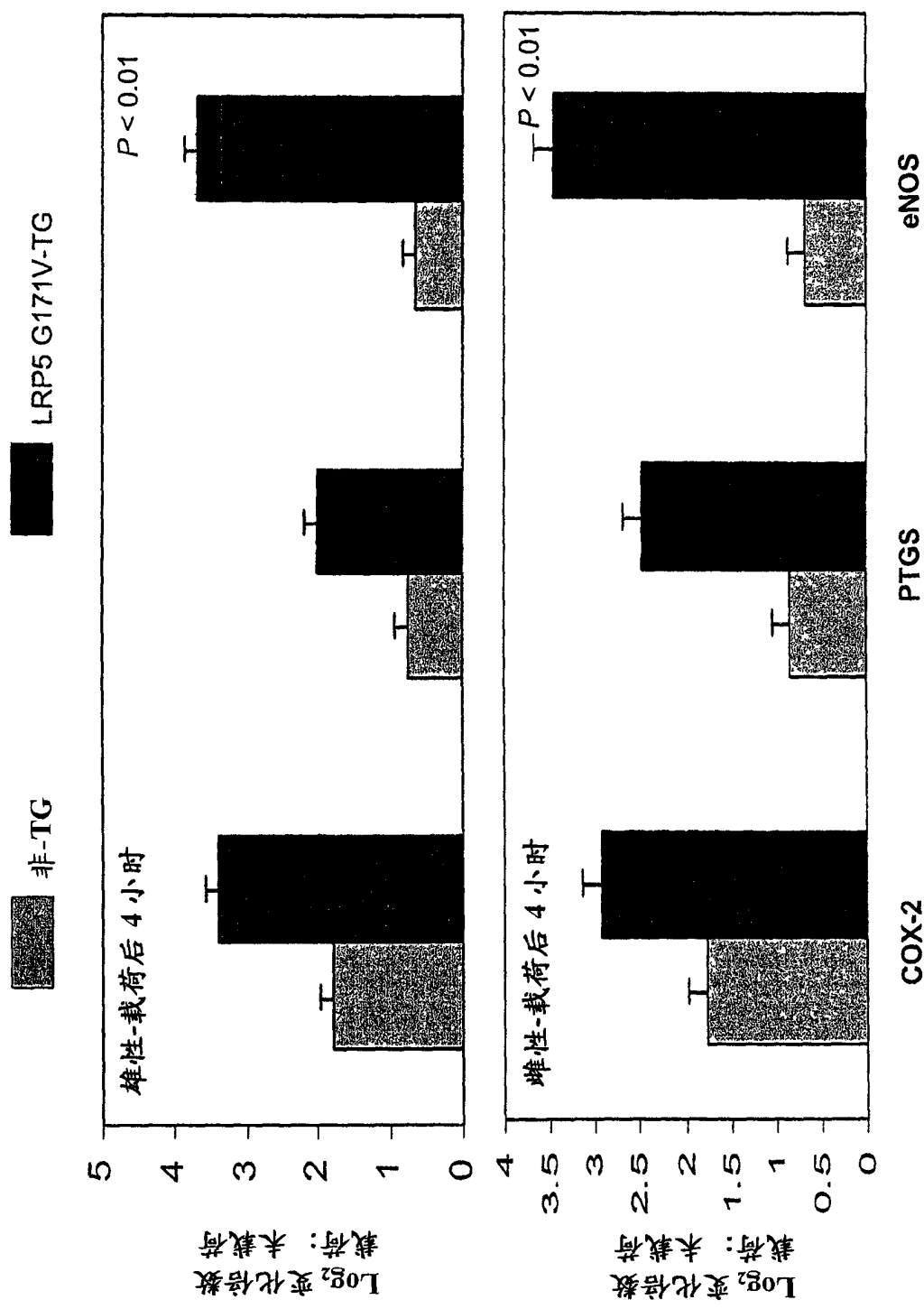


图 12

