

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101854924 A

(43) 申请公布日 2010. 10. 06

(21) 申请号 200880114730. 7

A61P 35/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2008. 11. 05

(30) 优先权数据

60/985, 454 2007. 11. 05 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 05. 05

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2008/064987 2008. 11. 05

(87) PCT申请的公布数据

W02009/059994 EN 2009. 05. 14

(71) 申请人 诺瓦提斯公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 A·张 F·从 S-M·黄

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

A61K 31/00 (2006. 01)

权利要求书 3 页 说明书 49 页 附图 16 页

(54) 发明名称

测量 WNT 活化以及治疗 WNT 相关癌症的方法
和组合物

(57) 摘要

本发明描述了通过给予 Axin 稳定物来调控或调节 (例如促进或抑制) Wnt 信号的方法。本发明也描述了使用在此所述的 Axin 稳定物来治疗、诊断、预防和 / 或改善 Wnt 信号相关病症的方法。

1. 一种治疗、预防或改善 Wnt 信号相关的病症的方法,包括向有需要的受试者给予有效量的调节端锚聚合酶 (TNKS) 催化活性的试剂。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述试剂降低或废除端锚聚合酶 (TNKS) 的催化活性。
3. 权利要求 2 的方法,其中所述试剂是抑制性核酸。
4. 权利要求 2 的方法,其中所述试剂是融合蛋白。
5. 权利要求 2 的方法,其中所述试剂是本发明的化合物。
6. 权利要求 2 的方法,其中所述 Wnt 信号相关的病症与 Wnt 信号的异常上调相关联。
7. 权利要求 6 的方法,其中所述 Wnt 信号相关的病症是癌症。
8. 权利要求 7 的方法,其中所述 Wnt 信号相关的病症是结肠癌。
9. 权利要求 6 的方法,其中所述 Wnt 信号相关的病症是骨关节炎。
10. 权利要求 6 的方法,其中所述 Wnt 信号相关的病症是多囊肾疾病。
11. 权利要求 1 的方法,其中所述试剂增强端锚聚合酶 (TNKS) 的催化活性。
12. 权利要求 11 的方法,其中所述 Wnt 信号相关的病症与 Wnt 信号的异常下调相关联。
13. 权利要求 12 的方法,其中所述 Wnt 信号相关的病症是骨质疏松症。
14. 权利要求 12 的方法,其中所述 Wnt 信号相关的病症是肥胖或糖尿病。
15. 权利要求 12 的方法,其中所述 Wnt 信号相关的病症是神经退行性疾病。
16. 一种通过给予能够调节端锚聚合酶 (TNKS) 催化活性的试剂来调节 Wnt 途径信号转导的方法。
17. 权利要求 16 的方法,其中所述试剂通过降低或废除端锚聚合酶 (TNKS) 催化活性来抑制 Wnt 途径信号。
18. 权利要求 17 的方法,其中所述试剂是抑制性核酸。
19. 权利要求 17 的方法,其中所述试剂是融合蛋白。
20. 权利要求 17 的方法,其中所述试剂是本发明的化合物。
21. 一种鉴定能够调节 Wnt 途径信号转导的试剂的方法,包括:
 - a) 在允许 Wnt 信号的条件下,检测试剂存在和不存在时,接触一种生物样品,在该生物样品中 Wnt 信号途径是活跃的,以及在该生物样品中可以测量 Axin 蛋白质水平或稳定性; 和
 - b) 在所述检测试剂存在和不存在下,测量 Axin 蛋白质水平或稳定性,其中 (i) 在存在该检测试剂时,Axin 蛋白质水平或稳定性相对于不存在该检测试剂的减少,将该检测试剂鉴定为 Wnt 途径信号转导的激动剂,和其中 (ii) 在存在该检测试剂时,Axin 蛋白质水平或稳定性相对于不存在该检测试剂的增加,将该检测试剂鉴定为 Wnt 途径信号转导的拮抗剂。
22. 权利要求 21 的方法,其中通过总 β -连环蛋白水平的减少、磷酸化 β -连环蛋白水平的增加、Axin 蛋白水平的增加,或 Axin-GSK3 复合体形成的增加来测量 Axin 蛋白水平或稳定性的增加。
23. 权利要求 21 的方法,其中通过总 β -连环蛋白水平的增加、磷酸化 β -连环蛋白水平的减少、Axin 蛋白水平的减少,或 Axin-GSK3 复合体形成的减少来测量 Axin 蛋白水平或稳定性的减少。
24. 权利要求 21 的方法,其中所述试剂是小分子。

25. 权利要求 21 的方法,其中所述试剂是抑制性核酸。

26. 权利要求 21 的方法,其中所述试剂是融合蛋白。

27. 一种鉴定用于治疗 Wnt 信号相关病症的试剂的方法,包括:

a) 在允许 Wnt 信号的条件下,检测试剂存在和不存在时,接触一种生物样品,在该生物样品中,Wnt 信号途径是活跃的,以及在该生物样品中可以测量 Axin 蛋白水平或稳定性; 和

b) 在所述检测试剂存在和不存在下,测量 Axin 蛋白水平或稳定性,

其中 (i) 在存在该检测试剂时,Axin 蛋白水平或稳定性相对于不存在该检测试剂的减少,将该检测试剂鉴定为用于治疗与 Wnt 信号异常下调相关的病症,和其中 (ii) 在存在该检测试剂时,Axin 蛋白水平或稳定性相对于不存在该检测试剂的增加,将该检测试剂鉴定为用于治疗与 Wnt 信号异常上调相关的病症。

28. 权利要求 27 的方法,其中通过总 β -连环蛋白水平的减少、磷酸化 β -连环蛋白水平的增加、Axin 蛋白水平的增加,或 Axin-GSK3 复合体形成的增加来测量 Axin 蛋白水平或稳定性的增加。

29. 权利要求 27 的方法,其中通过总 β -连环蛋白水平的增加、磷酸化 β -连环蛋白水平的减少、Axin 蛋白水平的减少,或 Axin-GSK3 复合体形成的减少来测量 Axin 蛋白水平或稳定性的减少。

30. 权利要求 27 的方法,其中所述试剂是小分子。

31. 权利要求 27 的方法,其中所述试剂是抑制性核酸。

32. 权利要求 27 的方法,其中所述试剂是融合蛋白。

33. 一种鉴定能够抑制端锚聚合酶 (TNKS) 的催化活性的试剂的方法,包括:

a) 在允许 Wnt 信号的条件下,检测试剂存在和不存在时,接触一种生物样品,在该生物样品中,Wnt 信号途径是活跃的,以及在该生物样品中可以测量 Axin 蛋白水平或稳定性; 和

b) 在所述检测试剂存在和不存在下,测量 Axin 蛋白水平或稳定性,

其中 (i) 在存在该检测试剂时,Axin 蛋白水平或稳定性相对于不存在该检测试剂的减少,将该检测试剂鉴定为 TNKS 激动剂,和其中 (ii) 在存在该检测试剂时,Axin 蛋白水平或稳定性相对于不存在该检测试剂的增加,将该检测试剂鉴定为 TNKS 抑制剂。

34. 权利要求 33 的方法,其中通过总 β -连环蛋白水平的减少、磷酸化 β -连环蛋白水平的增加、Axin 蛋白水平的增加,或 Axin-GSK3 复合体形成的增加来测量 Axin 蛋白水平或稳定性的增加。

35. 权利要求 33 的方法,其中通过总 β -连环蛋白水平的增加、磷酸化 β -连环蛋白水平的减少、Axin 蛋白水平的减少,或 Axin-GSK3 复合体形成的减少来测量 Axin 蛋白水平或稳定性的减少。

36. 权利要求 33 的方法,其中所述试剂是小分子。

37. 权利要求 33 的方法,其中所述试剂是抑制性核酸。

38. 权利要求 33 的方法,其中所述试剂是融合蛋白。

39. 一种鉴定用于治疗 Wnt 信号相关病症的试剂的方法,包括将 Wnt 信号途径在其中活跃的细胞与检测试剂相接触,并且检测 Axin 蛋白水平或稳定性的改变。

40. 权利要求 39 的方法,其中通过总 β -连环蛋白水平的减少、磷酸化 β -连环蛋白水平的增加、Axin 蛋白水平的增加,或 Axin-GSK3 复合体形成的增加来测量 Axin 蛋白水平或稳定性的增加。

41. 权利要求 39 的方法,其中通过总 β -连环蛋白水平的增加、磷酸化 β -连环蛋白水平的减少、Axin 蛋白水平的减少,或 Axin-GSK3 复合体形成的减少来测量 Axin 蛋白水平或稳定性的减少。

42. 一种抑制肿瘤细胞生长的方法,包括给予有需要的受试者有效量的降低或废除端锚聚合酶 (TNKS) 催化活性的试剂。

43. 权利要求 42 的方法,其中所述试剂是抑制性核酸。

44. 权利要求 42 的方法,其中所述试剂是融合蛋白。

45. 权利要求 42 的方法,其中所述试剂是本发明的化合物。

46. 一种诱导肿瘤细胞凋亡的方法,包括给予有需要的受试者有效量的降低或废除端锚聚合酶 (TNKS) 催化活性的试剂。

47. 权利要求 46 的方法,其中所述试剂是抑制性核酸。

48. 权利要求 46 的方法,其中所述试剂是融合蛋白。

49. 权利要求 46 的方法,其中所述试剂是本发明的化合物。

测量 WNT 活化以及治疗 WNT 相关癌症的方法和组合物

[0001] 发明背景

[0002] Wnt 基因家族编码一大类与 Int1/Wnt1 原癌基因和果蝇无翅 (“Wg”, 果蝇 Wnt1 同源物) 相关的分泌蛋白 (Cadigan 等人, (1997) *Genes&Development* 11 :3286–3305)。Wnt 在多种组织和器官中表达并且是许多发育过程所需的, 包括果蝇分节; 秀丽线虫的内胚层发育; 以及哺乳动物的肢翼 (limb) 极性的建立、神经嵴分化、肾形态发生、性别决定和脑发育 (Parr 等人, (1994) *Curr. Opinion Genetics&Devel.* 4 :523–528)。Wnt 途径是动物发育 (胚胎发生期间和成熟生物体中) 的主要调控物 (Eastman 等人, (1999) *Curr Opin Cell Biol* 11 :233–240; Peifer 等人, (2000) *Science* 287 :1606–1609)。

[0003] Wnt 信号通过 Frizzled (“Fz”) 家族的七跨膜结构域受体来转导 (Bhanot 等人, (1996) *Nature* 382 :225–230)。Wnt 配体结合 Fzd, 并且如此做, 使得胞质蛋白蓬乱蛋白 (Dishevelled) (在人和鼠中, Dvl-1, 2 和 3) 活化 (Boutros 等人, (1999) *Mech Dev* 83 :27–37) 以及使 LRP5/6 磷酸化。由此产生阻止 Armadillo/β - 连环蛋白磷酸化和降解的信号, 这接下来造成 β - 连环蛋白的稳定 (Perrimon (1994) *Cell* 76 :781–784)。这一稳定由 Dvl 与轴蛋白 (axin) 的关联所引起 (Zeng 等人, (1997) *Cell* 90 :181–192), 该轴蛋白是使得多种蛋白包括 GSK3、APC、CK1 和 β - 连环蛋白在一起以形成 β - 连环蛋白破坏复合体的支架蛋白。

[0004] 糖原合成酶激酶 3 (GSK3, 在果蝇中为 shaggy), 肿瘤遏制物基因产物 APC (结肠腺瘤样息肉) (Gumbiner (1997) *Curr. Biol.* 7 :R443–436), 和轴蛋白 (Axin) 都是 Wnt 途径的负调控物。在没有 Wnt 配体时, 这些蛋白形成复合体并且促进 β - 连环蛋白的磷酸化和降解, 而 Wnt 信号传导使得该复合体失活并阻止 β - 连环蛋白降解。结果是, 稳定的 β - 连环蛋白转运到核中, 在此处 β - 连环蛋白结合 TCF (T 细胞因子) 转录因子 (也称作淋巴增强子结合因子 -1 (LEF1)) 并用作 TCF/LEF- 诱导的转录的辅活化子 (Bienz 等人, (2000) *Cell* 103 :311–320; Polakis 等人, (2000) *Genes Dev* 14 :1837–1851)。

[0005] 通过稳定 β - 连环蛋白, 异常 Wnt 途径活化对多种结直肠癌的肿瘤发生起中枢作用。估计 80% 的结直肠癌 (CRC) 带有肿瘤抑制物 APC 的失活突变, 这使得 Wnt 信号不受打断。此外, 存在越来越多的证据表明 Wnt - 途径活化可涉及黑素瘤、乳腺癌、肝癌、肺癌和胃癌。在 Wnt、正常发育和癌症之间存在长期公认的联系, 而将 c-Myc 原癌基因鉴定为 Wnt 信号的靶标进一步确立了此联系 (He 等人, (1998) *Science* 281 :1509–3512)。

[0006] 此外, 其他紊乱与异常 Wnt 信号相关, 包括但不限于骨质疏松症、骨关节炎、多囊肾疾病、糖尿病、精神分裂症、血管疾病、心脏疾病、非致癌的增生性疾病以及神经退行性疾病如阿尔茨海默氏病。

[0007] 当前对于产生用于 Wnt 信号相关的紊乱如结直肠癌的疗法的范例依赖于靶向 β -cat 或 β -cat 下游的 Wnt 途径组分。然而, 最近的研究表明由 Wnt 受体 Frizzled 和 LRP5/6 介导的自分泌 Wnt 信号可能对调控肿瘤生长和存活起关键作用。需要通过沿着其它关键连接来调节 Wnt 途径的活化而抑制 Wnt 信号转导活性, 从而治疗、诊断、预防和 / 或减轻 Wnt 信号相关紊乱的试剂和方法。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明提供了例如通过使用调节蛋白稳定性和 / 或 Axin 水平的试剂, 例如小分子 (包括如本发明的化合物)、抑制性核酸、融合蛋白等来诊断 Wnt 信号相关的紊乱 (例如结直肠癌)、减轻其症状、保护免于该紊乱以及治疗该紊乱的方法。在一些实施方式中, 所述试剂例如通过调节 TNKS 催化活性来调节端锚聚合酶 (Tankyrase, TNKS)。

[0010] 所述方法可包括向有需要的受试者给予有效量的 Wnt 途径信号转导的调节物, 例如 Axin 稳定物和 / 或 TNKS 调节物 (例如小分子 (包括如本发明的化合物)、抑制性核酸、融合蛋白或它们的任何组合), 以及可药用的载体。

[0011] 所述方法可以在细胞水平使用, 例如来治疗具有 Wnt 受体的上皮细胞。例如, 本发明的方法可以用于治疗或预防基底细胞癌或其他 Wnt 信号相关的紊乱 (例如表征为异常细胞增殖的那些)。本发明的方法也可以通过抑制或促进 (agonize) 对 Wnt 信号转导的抑制而用于预防细胞增殖, 异常或者其他。所述方法也可以用于人类和动物受试者。

[0012] 本发明也提供了例如通过使用 Axin 稳定物, 例如通过使用 TNKS 调节物 (例如小分子、抑制性核酸、融合蛋白等) 来调节 Wnt 途径信号转导的方法。在一个实施方式中, 本发明的方法包括例如通过使用 Axin 稳定物, 例如通过使用 TNKS 调节物 (例如小分子、抑制性核酸、融合蛋白等) 来抑制或促进对 Wnt 途径信号转导的抑制。

[0013] 所述抑制或促进对 Wnt 途径信号转导抑制的方法可以用于例如对许多的细胞、组织和器官, 包括正常细胞、组织和器官的修复和 / 或功能性能的调控。非限制性实例包括对神经组织、骨和软骨形成和修复的调控, 以及对精子发生的调控, 对平滑肌细胞的调控, 对肺、肝和其他由原始消化管产生的器官的调控, 对造血功能的调控, 对皮肤和毛发生长的调控等。本发明的方法可以在体外或体内进行。

[0014] 本发明也提供了鉴定和检测 Wnt 途径信号转导的激动剂和拮抗剂的方法, 以及鉴定和检测 Wnt 途径成员 (例如 Axin, TNKS) 的激动剂和拮抗剂的方法。本发明发现通过 Axin 蛋白水平的稳定以及升高、和通过 TNKS 的抑制对 Wnt 途径信号转导的抑制, 对于在体外或体内鉴定将对这一稳定性, 以及由此 Wnt 途径信号进行增强或干扰的试剂是有用的。本发明的发现因而对于发现可以抑制 TNKS 催化活性, 以及因而可以用于治疗疾病相关的异常和病理 Wnt 信号的试剂是有用的, 该疾病相关的异常和病理 Wnt 信号可以产生自例如 Axin 不能稳定和不能形成其 β -连环蛋白破坏复合体 (和产生的 Wnt 途径信号转导的调节)。

[0015] 在一个实施方案中, 鉴定能够调节 Wnt 途径信号转导的试剂的方法包括 :a) 在允许 Wnt 信号的条件下, 检测试剂存在和不存在时, 接触一种生物样品, 在该生物样品中 Wnt 信号途径是活跃的, 以及在该生物样品中可以测量 TNKS 蛋白质水平; 和 b) 在所述检测试剂存在和不存在下, 测量 TNKS 蛋白质的水平, 其中 (i) 在存在该检测试剂时, TNKS 蛋白质水平或稳定性相对于不存在该检测试剂的减少, 将该检测试剂鉴定为 Wnt 途径信号转导的拮抗剂, 和其中 (ii) 在存在该检测试剂时, TNKS 蛋白质水平或稳定性相对于不存在该检测试剂的增加, 将该检测试剂鉴定为 Wnt 途径信号转导的激动剂。

[0016] 在一个实施方案中, 该试剂可以是小分子。在另一实施方案中, 该试剂可以是抑制性核酸 (例如抗 -TNKS1 或 -TNKS2 siRNA)。在另一实施方案中, 该试剂可以是融合蛋白 (例如抗 TNKS 的抑制性融合蛋白)。

[0017] 本发明包括筛选用于治疗 Wnt 信号相关的紊乱 (例如结直肠癌) 的化合物的方

法,包括将表现出 Wnt 途径信号转导的细胞与检测试剂接触,和检测 TNKS 蛋白质水平,或 Axin 蛋白质水平和 / 或 Axin 稳定性的改变。

[0018] 在一种实施方案中,鉴定用于治疗 Wnt 信号相关的紊乱的试剂的方法包括 :a) 在允许 Wnt 信号的条件下,检测试剂存在和不存在时,接触一种生物样品,在该生物样品中 Wnt 信号途径是活跃的,以及在该生物样品中可以测量 TNKS 蛋白质水平或稳定性;和 b) 在所述检测试剂存在和不存在下,测量 TNKS 蛋白质的水平,其中 (i) 在存在该检测试剂时,TNKS 蛋白质水平或稳定性相对于不存在该检测试剂的减少,将该检测试剂鉴定为对治疗与 Wnt 信号异常上调相关的紊乱是有用的,和其中 (ii) 在存在该检测试剂时,TNKS 蛋白质水平或稳定性相对于不存在该检测试剂的增加,将该检测试剂鉴定为可用于治疗与 Wnt 信号异常下调相关的紊乱。

[0019] 在一个实施方案中,该试剂可以是小分子。在另一实施方案中,该试剂可以是抑制性核酸(例如抗-TNKS1 或 -TNKS2 siRNA)。在另一实施方案中,该试剂可以是融合蛋白(例如抗 TNKS 的抑制性融合蛋白)。

[0020] 在一个实施方案中,鉴定用于治疗 Wnt 信号相关紊乱的试剂的方法包括将一种细胞与检测试剂接触,并检测 TNKS 蛋白质水平或稳定性的改变,在该细胞中,Wnt 信号途径是活跃的。

[0021] 在本发明的筛选方法中,通过总 β -连环蛋白的减少、磷酸化 β -连环蛋白水平的增加、Axin 蛋白水平的增加、或 Axin-GSK3 复合体形成的增加来测量 Axin 蛋白质水平或稳定性的增加。通过总 β -连环蛋白的增加、磷酸化 β -连环蛋白水平的减少、Axin 蛋白水平的减少、或 Axin-GSK3 复合体形成的减少来测量 Axin 蛋白质水平或稳定性的减少。

[0022] 本发明的其他筛选方法包括鉴定能够调节 Wnt 途径信号转导的试剂的方法,以及鉴定能够抑制端锚聚合酶(TNKS)的催化活性的试剂的方法。所述试剂可以至少是小分子、抑制性核酸(例如抗-TNKS1 或 -TNKS2 siRNA)、或融合蛋白(例如抗 TNKS 的抑制性融合蛋白)。

[0023] 本发明包括药物制剂,包括 Wnt 拮抗剂(例如 Axin 稳定物和 / 或 TNKS 拮抗剂)作为活性成分,如在此所述,以足以 (i) 在体内抑制细胞增殖或 Wnt 异常表达的其他生物学后果(例如,在表征为组成型 Wnt 信号的癌症);和 (ii) 诊断、改善 Wnt 信号相关紊乱的症状、保护免于该紊乱或治疗该紊乱的量来配制该制剂。所述制剂可以例如在药学可接受载体中包括根据本发明任一实施方案的化合物、抑制性核酸或融合蛋白,或其任何组合。

[0024] 在另一实施方案中,提供了抑制肿瘤细胞生长的方法,其包括向有需要的受试者给予有效量的 Wnt 途径信号转导的调节物,例如 Axin 稳定物和 / 或 TNKS 拮抗剂(例如小分子(包括如本发明的化合物)、抑制性核酸、融合蛋白等或它们的任何组合),以及可药用的载体。

[0025] 还提供了诱导肿瘤细胞凋亡的方法,其包括向有需要的受试者给予有效量的 Wnt 途径信号转导的调节物,例如 Axin 稳定物和 / 或 TNKS 拮抗剂(例如小分子(包括如本发明的化合物)、抑制性核酸、融合蛋白等或它们的任何组合),以及可药用的载体。

[0026] 本发明包括鉴定或预测为 Wnt 信号相关紊乱(例如,结直肠癌)所苦的受试者受益于包括“TNKS 抑制剂”、“Axin 稳定物”等(包括如本发明的化合物、或能够抑制 TNKS 催化活性的融合蛋白或抑制性核苷酸)的治疗方案的倾向或可能性的方法。