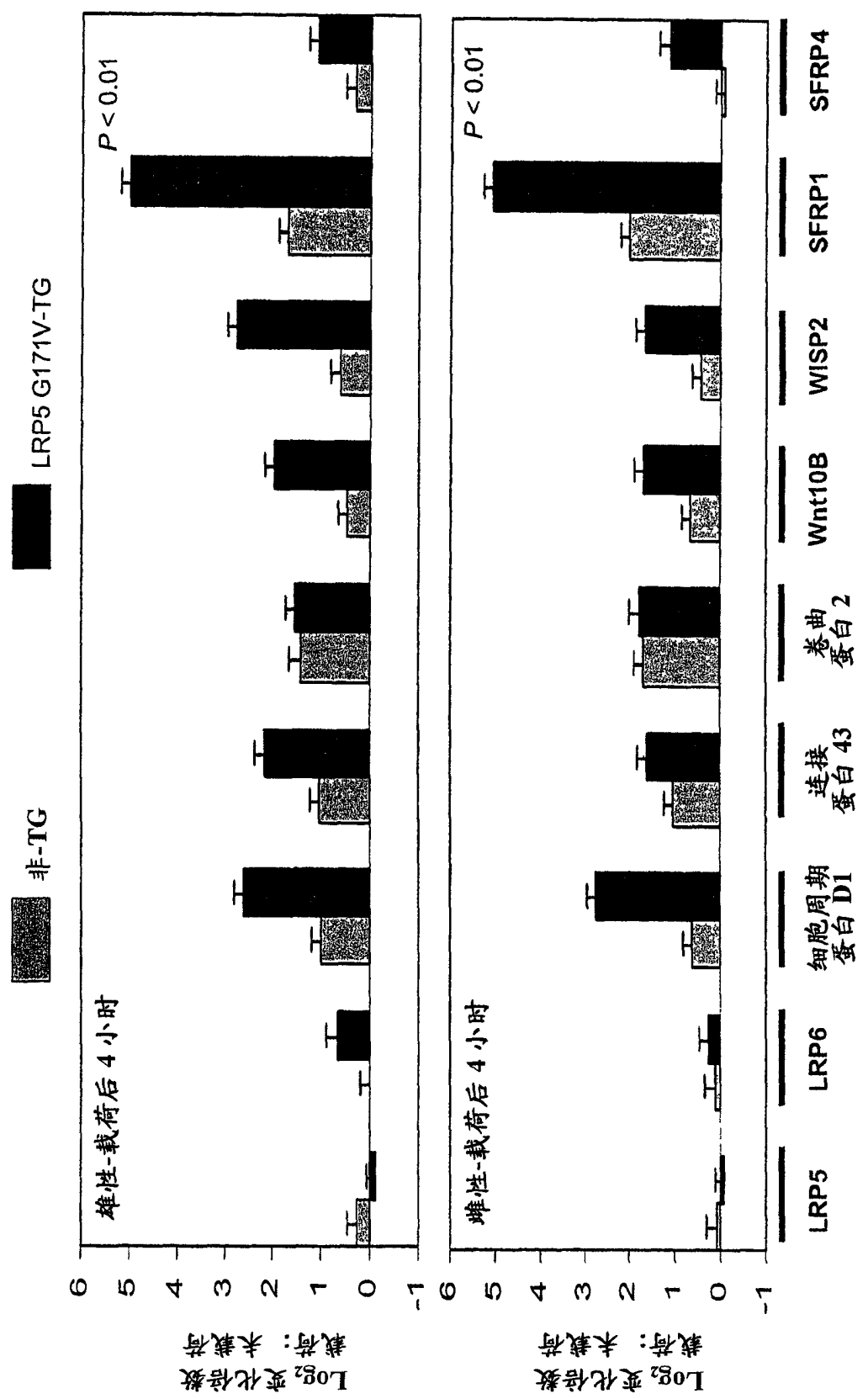


图 13A

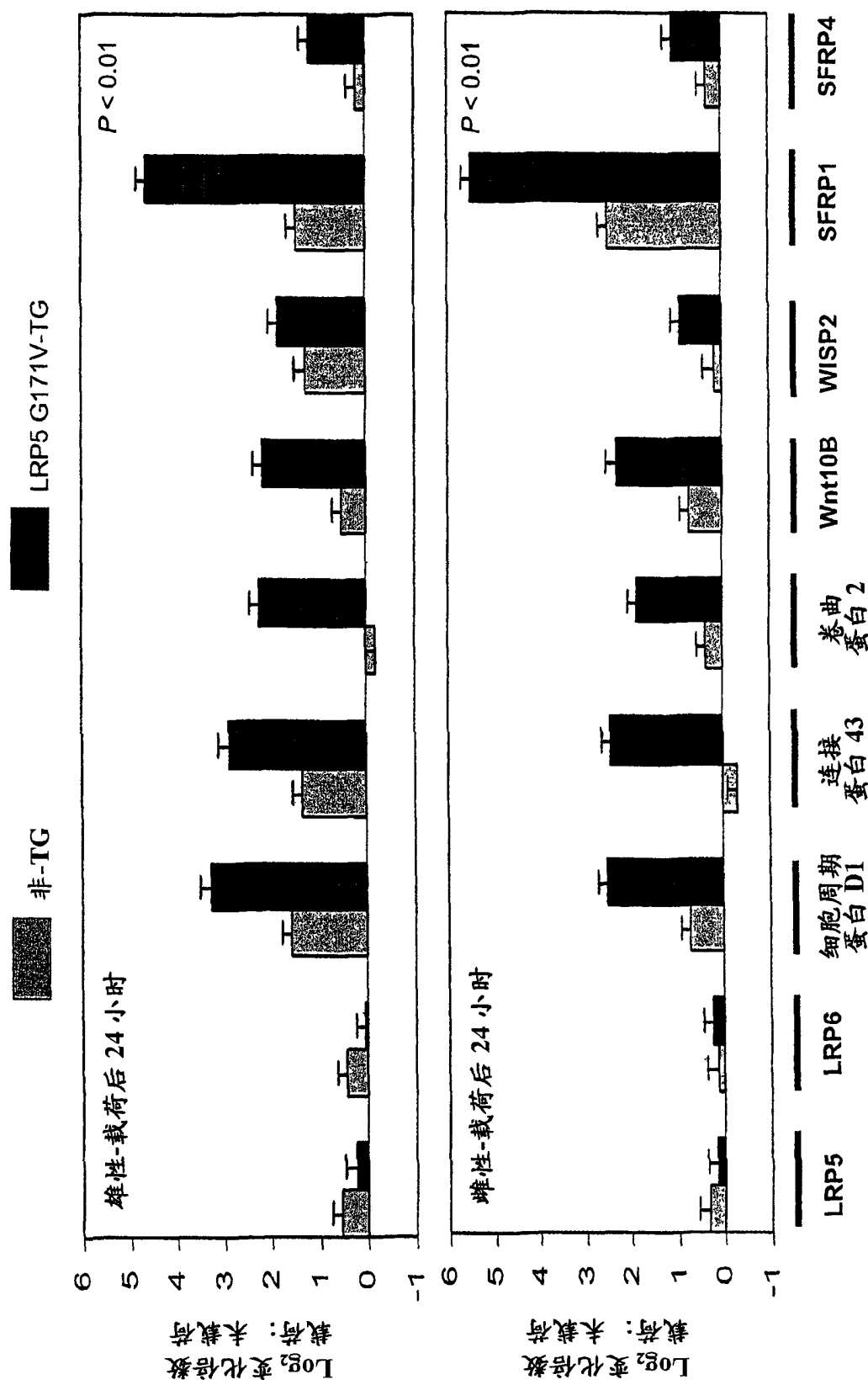