[0027] 附图简要说明

[0028] 图 1. XAV939 通过增加 Axin 蛋白水平来抑制 Wnt / β - 连环蛋白信号途径。

[0029] 图 1A. XAV939 特异抑制 HEK293 细胞中的 STF 活性。HEK293 STF、CRE、NF κ B 和 CAGA12 报告子细胞系分别用 Wnt3A 条件培养基、Forskolin、TNF α 和 TGF β 活化并用 12- 个点稀释的 XAV939 或 LDW643(用于 XAV939 的化合物的非活性类似物, 和阴性对照) 处理。对于每种化合物稀释的相应的报告子活性归一化至 DMSO 并以在 DMSO 中的报告子活性百分数来表示。

[0030] 图 1B. XAV939 降低 Wnt3A 稳定的 β - 连环蛋白水平。在存在 DMSO 或 1 μ M XAV939 下, 用 Wnt3A 条件培养基刺激 HEK293 细胞所指示长的时间。分馏细胞裂解物并对胞质 β - 连环蛋白进行免疫印迹。

[0031] 图 1C. XAV939 抑制 APC- 缺陷型 SW480 细胞中的 STF 活性。用 12- 个点稀释的 XAV939 或 LDW643 处理 SW480-STF 和 SW480-STF-TCF3VP16 细胞并检测荧光素酶活性。TCF3VP16 融合蛋白的过表达极大地绕过了 STF 活性对 β - 连环蛋白的需要(数据未示出)。与 b 类似, 对于每一化合物稀释点的相应报告子活性, 归一化为 DMSO 的报告子活性并以百分数表示。

[0032] 图 1D. XAV939 降低 β - 连环蛋白的丰度并增加 Axin 和磷酸化 - β - 连环蛋白的丰度。用 1 μ M XAV939 或 LDW643 过夜处理 SW480 细胞, 分馏胞质蛋白, 并用指示的抗体进行免疫印迹。

[0033] 图 1E. XAV939 对 β - 连环蛋白的作用是 Axin 依赖的。在存在或不存在 3 μ M XAV939 下, 处理用 Axin1 和 Axin2siRNA 两者或对照 pGL2 siRNA 转染的 SW480 细胞。然后分离胞质裂解物并用指示的抗体进行免疫印迹。

[0034] 图 2. 细胞效力靶标的鉴定。

[0035] 图 2A. 用 1nM 至 100 μ M 以 10 倍增幅的活性化合物 XAV939 和非活性类似物 LDW643 的升高的剂量, 进行来自剂量反应化合物竞争实验的裂解物中 TNKS1/2、PARP1、PARP2 的免疫印迹分析。

[0036] 图 2B. XAV939 以较高亲和性直接结合 TNKS1 和 TNKS2 的 PARP 结构域。用缀合了 Cy5 的 XAV939 孵育 GST-TNKS1 和 TNKS2。输出原始 mP[1000x (S-G*P/S+G*P)] 数据并用单位点总结合饱和算法分析。

[0037] 图 3. 端锚聚合酶调节 Axin 蛋白水平

[0038] 图 3A, B. 通过增加 Axin 蛋白水平和降低 β - 连环蛋白蛋白水平同时消耗 TNKS1 和 TNKS2 的表型模拟 XAV939。以所指示的组合用单独抗 PARP1、PARP2、TNKS1 和 TNKS2 的 siRNA 转染 SW480 细胞。对于 TNKS1 和 TNKS2, 在实验中使用由独特的靶序列产生的两个独立的 siRNA, 标记为 A 和 B。转染后 48 小时收获胞质蛋白并通过所指示的抗体进行分析。

[0039] 图 3C. TNKS1 和 TNKS2 的消耗增加 Axin1 的蛋白水平并阻断 Wnt3a- 诱导的 β - 连环蛋白积累。以所指示的组合用抗 TNKS1 或 TNKS2 的单个 siRNA 转染 HEK293 细胞。上图, 在转染后 48 小时用免疫印迹分析 Axin1 的表达。下图, 转染后 48 小时用 Wnt3A 条件培养基刺激细胞 6 小时。然后分离胞质 β - 连环蛋白并通过免疫印迹测量。

[0040] 图 3D. TNKS1 和 TNKS2 的消耗特异地抑制 Wnt 报告子。HEK293 CRE 和 STF 报告子细胞系用所指示的 siRNA 转染, 分别用 Forskolin 和 Wnt 3A 条件培养基刺激, 并测量荧

光素酶活性。用 pGL2 对照 siRNA 使数据归一化并以抑制百分数展示。

[0041] 图 3E. TNKS 的击倒 (Knockdown) 增加了果蝇 S2 细胞中 Axin 的蛋白水平。用对照 dsRNA (白) 或抗果蝇 TNKS 的 dsRNA 来孵育稳定表达 DAxin-3xHA 的 S2 细胞。通过免疫印迹 (左图) 和 qPCR (右图) 检测 DAxin-3xHA 的蛋白和 mRNA 水平。

[0042] 图 3F. 击倒 TNKS 特异抑制果蝇 S2 细胞中的 Wnt 报告子。S2 用所指示的 dsRNA 处理, 用 Wnt (LEF-Luc)、BMP (BRE-Luc) 和 JAK/SAT (Draf-Luc) 报告子瞬时转染, 并用适当的配体 (无翅条件培养基, BMP2, 和 UPD 条件培养基) 进行刺激, 以及检测荧光素酶活性。

[0043] 图 3G. 野生型而非无催化活性的 TNKS2 拯救 TNKS1/2 siRNA 诱导的 Axin1 的积累。用抗 TNKS1 和 TNKS2 的 siRNA 转染稳定表达诱导型 siRNA 抗性和 Flag- 标记的野生型 (WT) 或无催化活性的 (M1054V) HEK293 细胞。在强力霉素 (DOX) 诱导的外源性 TNKS2 表达后, 收获细胞裂解物并通过免疫印迹进行分析。

[0044] 图 3H. XAV939 抑制 TNKS 的自发的聚 ADP- 核糖化 (parsylation)。将 1uM 蛋白 (GST-TNKS2-SAM-PARP1) 与在 DMSO 中的 5uM 生物素 -NAD 或 2uM 的 XAV939 或 LDW643 在 30°C 混合。通过 SDS-PAGE 和 western 印迹分析样品。

[0045] 图 4. 端锚聚合酶与 Axin 物理地且功能上地相互作用

[0046] 图 4A. 内源性 Axin2 和 Tnks 的共免疫沉淀。用对照 siRNA 或 Axin2siRNA 转染 SW480 细胞, 并且用抗 -Axin2 抗体或 IgG 使细胞裂解物免疫沉淀。通过 SDS-PAGE 分离免疫沉淀物并用所指示的抗体进行印迹。

[0047] 图 4B. 使用酵母双杂交检测法对 Axin1 的 TNKS 结合结构域定位。左图, 示意性地示出在酵母双杂交检测中用于结合 Tnks 的 Axin 蛋白片段。右图, 在酵母双杂交检测中 Axin1 蛋白片段对 TNKS 结合强度的表格概述 (+ 强结合, +/- 弱结合, - 无结合)。使用已知的 Axin1 结合物 GSK3 β 作为对照。注意 N88 片段保留部分的自活化活性。

[0048] 图 4C. 将过表达 Flag-TNKS1 的 HEK293 细胞的细胞裂解物用所指示的 GST 融合蛋白孵育并在免疫印迹前沉淀并用所指示抗体进行分析。GST-AxinN 由与 GST 融合的 Axin1 的氨基端的 87 个氨基酸所组成。

[0049] 图 4D. Axin1 蛋白和 TNKS1 的共免疫沉淀。用所指示的构建体转染的 HEK293 细胞的细胞裂解物用抗 -Flag 抗体进行免疫沉淀并通过免疫印迹分析。

[0050] 图 4E. TNKS 结合结构域是 XAV939- 诱导的 Axin1 蛋白积累所必需的。通过逆转录病毒感染来建立稳定表达所指示的 GFP-Axin 融合构建体的 SW480 细胞系, 并用 XAV939 过夜处理。收获总细胞裂解物并通过免疫印迹进行分析。

[0051] 图 4F. Axin1 的氨基端片段的过表达导致内源性 Axin1 的积累。产生了表达诱导型 GFP-Axin1N(氨基酸 1-87) 的 HEK293 细胞系。通过用强力霉素 (DOX) 处理细胞 24 小时, 诱导 GFP-Axin1N 的表达。收获总细胞裂解物并通过免疫印迹进行分析。

[0052] 图 4G. 在酵母双杂交检测法中检测多种 TNKS1 片段对 Axin1 的结合以及当它们在 HEK293 细胞中过表达时对于 STF 报告子的影响。左图, 示意性的 TNKS1 构建体和它们结合 Axin1 能力的概述。在中间栏 “ β -Gal Assay” 下, 示出了这些构建体对于 Axin1 的 Axin1 结合活性。右图, TNKS1 构建体对 STF 报告子的影响。TNKS1 构建体瞬间转染入 HEK293STF 报告子细胞并在转染后 48hr 检测荧光素酶活性 (IP : 免疫沉淀, TCL : 总细胞裂解物)。

[0053] 图 5. XAV939 稳定 Axin 蛋白水平并抑制 Axin 泛素化

[0054] 图 5A. 用 XAV939 稳定 Axin。用 DMSO 或 1 μ M XAV939 在脉冲追踪分析前处理 SW480 细胞 2hr, 如在材料和方法中所述。用 RIPA 缓冲液制备细胞裂解物, 用抗 -Axin2 抗体进行免疫沉淀, 通过 SDS-PAGE 分离然后用 PhosphoImager 分析。

[0055] 图 5B. 由 TNKS2 对 Axin 片段的体外聚 ADP- 核糖化。用生物素 -NAD⁺ 孵育重组 TNKS2 和 GST-Axin1(氨基酸 1-280)。在存在或不存在 XAV939 下, 进行反应, 用 SDS-PAGE 分离, 并用链霉亲和素 -AlexaFluor680 探测。

[0056] 图 5C. Axin 泛素化被 XAV939 抑制。用 1 μ M 的 XAV939 预处理 SW480 细胞 4 小时随后用 20 μ M 的 MG132 再处理 2 小时。用 RIPA 缓冲液收获细胞裂解物, 用对照 IgG 或抗 - 泛素抗体进行免疫沉淀, 用所指示抗体进行免疫印迹和分析。Axin1 迁移的位置以箭头标记。指出了迁移慢的聚 - 泛素化 -Axin1 缀合物。

[0057] 图 5D. Axin1 的体内聚 ADP- 核糖化。将在金属硫蛋白启动子控制下稳定表达 GFP-Axin1 的 SW480 细胞用 Cu²⁺ 过夜孵育来诱导 GFP-Axin1 的表达。细胞用 XAV939 再处理 6 小时。裂解物用含有 PARG 抑制剂 ADP-HPD(5 μ M) 和 PARP1 抑制剂 PJ34(80 μ M) 的 RIPA 缓冲液收获, 用 GFP 抗体免疫沉淀和通过免疫印迹进行分析。

[0058] 图 5E. Axin2 在化合物洗脱 (wash-off) 实验中的翻译后修饰。SW480 细胞用 1 μ M XAV939 过夜处理, 用新鲜培养基洗涤以除去 XAV939, 然后用补充有所指示化合物的培养基孵育 1 小时。细胞裂解物用 RIPA 缓冲液收获, 用抗 -Axin2 抗体免疫沉淀并用免疫印迹进行分析。以箭头指示 Axin2 迁移的位置 (IP : 免疫沉淀, TCL : 总细胞裂解物)。

[0059] 图 6. XAV939 以 Axin 依赖型方式抑制 DLD1 菌落形成

[0060] 图 6A. XAV939 抑制 DLD1 而非 RKO 细胞的菌落形成。将 DLD1 和 RKO 细胞以 500 细胞 / 孔接种到含有 0.5% 血清和所指示化合物的培养基的 6 孔板中, 并且每两天补充新鲜培养基。通过结晶紫染色使菌落可视化。

[0061] 图 6B. XAV939 对 DLD1 菌落形成的影响是 Axin 依赖型的。用针对 Axin1 和 Axin2 的 siRNA 转染 DLD1 细胞, 并将细胞以 1000 细胞 / 孔接种到 6 孔板中。按照 6A 所述进行化合物处理。

[0062] 图 7 示出了本发明化合物抑制表征为活化的 Wnt 信号的多种癌症模型生长的能力, 包括具有功能缺失的 APC 突变的癌症, 具有获得功能的 β - 连环蛋白活化突变的癌症, 和 / 或具有活化的 Wnt 信号 (由 β - 连环蛋白靶基因 Axin2 的高表达水平所证明) 的癌症。三种代表性实例如图所示, 包括具有 APC 突变的结直肠癌细胞系 SW403、具有 β - 连环蛋白突变的结直肠癌细胞系 HuTu-80 和具有高 Axin2 基因表达水平的胃癌细胞系 NCI-N87, 由定量 PCR 和基因表达微阵列所证明。

[0063] 对于克隆发生检测, 在补充有 10% 胎牛血清的细胞培养基中, 以 1000-3000 细胞 / 孔的密度铺板于 6 孔板并用 XAV939 处理细胞 12 天。每三天补充化合物。通过固定和在结晶紫中染色使菌落可视化。对于定量 PCR, 从细胞分离总 RNA 以利用反转录反应制成 cDNA。使用来自 AdvancedBiosystems (ABI) 的 Axin2 特异的探针 - 引物进行定量 PCR。

[0064] 发明详述

[0065] 本发明提供例如通过使用 Wnt 途径信号转导的调节物, 例如 Axin 稳定物或去稳定物和 / 或 TNKS 调节物, 例如小分子 (包括如本发明的化合物)、抑制性核酸、融合蛋白等来诊断 Wnt 信号相关紊乱 (例如结直肠癌)、改善其症状、保护免于该紊乱以及治疗该紊乱的

方法。

[0066] 所述方法可包括向有需要的受试者给予有效量的 Wnt 途径信号转导的调节物，例如 Axin 稳定物和 / 或 TNKS 调节物（例如小分子（包括如本发明的化合物）、抑制性核酸、融合蛋白等或它们的任何组合），以及可药用的载体。

[0067] 出于本发明的目的，以及如在此更详细地解释，“本发明的化合物”和类似术语用来描述通过 Axin 稳定来抑制、对抗 (antagonize)、缓解或弱化 Wnt 途径信号的化合物。该化合物包括但不限于 XAV939。该化合物可以包括其他小分子 PARP 抑制剂，这些抑制物相对于其他 PARP，优先抑制 TNKS1 和 / 或 TNKS2 的催化活性。

[0068] 在一个实施方案中，本发明的 Axin 稳定物（例如本发明的化合物（如 XAV939）可以用于治疗与 Wnt 信号的异常上调相关的 Wnt 信号紊乱（例如癌症、骨关节炎和多囊肾疾病）。

[0069] 在另一实施方案中，可以调节 Axin 稳定以便可以改善与 Wnt 信号的异常下调相关的 Wnt 信号紊乱（例如，骨质疏松症、肥胖、糖尿病和神经退行性疾病）。例如，能够防止 Axin 稳定的小分子、融合蛋白或抗体的给药会转而促进 β -连环蛋白的稳定（以及因此导致 Wnt 途径信号）。

[0070] 所述方法可以在细胞水平使用，例如来治疗具有 Wnt 受体的上皮细胞。例如，本发明的方法可以用于治疗或预防基底细胞癌或其他 Wnt 信号相关的紊乱（例如，表征为异常细胞增殖的那些）。本发明的方法也可以通过抑制或促进对 Wnt 信号转导的抑制而用于预防细胞增殖、异常或者其他。所述方法也可以用于人类和动物受试者。所述方法可以在体外或体内进行。

[0071] 本发明也提供例如通过使用 Axin 稳定物和 / 或 TNKS 调节物（例如小分子、抑制性核酸、融合蛋白等）来调节 Wnt 途径信号转导的方法。在一个实施方案中，本发明的方法包括例如通过使用 Axin 稳定物和 / 或 TNKS 调节物（例如小分子、抑制性核酸、融合蛋白等）来抑制或促进对 Wnt 途径信号转导的抑制。对 Axin 稳定起作用（从而对 β -连环蛋白磷酸化和降解起作用）的试剂导致 Wnt 途径信号转导的抑制；反过来，缓解 Axin 稳定（以及因此稳定 β -连环蛋白）的试剂导致 Wnt 途径信号转导的增加。

[0072] 所述抑制或促进对 Wnt 途径信号转导抑制的方法可以用于例如对许多的细胞、组织和器官，包括正常细胞、组织和器官的修复和 / 或功能性能的调控。非限制性实例包括对神经组织、骨和软骨形成和修复的调控，以及对精子发生的调控，对平滑肌细胞的调控，对肺、肝和其他由原始消化管产生的器官的调控，对造血功能的调控，对皮肤和毛发生长的调控等。本发明的方法可以在体外或体内进行。

[0073] 本发明也提供鉴定和检测 Wnt 途径信号转导的激动剂和拮抗剂的方法，以及鉴定和检测 Wnt 途径成员（例如 Axin, TNKS）的激动剂和拮抗剂的方法。本发明发现通过 Axin 蛋白水平的稳定以及升高对 Wnt 途径信号转导的抑制，和通过 TNKS 的抑制对 Wnt 途径信号转导的抑制，对于在体外或体内鉴定增强或干扰这一稳定性，从而对 Wnt 途径信号进行增强或干扰的试剂是有用的。本发明的发现因而对于发现可以用于治疗与 Axin 稳定的存在或不存在相关的紊乱（和产生的 Wnt 途径信号转导的调节）的试剂也是有用的。

[0074] 在一个实施方案中，鉴定能够调节 Wnt 途径信号转导的试剂的方法包括：a) 在允许 Wnt 信号的条件下，检测试剂存在和不存在时，接触一种生物样品，在该生物样品中 Wnt

信号途径是活跃的,以及在该生物样品中可以测量 Axin 蛋白质或稳定性水平;和 b) 在所述检测试剂存在和不存在下,测量 Axin 蛋白质的水平或稳定性,其中 (i) 在存在该检测试剂时, Axin 蛋白质水平或稳定性相对于不存在该检测试剂的减少,将该检测试剂鉴定为 Wnt 途径信号转导的激动剂,和其中 (ii) 在存在该检测试剂时,Axin 蛋白质水平或稳定性相对于不存在该检测试剂的增加,将该检测试剂鉴定为 Wnt 途径信号转导的拮抗剂。

[0075] 在一个实施方案中,该试剂可以是小分子。在另一实施方案中,该试剂可以是抑制性核酸。在另一实施方案中,该试剂可以是融合蛋白。在一个实施方案中,所述小分子、抑制性核酸或融合蛋白可以直接作用于 Axin。在另一实施方案中,所述小分子、抑制性核酸或融合蛋白可以间接作用于 Axin(例如可以作用于 Axin 的结合伴侣,或 Axin 关联蛋白,例如 GSK3、β - 连环蛋白、APC,和蓬乱蛋白、PP1、PP2A、酪蛋白激酶 1、LRP5/6)。

[0076] 本发明包括筛选用于治疗 Wnt 信号相关紊乱(例如结直肠癌)的化合物的方法,包括将表现出 Wnt 途径信号转导的细胞与检测试剂接触,并检测 TNKS 蛋白水平和 / 或 Axin 蛋白水平和 / 或 Axin 稳定的改变。

[0077] 在一个实施方案中,鉴定用于治疗 Wnt 信号相关紊乱的试剂的方法包括 :a) 在允许 Wnt 信号的条件下,检测试剂存在和不存在时,接触一种生物样品,在该生物样品中 Wnt 信号途径是活跃的,以及在该生物样品中可以测量 Axin 蛋白质水平;和 b) 在所述检测试剂存在和不存在下,测量 Axin 蛋白质的水平,其中 (i) 在存在该检测试剂时, Axin 蛋白质水平相对于不存在该检测试剂的减少将该检测试剂鉴定为可用于治疗与 Wnt 信号异常下调相关的紊乱,和其中 (ii) 在存在该检测试剂时,Axin 蛋白质水平相对于不存在该检测试剂的增加将该检测试剂鉴定为可用于与 Wnt 信号的异常上调相关的紊乱。

[0078] 在一个实施方案中,该试剂可以是小分子。在另一实施方案中,该试剂可以是抑制性核酸。在另一实施方案中,该试剂可以是融合蛋白。在一个实施方案中,所述小分子、抑制性核酸或融合蛋白可以直接作用于 Axin。在另一实施方案中,所述小分子、抑制性核酸或融合蛋白可以间接作用于 Axin(例如可以作用于 Axin 的结合伴侣,或 Axin 相关联蛋白,例如 GSK3、β - 连环蛋白、APC,和蓬乱蛋白、PP1、PP2A、酪蛋白激酶 1、LRP5/6)。

[0079] 在一个实施方案中,鉴定用于治疗 Wnt 信号相关紊乱的试剂的方法包括将一种细胞与一检测试剂接触以及检测 Axin 蛋白水平或稳定性的改变,其中 Wnt 信号途径在该细胞中是活跃的。

[0080] 本发明包括药物制剂,包括 Wnt 拮抗剂作为活性成分,包括 Wnt 拮抗剂(例如 Axin 稳定物, TNKS 拮抗剂),如本发明所述,该成分以足以 (i) 在体内抑制细胞增殖或 Wnt 异常表达的其他生物学后果;和 (ii) 诊断、改善 Wnt 信号相关紊乱的症状、保护免于该紊乱或治疗该紊乱的量来配制该制剂。所述制剂可以例如在药学可接受载体中包括根据本发明任一实施方案的化合物、抑制性核酸或融合蛋白,或其任何组合。

[0081] 在另一实施方案中,提供了抑制肿瘤细胞生长的方法,其包括向有需要的受试者给予有效量的 Wnt 途径信号转导的调节物,例如 Axin 稳定物和 / 或 TNKS 拮抗剂(例如小分子(包括如本发明的化合物)、抑制性核酸、融合蛋白等或它们的任何组合),以及可药用的载体。作为非限制性实例,和如在此进一步所解释,本发明的化合物(例如化合物 I)能够抑制具有 APC 缺陷的结肠癌细胞和具有完整 Wnt 信号途径的细胞系中的 Wnt 信号。还作为非限制性实例,以及如在此进一步解释,本发明的化合物(例如化合物 I)能够在体外细

胞培养检测中抑制结肠癌细胞的生长。

[0082] 还提供了诱导肿瘤细胞凋亡的方法,其包括向有需要的受试者给予有效量的 Wnt 途径信号转导的调节物,例如 Axin 稳定物和 / 或 TNKS 抗剂(例如小分子(包括如本发明的化合物)、抑制性核酸、融合蛋白等或它们的任何组合),以及可药用的载体。