图 13B

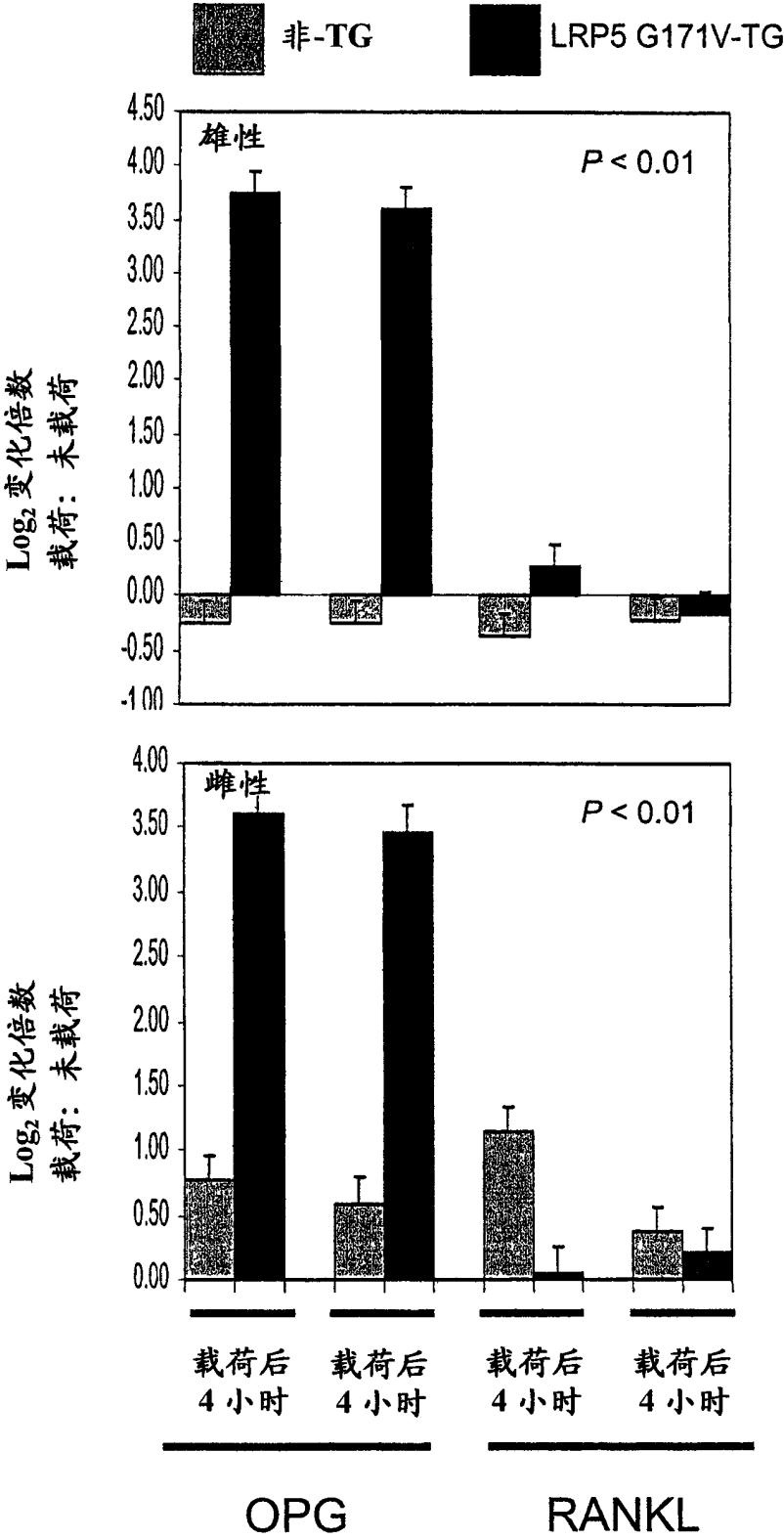