[0083] 在本发明方法的一个实施方案中,给予 Axin 稳定物,如本发明的化合物。在所述实施方案中,该 Axin 稳定物导致在它所给予的细胞或体系中 Axin 蛋白质水平的增加。结果是,β - 连环蛋白通过 GSK3 机制经历相伴随的磷酸化和降解。Axin 稳定和 β - 连环蛋白降解的组合导致 Wnt 途径信号的抑制。所述实施例的至少一种用途是治疗 Wnt 信号水平异常高的紊乱(例如结肠癌)。另一用途是肿瘤细胞生长的抑制和 / 或肿瘤细胞凋亡的诱导。

[0084] 在本发明方法的一个实施方案中,给予 Axin 稳定物,该 Axin 稳定物通过 GSK3 来增加 Axin 磷酸化而起作用。在一个实施方案中,XAV939 能够通过 GSK3 来诱导增加 Axin 磷酸化,从而稳定 Axin 并增加 Axin 蛋白质水平,以及从而抑制 Wnt 信号转导。

[0085] 本发明包括鉴定或预测为 Wnt 信号相关紊乱(例如,结直肠癌)所苦的受试者受益于包括“TNKS 抑制剂”、“Axin 稳定物”等(包括如本发明的化合物、或能够抑制 TNKS 催化活性的融合蛋白或抑制性核苷酸)的治疗方案的倾向或可能性的方法。

[0086] 如在此进一步解释,所述方法包括首先诊断患上 Wnt 信号相关紊乱(例如结直肠癌)的受试者,然后检测所述受试者是否存在表现出与异常 Axin 稳定和 / 或 β - 连环蛋白降解相关的紊乱的一种或多种生物标记。所述生物标记的存在表明所述受试者将受益于包括“TNKS 抑制剂”、“Axin 稳定物”等的治疗方案。所述生物标记的非限制性实例包括(i)肿瘤遏制物 APC 的截短突变;(ii)Axin1 和 Axin2 突变;(iii)β - 连环蛋白过表达;和增加的 Axin-GSK3 复合体的形成。

[0087] 定义

[0088] 术语“治疗”、“经治疗的”、“治疗中”或“治疗方法”包括减少或减轻与被治疗的状态、紊乱或疾病相关联或由它们引起的至少一种症状。在某些实施方案中,治疗包括诱导 Wnt 信号相关的紊乱,随后活化本发明的化合物,这将接着减少或减轻与被治疗的 Wnt 信号相关紊乱相关联或由它所引起的至少一种症状。例如,治疗可以减少一种或几种紊乱症状或完全根除紊乱。

[0089] 术语“用途”分别包括本发明的任何一个或多个下述实施方案:在治疗 Wnt 信号相关的紊乱中的用途;对于制造用来治疗这些疾病的药物组合物的使用,例如在制造药物中的用途;使用本发明的化合物来治疗这些疾病的方法;具有本发明的化合物来治疗这些疾病的药物制剂;和用来治疗这些疾病的本发明化合物;只要没有另外指出,则视情况并采用适当方法。特别地,待治疗且因此优选使用本发明化合物的疾病选自癌症(例如结肠癌)和其他增生性疾病、骨质疏松症、和精神分裂症以及那些依赖于 Wnt 信号活性的疾病。

[0090] 术语“Wnt 信号相关的紊乱”意指与异常 Wnt 信号相关联的疾病和状况,包括但不限于癌症(例如结直肠癌(CRC)、黑素瘤、乳腺癌、肝癌、肺癌、和胃癌;其他非致癌的增生性疾病,如增生性皮肤病(例如银屑病,皮炎);骨质疏松症;骨关节炎;纤维化;精神分裂症;血管疾病;心脏疾病;以及神经退行性疾病如阿尔茨海默氏病。Wnt 信号的异常上调与癌症、骨关节炎、和多囊肾疾病相关联,而 Wnt 信号的异常下调与骨质疏松症、肥胖、糖尿病以及神经退行性疾病相关联。

[0091] 如在此使用，“Wnt 信号相关的癌症”包括但不限于结直肠癌 (CRC)、黑素瘤、乳腺癌、肝癌、肺癌和胃癌。如在此使用，术语“Wnt- 相关的癌症”包括恶性的髓母细胞瘤和其他原发性 CNS 恶性的神经外胚瘤、横纹肌肉瘤、肺癌，以及特别是小细胞肺癌、消化道源性肿瘤，包括但不限于食道、胃、胰腺和胆管系统的癌症；前列腺和膀胱癌、结肠癌、和肝癌。

[0092] 如在此使用，术语“Wnt 拮抗剂”包括 Wnt 信号转导的抑制物，或抑制激动剂 (agonizer)，如在此所述。在一个或多个实施方案中，所述 Wnt 拮抗剂通过 Axin 稳定来起作用。在一个或多个实施方案中，所述 Wnt 拮抗剂通过 TNKS 拮抗来起作用（例如通过抑制 TNKS 的催化活性，从而稳定 Axin）。Wnt 拮抗剂包括但不限于小分子（包括如本发明的化合物）、抑制性核酸和融合蛋白。

[0093] 如在此使用，术语“TNKS 拮抗剂”、“TNKS 抑制剂”等意指能够增加 Axin 稳定性的试剂。“TNKS 拮抗剂”、“TNKS 抑制剂”等可以包括 Axin 稳定物，如本发明的化合物。TNKS 拮抗剂优选地通过降低或抑制 TNKS 蛋白质的催化活性（例如它们使靶蛋白如 Axin 聚 ADP- 核糖化 (PARsylate) 的能力以及它们自发的聚 ADP- 核糖化 (autoparsylate) 的能力），而非通过降低 TNKS 蛋白或转录物水平来起作用。也认为 TNKS 拮抗剂抑制 Wnt 信号，原因包括 Axin 是 Wnt 信号的负调节物，并且 TNKS 与 Axin 相互作用（例如击倒 TNKS 稳定物和增加 Axin 蛋白水平）。TNKS 拮抗剂增加磷酸化 - β - 连环蛋白，减少胞质 β - 连环蛋白和影响 β - 连环蛋白靶基因，其方式类同于 β - 连环蛋白 siRNA。

[0094] 如在此使用，术语“Axin 稳定物”意指能够增加 Axin 稳定性的试剂。这导致 β - 连环蛋白的磷酸化和降解加速。也认为 Axin- 稳定物抑制 Wnt 信号，原因包括 Axin 是 Wnt 信号的负调节物。Axin 稳定物（例如本发明的化合物（例如 XAV939））作用于减少细胞中的总 β - 连环蛋白，但是增加磷酸化 - β - 连环蛋白。出于本发明的目的，术语“Axin”对于 Axin1 和 Axin2 是互换使用的，并且本发明的 Axin 稳定物能够稳定和增加 Axin1 和 Axin2 两者的蛋白水平。此外，如在此使用，“Axin”可以应用于来自人类、小鼠、大鼠或其他物种的 Axin1 和 / 或 Axin2。

[0095] 如在此使用，术语“Axin- 相关的蛋白质”意指在正常条件下与 Axin 相关联（例如直接或间接结合，作为靶标，与其形成蛋白复合体和 / 或对其施加影响）的 Wnt 信号途径的蛋白成员。所述 Axin 相关的蛋白质包括但不限于 GSK3、 β - 连环蛋白、APC、和蓬乱蛋白、PP1、PP2A、酪蛋白激酶 1、LRP5/6。

[0096] 术语“本发明的化合物”和类似术语，如在此进一步定义，在此用来描述可以用于例如稳定 Axin（和因此抑制 Wnt 途径信号）的化合物。该化合物包括但不限于 XAV939。该化合物可以包括相比于其他 PARP，优先抑制 TNKS1 和 / 或 TNKS2 的催化活性的其他小分子 PARP 抑制剂。

[0097] 如在此使用，“治愈”意指通过治疗，造成紊乱，例如 Wnt 信号相关的紊乱，例如骨质疏松症、精神分裂症、血管疾病、心脏疾病或神经退行性疾病的缓解。

[0098] 术语“预防法”或“预防”意指阻碍紊乱如 Wnt 信号相关的紊乱的发作或复发。

[0099] 如在此使用，术语“医学状况”包括但不限于任何表现为需要治疗的一种或多种物理和 / 或生理症状的状况或疾病，并且包括以前和新近鉴定的疾病和其他紊乱。

[0100] 如在此使用，向受试者或患者给予试剂或药物包括自身给药和通过他人的给药。也应理解如所述的多种模式的治疗或预防医学状况旨在意指“基本上”，这包括完全以及不

完全治疗或预防，并且其中实现了一些生物或医学相关的结果。

[0101] 如在此使用，“调节”表示直接或间接控制或影响的能力，并且作为非限制性实例，可以替代性地意指抑制或刺激、促进或对抗、阻碍或促进、以及增强或减弱。

[0102] 如在此使用，“有机小分子”或“小分子”是具有分子量小于 3 千道尔顿，并且优选小于 1.5 千道尔顿的有机化合物或与无机化合物（例如金属）复合的有机化合物。

[0103] 如在此使用，术语化合物的“有效量”是足以实现想要的治疗和 / 或预防效果的量，例如，导致预防与被治疗的疾病相关的症状（例如与异常 Wnt 信号相关的紊乱）或减轻该症状的量。给予受试者的化合物量将取决于疾病的类型和严重性以及个体特性，例如总体健康、年龄、性别、体重和药物耐受性。这也取决于疾病的程度、严重性和种类。熟练技术人员将能够根据这些和其他因素来确定适当的剂量。通常，足以实现治疗或预防效果的有效量的本发明化合物在约 0.000001mg 每千克体重每天至约 10,000mg 每千克体重每天的范围。优选地，该剂量在约 0.0001mg 每千克体重每天至约 100mg 每千克体重每天的范围。本发明的化合物也可以互相，或者与一种或多种其他治疗化合物组合给予。

[0104] 术语“受试者”旨在包括能够罹患或患上与异常 Wnt 信号相关的疾病、紊乱或状况的生物体，例如原核生物和真核生物。受试者的实例包括哺乳动物，例如人类、狗、牛、马、猪、绵羊、山羊、猫、小鼠、兔、大鼠和转基因非人动物。在某些实施方案中，受试者是人，例如罹患癌症（例如结肠癌）和其他增生性疾病、骨质疏松症、和精神分裂症、以及在此所述的其他疾病或状况（例如 Wnt 信号相关的紊乱）、具有罹患风险或者潜在地能够罹患这些的人类。在另一实施方案中，受试者是细胞。

[0105] 如在此使用，术语“芳基”定义为具有 6 至 14 元环碳原子，且没有杂环原子的芳香族基团。芳基基团可为单环或稠合双环或三环。它可以是未取代的或者被一或多个，优选一或两个取代基所取代，其中取代基如在此所述。如在此所定义，芳基部分可以完全是芳香族的而不论是单环或双环。然而，如果它含有一个环以上，如在此所定义，术语芳基包括这样的部分，其中至少一个环完全是芳香族而其他环可以是部分未饱和的或饱和的或完全是芳香族的。

[0106] 如在此使用，“Het”指含有至少一个 S、O 或 N 杂环原子的杂芳基和杂环化合物。更具体地，“Het”是含有选自 N、O 和 S 的 1-4 个杂原子的 5-7 元杂环，或者包括至少一个 5-7 元杂环的 8-12 元稠环体系，该 5-7 元杂环含有选自 N、O 和 S 的 1、2 或 3 个杂原子。如在此使用，het 的实例包括但不限于未取代的和取代的吡咯烷基、四氢呋喃基、四氢硫代呋喃基、哌啶基、piperazyl、嘌呤基、四氢吡喃基、吗啉代、1,3-diazapanyl、1,4-diazapanyl、1,4-oxazepanyl、1,4- 氧硫杂环戊基、呋喃基、噻吩基、吡咯基 (pyrryl)、吡咯基 (pyrrolyl)、吡唑基、三唑基、四唑基、吲唑基、噁二唑基、咪唑基、吡咯烷基 (pyrroolidyl)、吡咯烷基 (pyrrolidinyl)、噻唑基、噁唑基、吡啶基、吡唑基、吡嗪基、嘧啶基、异噁唑基、吡嗪基、喹啉基、异喹啉基、吡啶并吡嗪基、吡咯并吡啶基、furoypyridyl、吲哚基、苯并呋喃基、苯并硫代呋喃基、苯并吲哚基、苯并噻吩基、吡唑基、哌啶基、哌嗪基、吲哚啉基、吗啉基、苯并噁唑基、吡咯并喹啉基、吡咯并 [2,3-b] 吡啶基、苯并三唑基、氧代苯并噁唑基、benzo[1,3]dioxolyl、苯并咪唑基、喹啉基、茚满基等。杂芳基在 het 的定义的范围内。杂芳基的实例是吡啶基、嘧啶基、喹啉基、噻唑基和苯并噻唑基。最优选的 het 是吡啶基、嘧啶基和噻唑基。如在此所述，het 可以是未取代的或取代的。优选地，它是未取代的，或者如果是取代的，那

么它是碳原子被卤素尤其是氟或氯、羟基、C1-C4 烷基如甲基和乙基、C1-C4 烷氧基，尤其是甲氧基和乙氧基、硝基、-O-C(0)-C1-C4 烷基或 -C(0)-O-C1-C4 烷基、SCN 或硝基取代的，或者氮原子被 C1-C4 烷基，尤其是甲基或乙基、-O-C(0)-C1-C4 烷基或 -C(0)-O-C1-C4 烷基如甲酯基或乙酯基取代的。

[0107] 当两个取代基以及共同连接的氮是 het 时，应理解得到的杂环是含氮环，例如氮丙啶、吖丁啶、吡咯 (azole)、哌啶、哌嗪、吗啉 (morpholine)、吡咯、吡唑、噻唑、噁唑、吡啶、嘧啶、异噁唑等，其中此 het 可为如在此所定义的未取代的或取代的。

[0108] Halo 是卤素，并且可为氟、氯、溴或碘，尤其是氟和氯。

[0109] 除非另有说明，否则术语“烷基”包括饱和的脂肪族基团，包括直链烷基基团（例如甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基等），支链烷基基团（异丙基、叔丁基、异丁基等），环烷基（脂环）基团（环丙基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基），烷基取代的环烷基基团，和环烷基取代的烷基基团。术语“烷基”也包括链烯基基团和炔基基团。此外，措词“Cx-Cy- 烷基”，其中 x 是 1-5 并且 y 是 2-10 表示特定范围的碳的特定烷基基团（直链或支链）。例如，措词 C1-C4- 烷基包括但不限于甲基、乙基、丙基、丁基、异丙基、叔丁基、和异丁基以及仲丁基。此外，术语 C3-7- 环烷基包括但不限于环丙基、环戊基、环己基和环庚基。如下所讨论，这些烷基基团以及环烷基基团可进一步被取代。

[0110] 术语烷基还包括这样的烷基基团，其可以进一步包括代替烃骨架的一或多个碳的氧、氮、硫或磷原子。在一实施方案中，直链或支链烷基在其骨架中具有 10 或更少的碳原子（例如，对于直链为 C1-C10，对于支链为 C3-C10），并且更优选 6 或更少的碳。或者，优选的环烷基在它们的环结构中具有 4-7 个碳原子，并且更优选在环结构中具有 5 或 6 个碳。

[0111] 此外，烷基（例如甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基等）包括“未取代烷基”和“取代烷基”，后者指这样的烷基部分，它具有代替烃骨架的一或多个碳上的氢的取代基，它允许分子执行其想要的功能。

[0112] “环烷基”基团意指具有 3 至 10 元环碳原子的 C3 至 C10 环烷基，并且可为例如环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基或环辛基、环壬基等。环烷基基团可为单环的或稠合双环的。此外，优选的环烷基基团是环戊基或环己基。最优选地，环烷基是环己基。环烷基基团可为完全饱和的或部分未饱和的，尽管优选它是完全饱和的。如在此所限定，它不包括芳基基团。环烷基基团可为未取代的或被下面限定的任何取代基取代的，优选卤素、羟基或 C1-C6 烷基如甲基。

[0113] 术语“取代的”旨在描述具有代替分子的一或多个原子（如 C、O 或 N）上的氢的取代基的部分。此取代基可以包括吸电子基团或吸电子原子。此取代基可以包括例如氧代、烷基、烷氧基、链烯基、炔基、卤素、羟基、烷基羰氧基、芳基羰氧基、烷氧基羰氧基、芳氧基羰氧基、羧化物、烷基羰基、芳基羰基、烷氧基羰基、氨基羰基、烷基氨基羰基、二烷基氨基羰基、烷硫基羰基、烷氧基、磷酸酯、膦酸酯 (phosphonato)、次膦酸酯 (phosphinato)、氨基（包括烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基、和烷基芳基氨基）、酰氨基（包括烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、氨甲酰基和脲基）、脒基、亚氨基、巯基、烷硫基、芳基硫基、硫代羧酸酯、硫酸酯、烷基亚磺酰基、磺酸盐、氨磺酰 (sulfamoyl)、氨磺酰、硝基、三氟甲基、氰基、叠氮基、杂环、烷基芳基、吗啉代、酚、苄基、苯基、piperazine、环戊烷、环己烷、吡啶、5H- 四唑、三唑、哌啶、或芳香族或杂芳族部分、以及它们的任何组合。

[0114] 未取代的旨在意指氢是唯一的取代基。

[0115] 除了在此所述,任何上面限定的芳基、het、烷基、链烯基、炔基或环烷基可为未取代的或被高达四个,优选一个、两个或三个取代基独立取代的,该取代基选自:卤素(如Cl或Br);羟基;低级烷基(如C1-C3烷基);可被在此所限定的任何取代基取代的低级烷基;低级烯基;低级炔基;低级链烷酰基(alkanoyl);低级烷氧基(如甲氧基);芳基(如苯基或萘基);取代芳基(如氟代苯基或甲氧基苯基);芳基低级烷基如苄基、氨基、单或二-低级烷基(如二甲基氨基);低级链烷酰基氨基乙酰基氨基;氨基低级烷氧基(如乙氧胺);硝基;氰基;氰基低级烷基;羧基;低级烷氧羰基(如甲氧基羰基;n-丙氧基羰基或异-丙氧基羰基),低级aryloyl,如苯甲酰基;氨甲酰基;N-单-或N,N-二-低级烷基氨基甲酰基;低级烷基氨基甲酸酯;脒基;胍;巯基;磺基(sulfo);低级烷硫基;磺基氨基;氨基磺酰;苯并磺酰胺;磺酸酯;硫基低级烷基(如甲基硫基);磺氨基;芳基氨基磺酰;卤素取代的或未取代的芳基磺酸酯(如氯代-苯基磺酸酯);低级烷基亚磺酰基;芳基亚磺酰基(sulfinyl);芳基-低级烷基亚磺酰基;低级烷基芳基亚磺酰基;低级链烷磺酰基;芳基磺酰基;芳基-低级烷基磺酰基;低级芳基烷基;低级烷基芳基磺酰基;卤素-低级烷基氢硫基;卤素-低级烷基磺酰基;如三氟甲烷磺酰基;膦酰基(phosphono)(-P(=O)(OH)2);羟基-低级烷氧基磷酰基(phosphoryl)或二-低级烷氧基磷酰基;尿素和取代尿素;烷基氨基甲酸酯或氨基甲酸酯类(如乙基-N-苯基-氨基甲酸酯);或低级烷基(例如甲基、乙基或丙基)。

[0116] 在一实施方案中,上面提及的烷基、环烷基和芳基为独立地未被取代的或者被低级烷基、芳基、芳基低级烷基、羰基、低级烷氧羰基,并且尤其是卤素、-OH、-SH、-OCH₃、-SCH₃、-CN、-SCN或硝基所取代。

[0117] 如在此所定义,术语“低级烷基”在单独或组合使用时,指含有1-6个碳原子的烷基。该烷基基团可为支链的或直链的,并且如本文上面所定义。

[0118] 术语“烯基”指含有至少一个碳-碳双键的烃基基团,并且包括对于上述烷基的长度类似的未取代的脂肪基团和可能的取代。如在此所限定,它可为未取代的或被在此所述取代基所取代的。碳-碳双键可在烯基基团的任何两个碳原子之间。优选它含有1或2个碳-碳双键并且更优选一个碳-碳双键。烯基基团可为直链或支链的。实例包括但不限于乙烯基、1-丙烯基、2-丙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、2-甲基-1-丙烯基、1,3-丁二烯基等。术语“低级烯基”指含有2-6个碳原子的烯基基团。

[0119] 例如,术语“烯基”包括直链烯基基团(例如,乙烯基、丙烯基、丁烯基、戊烯基、己烯基、庚烯基、辛烯基、壬烯基、癸烯基等),支链烯基基团,环烯基(脂环)基团(环丙烯基、环戊烯基、环己烯基、环庚烯基、环辛烯基等),烷基或烯基取代的环烯基基团,和环烷基或环烯基取代的烯基基团。术语烯基还包括这样的烯基基团,其包括代替烃骨架的一或多个碳的氧、氮、硫或磷原子。在某些实施方案中,直链或支链烯基基团在它的骨架中具有6个或更少的碳原子(例如,对于直链为C2-C6,对于支链为C3-C6)。或者,环烯基基团可在它们的环结构中具有3-8个碳原子,并且更优选在环结构中具有5或6个碳。术语C2-C6包括含有2至6个碳原子的烯基基团。

[0120] 此外,术语烯基包括“未取代的烯基”和“取代的烯基”,后者指这样的烯基部分,它具有代替烃骨架的一或多个碳上的氢的取代基。此取代基可以包括,例如烷基基团、炔

基团、卤素、羟基、烷基羧基、芳基羧基、烷氧基羧基、芳氧基羧基、羧化物、烷基羧基、芳基羧基、烷氧基羧基、氨基羧基、烷基氨基羧基、二烷基氨基羧基、烷硫基羧基、烷氨基、磷酸酯、膦酸酯、次膦酸酯、氰基、氨基（包括烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基、和烷基芳基氨基）、酰氨基（包括烷基羧基氨基、芳基羧基氨基、氨甲酰基和脲基）、脒基、亚氨基、巯基、烷硫基、芳基硫基、硫代羧酸酯、硫酸酯、烷基亚磺酰基、磺酸盐、胺磺酰基（sulfamoyl）、磺酰胺基、硝基、三氟甲基、氰基、叠氮基、杂环基、烷基芳基、或芳香族或杂芳族部分。

[0121] 如在此使用，术语“芳基烷基”指通过桥接亚烷基（alkylene）基团与主链相连的芳基基团。实例包括但不限于苄基、苯乙基、萘甲基等。类似地，氰基烷基基团指通过桥接亚烷基基团而与主链相连的氰基基团。