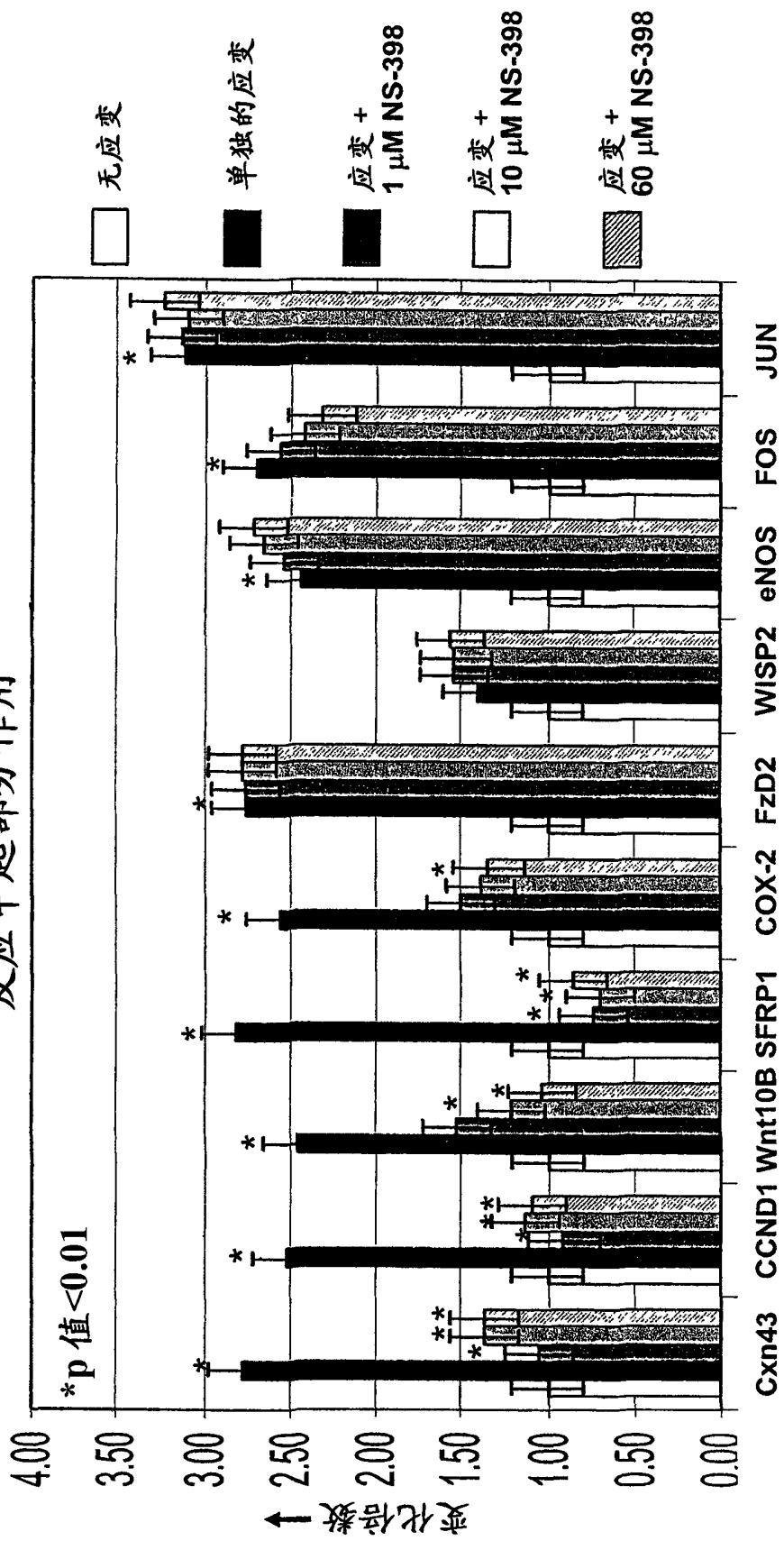