[0122] 术语“烷基芳基”另一方面指通过亚苯基基团桥接到主链的烷基基团。实例包括但不限于，甲基苯基、乙基苯基等。

[0123] 如在此使用，术语“烷酰基（alkanoyl）”指其中一个碳原子被C=O基团代替的烷基链。该C=O基团可存在于取代基的一端或在该部分的中间。实例包括但不限于，甲酰基、乙酰基、2-丙酰基、1-丙酰基等。

[0124] 术语“低级硫代烷基”如在此所限定，指通过硫原子连接到主链的烷基基团。实例包括但不限于，硫甲基（或氢硫基甲基）、硫乙基（氢硫基乙基）等。

[0125] 术语“低级烷氧羰基”或其同义词指这样的烷氧基羧基基团，其中通过芳基基团（C(0)）与主链连接。实例包括但不限于甲氧基羧基、乙氧基羧基等。

[0126] 应理解术语C(0)指-C=O基团，其可为酮、醛或酸或酸衍生物。类似地，S(0)指-S=O基团。

[0127] 术语“炔基”包括对于上述烷基的长度类似的未饱和的脂肪烃基团和可能的取代，但含有至少一个叁键。

[0128] 例如，术语“炔基”包括直链炔基基团（例如，乙炔基、丙炔基、丁炔基、戊炔基、己炔基、庚炔基、辛炔基、壬炔基、癸炔基等），支链炔基基团，和环烷基或环烯基取代的炔基基团。术语炔基还包括这样的炔基基团，其包括代替烃骨架的一或多个碳的氧、氮、硫或磷原子。在某些实施方案中，直链或支链炔基基团在它的骨架中具有6个或更少的碳原子（例如，对于直链为C₂-C₆，对于支链为C₃-C₆）。术语C₂-C₆包括含有2至6个碳原子的炔基基团。

[0129] 此处术语“炔基”包括“未取代的炔基”和“取代的炔基”，后者指这样的炔基部分，它具有代替烃骨架的一或多个碳上的氢的取代基。此取代基可以包括，例如烷基基团、炔基基团、卤素、羟基、烷基羧基、芳基羧基、烷氧基羧基、芳氧基羧基、羧酸酯、烷基羧基、芳基羧基、烷氧基羧基、氨基羧基、烷基氨基羧基、二烷基氨基羧基、烷硫基羧基、烷氨基、磷酸酯、膦酸酯、次膦酸酯、氰基、氨基（包括烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基、和烷基芳基氨基）、酰氨基（包括烷基羧基氨基、芳基羧基氨基、氨甲酰基和脲基）、脒基、亚氨基、巯基、烷硫基、芳基硫基、硫代羧酸酯、硫酸酯、烷基亚磺酰基、磺酸盐、胺磺酰基（sulfamoyl）、磺酰胺基、硝基、三氟甲基、氰基、叠氮基、杂环基、烷基芳基、或芳香族或杂芳族部分。

[0130] 术语“胺”或“氨基”应理解为广义地适用于分子，或部分或官能团，如本领域通常

理解，并且可以是一级、二级或三级。术语“胺”或“氨基”包括氮原子与至少一个碳、氢或杂原子共价结合的化合物。该术语包括例如，但不限于，“烷基氨基”、“芳基氨基”、“二芳基氨基”、“烷基芳基氨基”、“烷基氨基芳基”、“芳基氨基烷基”、“烷基氨基烷基”、“酰胺”、“酰胺基”和“氨基羧基”。术语“烷基氨基”包括基团和化合物，其中氮与至少一个其他烷基基团结合。术语“二烷基氨基”包括其中氮原子与至少两个其他烷基基团结合的基团。术语“芳基氨基”和“二芳基氨基”包括其中氮与至少一个或两个芳基基团分别结合的基团。术语“烷基芳基氨基”、“烷基氨基芳基”或“芳基氨基烷基”指结合至少一个烷基基团和至少一个芳基基团的氨基基团。术语“烷基氨基烷基”指与也和烷基基团相结合的氮原子结合的烷基、烯基或炔基基团。

[0131] 术语“酰胺”、“酰胺基”或“氨基羧基”包括化合物或部分，其含有与羧基或硫羧基基团的碳结合的氮原子。该术语包括“烷基氨基羧基”或“烷基氨基羧基”基团，其包括与结合羧基基团的氨基基团相结合的烷基、烯基、芳基或炔基基团。它包括芳基氨基羧基和芳基羧基氨基基团，其包括与结合羧基或硫羧基基团的碳相结合的氨基基团的芳基或杂芳基部分。术语“烷基氨基羧基”、“烯基氨基羧基”、“炔基氨基羧基”、“芳基氨基羧基”、“烷基羧基氨基”、“烯基羧基氨基”、“炔基羧基氨基”和“芳基羧基氨基”包括在术语“酰胺”中。酰胺也包括尿素基团（氨基羧基氨基）和氨基甲酸酯（氧羧基氨基）。

[0132] 术语“芳基”包括基团，其包括 5- 和 6- 元单环芳香族基团，其可以包括 0 到 4 个杂原子，例如，苯基、吡咯、呋喃、噻吩、噻唑、异噻唑、咪唑、三唑、四唑、吡唑、噁唑、异噁唑、吡啶、吡嗪、哒嗪、和嘧啶等等。此外，术语“芳基”包括多环芳基基团，例如三环，两环，例如萘、苯并噁唑、苯并二噁唑、苯并噻唑、苯并咪唑、苯并噻吩、亚甲二氧基苯基、喹啉、异喹啉、蒽基、菲基、萘啶、吲哚、苯并呋喃、嘌呤、苯并呋喃、氮杂嘌呤、或吲嗪。

[0133] 那些在环结构中具有杂原子的芳基基团也可以称作“芳基杂环”、“杂环”、“杂芳基”或“杂芳族化合物”。芳香环可以在一个或多个环位置处被上述取代基所取代，例如烷基、卤素、羟基、烷氧基、烷基羧氧基、芳基羧氧基、烷氧基羧氧基、芳氧基羧氧基、羧酸酯、烷基羧基、烷基氨基羧基、芳烷基氨基羧基、烯基氨基羧基、烷基羧基、芳基羧基、芳烷基羧基、烯基羧基、烷氧基羧基、氨基羧基、烷硫基羧基、磷酸酯、膦酸酯、次膦酸酯、氰基、氨基（包括烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基、和烷基芳基氨基）、酰氨基（包括烷基羧基氨基、芳基羧基氨基、氨甲酰基和脲基）、脒基、亚氨基、巯基、烷硫基、芳基硫基、硫代羧酸酯、硫酸酯、烷基亚磺酰基、磺酸盐、胺磺酰基（sulfamoyl）、磺酰胺基、硝基、三氟甲基、氰基、叠氮基、杂环基、烷基芳基、或芳香族或杂芳族部分。芳基基团也可以与非芳香族脂环或杂环稠合或桥接从而形成多环（例如四氢萘）。

[0134] 术语“杂芳基”如在此使用，表示在每个环中高达 7 个原子的稳定单环或双环，其中至少一个环是芳香族的并且含有 1 至 4 个选自 O、N 和 S 的杂原子。在这一定义范围内的杂芳基基团包括但不限于：吖啶基、咔唑基、cinnolinyl、喹噁啉基、pyrazolyl、吲哚基、苯并三唑基、呋喃基、噻吩基、苯并噻吩基、苯并呋喃基、喹啉基、异喹啉基、噁唑基、异噁唑基、吲哚基、吡嗪基、哒嗪基、吡啶基、嘧啶基、吡咯基、四氢喹啉。如下面对杂环的限定，“杂芳基”也理解为包括任何含 N 杂芳基的 N- 氧化物衍生物。在杂芳基取代基是二环的并且一个环是非芳香族或不含杂原子的情形下，应理解分别通过芳香环或通过含杂原子的环来连接。

[0135] 术语“杂环”或“杂环基”如在此所使用，旨在意指 5 至 10 元芳香族或非芳香族杂环，其含有 1 至 4 个选自 O、N 和 S 基团的杂原子并且包括双环基团。“杂环基”因此包括上面提及的杂芳基，以及其二氢和四氢类似物。“杂环基”的进一步实例包括但不限于下面：苯并咪唑基、苯并呋喃基、苯并呋吖基、苯并吡唑基、苯并三唑基、苯并硫代苯基、苯并噁唑基、咔唑基、carbolinyl、cinnolinyl、呋喃基、咪唑基、吲哚啉基、吲哚基、indolazinyl、吲唑基、异苯并呋喃基、异吲哚基、异喹啉基、异噁唑基、萘吡啶基、噁二唑基、噁唑基、唑啉、异唑啉、氧杂环丁基、吡喃基、吡嗪基、吡唑基、哒嗪基、吡啶吡啶基、哒嗪基、吡啶基、嘧啶基、吡咯基、喹唑啉基、喹啉基、喹噁啉基、四氢吡喃基、四唑基、四唑吡啶基、噁二唑基、噁唑基、噁吩基、三唑基、氮杂环丁基、1,4-二氧六环基、hexahydroazepinyl、哌嗪基、哌啶基、吡啶-2-酮基、吡咯烷基、吗啉基、硫代吗啉基、二氢苯并咪唑基、二氢苯并呋喃基、二氢苯并硫代苯基、二氢苯并噁唑基、二氢呋喃基、二氢咪唑基、二氢吲哚基、二氢异唑基、二氢异噁唑基、二氢噁二唑基、二氢唑基、二氢吡嗪基、二氢吡唑基、二氢吡啶基、二氢嘧啶基、二氢吡咯基、二氢喹啉基、二氢四唑基、二氢噁二唑基、二氢噁唑基、二氢噁吩基、二氢三唑基、二氢氮杂环丁基、亚甲二氧基苯甲酰基、四氢呋喃基、和四氢噁吩基、及其 N-氧化物。杂环基取代基的连接可以通过碳原子或通过杂原子来发生。

[0136] 术语“酰基”包括化合物和部分，其含有酰基 ($\text{CH}_3\text{CO}-$) 或羧基基团。术语“取代的酰基”包括一个或多个氢被下述基团取代的酰基基团，例如烷基基团、炔基基团、卤素、羟基、烷基羰基、芳基羰基、烷氧基羰基、芳氧基羰基、羧酸酯、烷基羰基、芳基羰基、烷氧基羰基、氨基羰基、烷基氨基羰基、二烷基氨基羰基、烷硫基羰基、烷氧基、磷酸酯、膦酸酯、次膦酸酯、氰基、氨基（包括烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基、和烷基芳基氨基）、酰氨基（包括烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、氨甲酰基和脲基）、脒基、亚氨基、巯基、烷硫基、芳基硫基、硫代羧酸酯、硫酸酯、烷基亚磺酰基、磺酸盐、胺磺酰基 (sulfamoyl)、磺酰胺基、硝基、三氟甲基、氰基、叠氨基、杂环基、烷基芳基、或芳香族或杂芳族部分。

[0137] 术语“酰氨基”包括部分，其中酰基部分与氨基基团结合。例如，该术语包括烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、氨甲酰基和脲基基团。