图 14

COX-2 在载荷诱导的 Wnt/ β -联蛋白
反应中起作用



应变: 等于 3,400 μ E 应变/5 小时的载荷

图 15

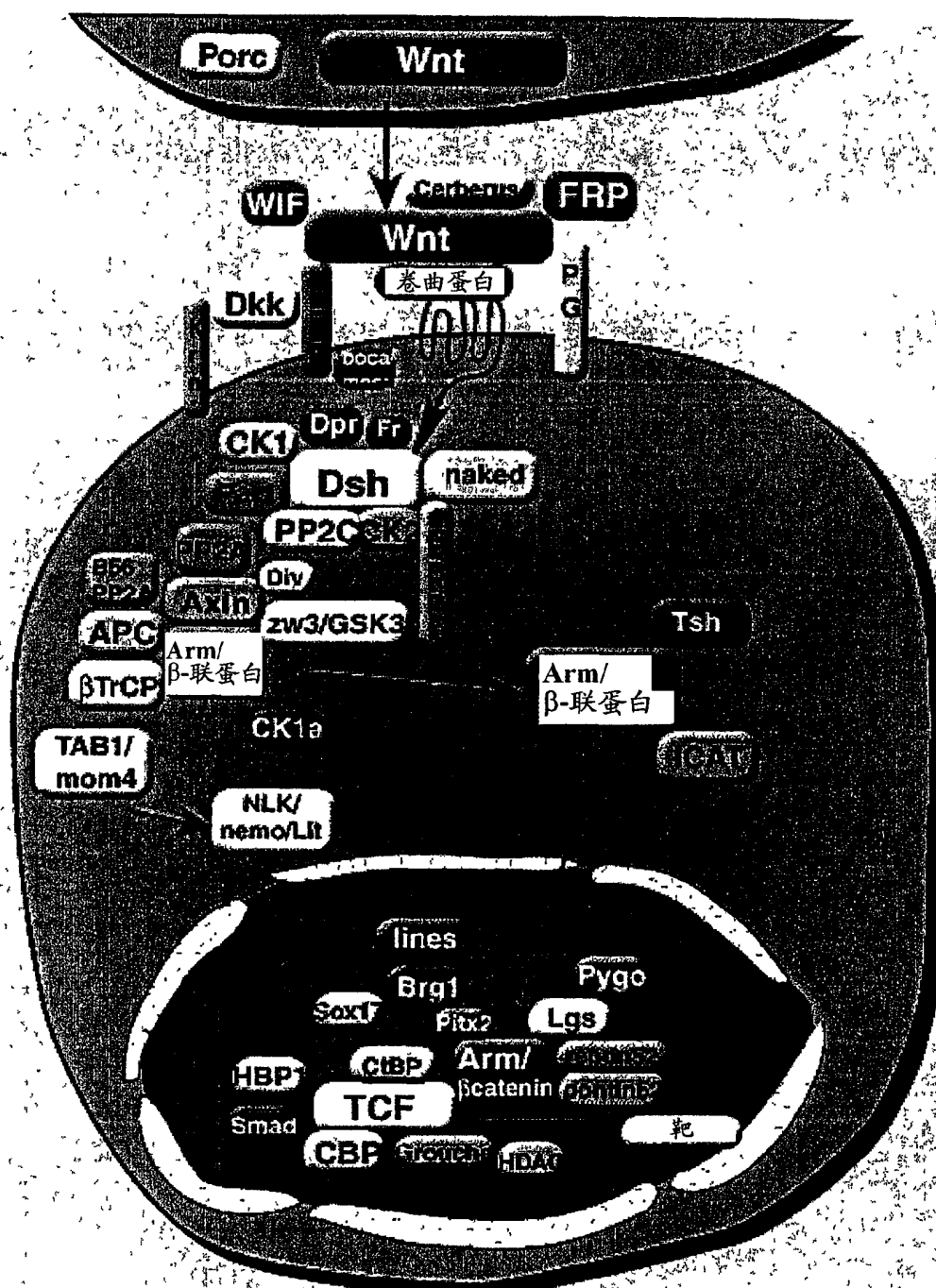


图 16

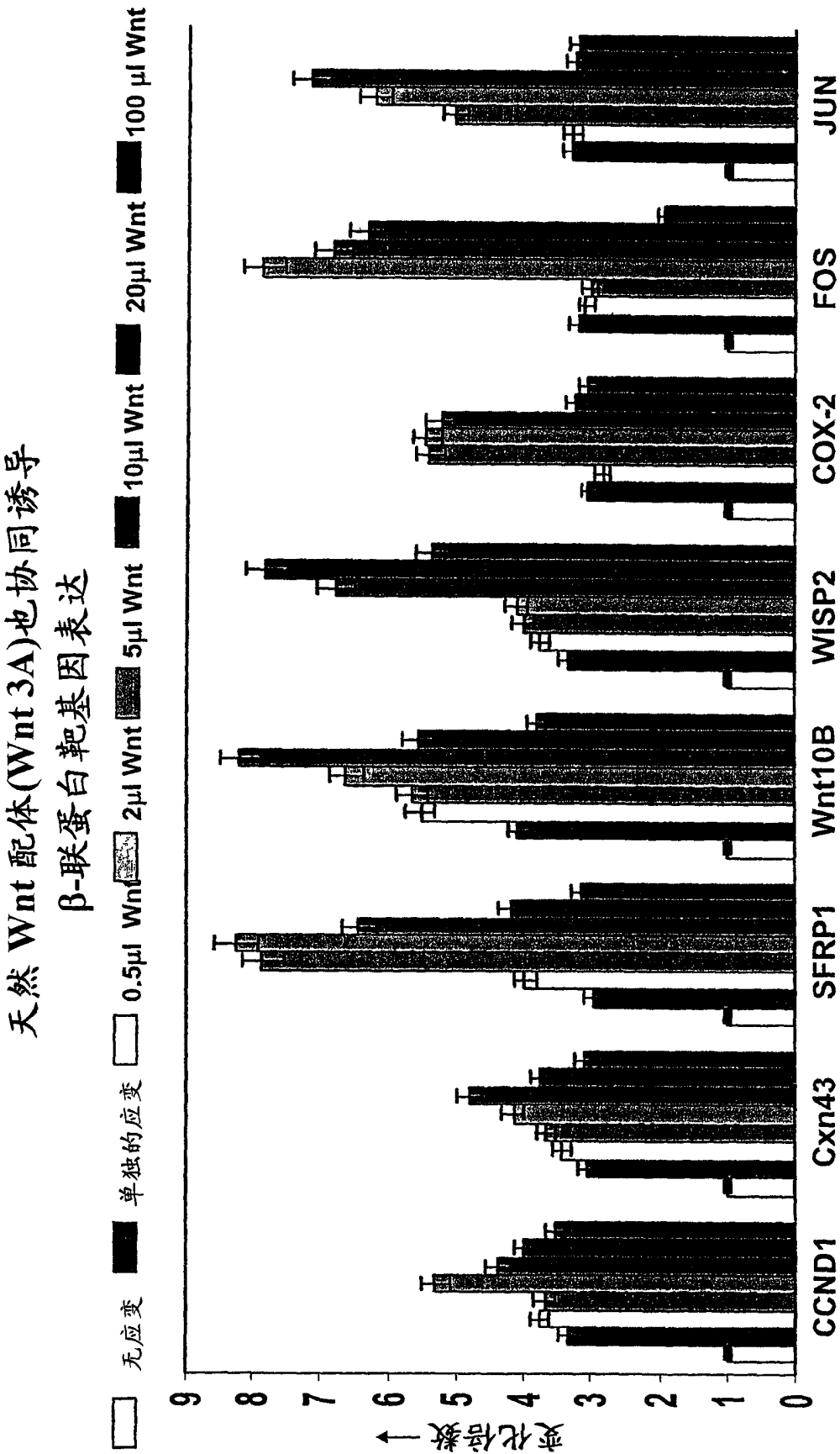


图 17

应变: 等于 3,400 μE 应变/5 小时的载荷