[0138] 术语“烷氧基”包括共价连接到氧原子的取代的和未取代的烷基、烯基和炔基。烷氧基基团的实例包括甲氧基、乙氧基、异丙氧基、丙氧基、丁氧基和戊氧基基团并且可包括环基如环戊氧基。取代的烷氧基基团的实例包括卤代烷氧基基团。烷氧基基团可以被下述基团取代，如烯基、炔基、卤素、羟基、烷基羰基、芳基羰基、烷氧基羰基、芳氧基羰基、羧酸酯、烷基羰基、芳基羰基、烷氧基羰基、氨基羰基、烷基氨基羰基、二烷基氨基羰基、烷硫基羰基、烷氧基、磷酸酯、膦酸酯、次膦酸酯、氰基、氨基（包括烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基、和烷基芳基氨基）、酰氨基（包括烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、氨甲酰基和脲基）、脒基、亚氨基、巯基、烷硫基、芳基硫基、硫代羧酸酯、硫酸酯、烷基亚磺酰基、磺酸盐、胺磺酰基 (sulfamoyl)、磺酰胺基、硝基、三氟甲基、氰基、叠氨基、杂环基、烷基芳基、或芳香族或杂芳族部分。卤素取代的烷氧基基团的实例包括但不限于氟代甲氧基、二氟代甲氧基、三氟代甲氧基、氯代甲氧基、二氯代甲氧基、三氯代甲氧基等。

[0139] 术语“羰基”或“羧基”包括化合物和部分，其含有与氧原子通过双键连接的碳，和它们的互变异构体形式。含有羰基的部分的实例包括醛、酮、羧酸、酰胺、酯、酸酐等。术语“羧基部分”或“羰基部分”指基团，例如“烷基羰基”基团，其中烷基基团与羰基基团共价结

合，“烯基羰基”基团，其中烯基基团与羰基基团共价结合，“炔基羰基”基团，其中炔基基团与羰基基团共价结合，“芳基羰基”基团，其中芳基基团与羰基基团共价相连。此外，该术语也指其中一或多个杂原子与羰基部分共价结合的基团。例如，该术语包括部分，如氨基羰基部分，其中氮原子与羰基基团的碳共价结合，氨基羰氧基部分，其中氧和氮原子都与羰基基团的碳结合（例如，也称作“氨基甲酸酯”）。此外，氨基羰基氨基基团（例如尿素）也包括在内，如同杂原子（例如氮、氧、硫等，以及碳原子）结合的羰基基团的其他组合。此外，杂原子可以进一步被一或多个烷基、烯基、炔基、芳基、芳烷基、酰基等部分所取代。

[0140] 术语“硫羰基”或“硫代羧基”包括化合物和部分，其含有与硫原子通过双键连接的碳。术语“硫羰基部分”包括与羰基部分类似的部分。例如，“硫羰基”部分包括氨基硫羰基，其中氨基基团与硫羰基基团的碳原子结合，此外，其他硫羰基部分包括氧硫羰基（氧结合到碳原子）、氨基硫羰基氨基基团等。

[0141] 术语“醚”包括化合物和部分，其含有结合到两个不同碳原子或杂原子的氧。例如，该术语包括“烷氧基烷基”，其指共价结合到与另一烷基基团共价结合的氧原子的烷基、烯基、或炔基基团。

[0142] 术语“酯”包括化合物和部分，其含有结合到与羰基基团的碳相结合的氧原子或杂原子。术语“酯”包括烷氧基羧基基团，如甲氧基羰基、乙氧基羰基、丙氧基羰基、丁氧基羰基、戊氧基羰基等。烷基、烯基或炔基基团如上所限定。

[0143] 术语“硫醚”包括化合物和部分，其含有连接到两个不同的碳或杂原子的硫原子。硫醚的实例包括但不限于烷基硫代烷基、烷基硫代烯基和烷基硫代炔基。术语“烷基硫代烷基”包括具有结合到与烷基基团相结合的硫原子的烷基、烯基或炔基基团的化合物。类似地，术语“烷基硫代烯基”和“烷基硫代炔基”指这样的化合物或部分，其中烷基、烯基或炔基基团结合到与炔基基团共价结合的硫原子。

[0144] 术语“羟基”包括具有 $-OH$ 或 $-O-$ 的基团。

[0145] 术语“卤素”包括氟、溴、氯、碘等。术语“全卤化”通常指其中所有氢都被卤素原子所代替的部分。

[0146] 术语“多环基”或“多环基团”包括具有两个或更多个环的部分（例如环烷基、环烯基、环炔基、芳基和 / 或杂环基），其中两个或更多个碳是两个毗邻环共有的，例如该环是“稠环”。通过非相邻原子相连的环称作“桥联”环。多环的每个环可以被如上所述的取代基所取代，例如卤素、羟基、烷基羰氧基、芳基羰氧基、烷氧基羰氧基、芳氧基羰氧基、羧酸酯、烷基羰基、烷氧基羰基、烷基氨基羰基、芳烷基氨基羰基、烯基氨基羰基、烷基羰基、芳基羰基、芳烷基羰基、烯基羰基、氨基羰基、烷硫基羰基、烷氧基、磷酸酯、膦酸酯、次膦酸酯、氰基、氨基（包括烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基、和烷基芳基氨基）、酰氨基（包括烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、氨甲酰基和脲基）、脒基、亚氨基、巯基、烷硫基、芳基硫基、硫代羧酸酯、硫酸酯、烷基亚磺酰基、磺酸盐、胺磺酰基（sulfamoyl）、磺酰胺基、硝基、三氟甲基、氰基、叠氮基、杂环基、烷基、烷基芳基、或芳香族或杂芳族部分。

[0147] 术语“杂原子”包括除了碳或氢以外的任何元素的原子。优选的杂原子是氮、氧、硫和磷。

[0148] 术语“吸电子基团”或“吸电子原子”是本领域公认的，并且指取代基从相邻原子吸引价电子的倾向，即该取代基对于相邻原子是负电的。吸电子能力的水平的量化由Hammett

sigma (Σ) 常数给出。这一公知的常数描述于许多参考文献中,例如 J. March, Advanced Organic Chemistry, McGraw Hill Book Company, New York, (1977 版) 第 251–259 页。Hammett 常数值通常对于供电子基团是负的(对于 NH₂, $\Sigma [P] = -0.66$),而对于吸电子基团是正的(对于硝基基团, $\Sigma [P] = 0.78$),其中 $\Sigma [P]$ 指对位取代。吸电子基团的非限制性实例包括硝基、芳基、甲酰基、磺酰基、三氟甲基、氰基、氯化物、羧基、硫羧基、酯、亚氨基、酰胺基、羧酸、磺酸、亚磺酸、氨基磺酸、磷酸、硼酸、硫酸酯、羟基、氢硫基、氰基、氰酸酯、硫氰酸酯、异氰酸酯、异硫氰酸酯、碳酸酯、硝酸酯和硝基基团等。吸电子原子的实例包括但不限于,氧原子、氮原子、硫原子或卤素原子如氟、氯、溴或碘原子。应理解,除非另有指明,否则在此对于酸性官能团的引用也包括该官能团与适当阳离子组合的盐。

[0149] 此外,短语“其任何组合”表示任何数量的所列举官能团和分子可组合来产生较大的分子结构。例如,术语“苯基”、“羧基”(或“=O”)、“-O-”、“-OH”和 C1–6(即 -CH₃ 和 -CH₂CH₂CH₂-) 可以组合以形成 3- 甲氧基 -4- 丙氧基苯甲酸取代物。应理解的是,当组合官能团和分子来产生较大分子结构时,可以按需要除去氢或加入氢以满足每个原子的化合价。

[0150] 在此公开内容的描述应理解为与化学结合的法则和原理相一致。例如,可能需要除去氢原子以在任何给定位置容纳取代基。此外,应理解对于变量(即“R 基团”的定义以及本发明通式(即通式 I 或 II)的键位置将符合本领域已知的化学结合法则。也应理解所有上述本发明的化合物还将按需要包括在相邻原子之间的键和 / 或氢以满足每个原子的化合价。也就是说,加入键和 / 或氢原子以向每一下面的原子类型提供下面的总键数:碳:四键;氮:三键;氧:双键;和硫:二 - 六键。

[0151] 应指出的是,本发明的一些化合物的结构包括不对称碳原子。因此应理解由此不对称性产生的异构体(isomer)(例如所有的对映异构体、立体异构体、旋转异构体、互变异构体、非对映体、或外消旋物)包括在本发明的范围内。此种异构体可以通过经典分离技术以及通过立体化学控制合成而以基本上纯形式获得。此外,本申请中讨论的结构和其他化合物和部分也包括它们的所有互变异构体。在此所述的化合物可通过本领域已知的合成策略所获得。

[0152] 也应指出的是,本发明的一些化合物的取代基包括同分异构环结构。因此应理解,除非另有指示,否则特定取代基的组成性异构体包括在本发明的范围内。例如,术语“四唑”包括四唑、2H- 四唑、3H- 四唑、4H- 四唑和 5H- 四唑。

[0153] 在下面提供本说明书中使用的某些术语的定义。可从 U. S. Department of Energy, Office of Science, Human Genome Project 提供的术语表中找到其他术语的定义。在实践本发明时,使用分子生物学、微生物学和重组 DNA 中的许多常规技术。这些技术是公知的并且解释于,例如 Current Protocols in Molecular Biology, Vols. I–III, Ausubel 编, (1997);Sambrook 等人, Molecular Cloning :A Laboratory Manual, Second Edition(Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989);DNA Cloning :A Practical Approach, Vols. I 和 II, Glover D 编, (1985);Oligonucleotide Synthesis, Gait 编, (1984);Nucleic Acid Hybridization, Hames & Higgins 编, (1985);Transcription and Translation, Hames & Higgins 编, (1984);Animal Cell Culture, Freshney 编, (1986);Immobilized Cells and Enzymes(IRL Press, 1986);Perbal, A Practical Guide to

Molecular Cloning, the series, Methods in Enzymol. (Academic Press, Inc., 1984) ; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells, Miller and Calos 编, (Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1987) ; 和 Methods in Enzymology, Vols. 154 和 155, 分别由 Wu 和 Grossman, 以及 Wu 编。

[0154] 如在此使用,“报告子”基因与术语“标记基因”互换使用,并且是易于被检测的核酸和 / 或其编码易于被检测的基因产物,如荧光素酶。

[0155] 转录和翻译控制序列是提供用于在宿主细胞中表达编码序列的 DNA 调控序列,例如启动子、增强子、终止子等。在真核细胞中,聚腺苷酸化信号是控制序列。

[0156] “启动子序列”是能够在细胞中结合 RNA 聚合酶并且起始下游 (3' 方向) 编码序列的转录的 DNA 调控区。出于限定本发明的目的,启动子序列在其 3' 端结合转录起始位点并向上游 (5' 方向) 延伸以包括起始在背景之上可检测水平的转录所需的最小数量的碱基或元件。在启动子序列中,将找到转录起始位点 (例如通过用核酶 S1 定位而方便地限定),以及负责 RNA 聚合酶结合的蛋白结合结构域 (共有序列)。

[0157] 编码序列是当 RNA 聚合酶将编码序列转录成 mRNA 时,在细胞中“受控于”转录和翻译控制序列,该 mRNA 随后反式 -RNA 剪接并且翻译成由该编码序列编码的蛋白质。

[0158] 短语“药学可接受的”指当给予人类时,生理学上耐受的并且通常不产生过敏或类似不良反应,例如肠胃不适、头晕等的分子实体和组成。优选地,如在此使用,术语“药学可接受的”意指被联邦或国家政府的管理机构所批准的或列于美国 Pharmacopeia 或其他通常公认用于动物,并且尤其是人的药典。

[0159] 术语“载体”指与化合物一起给予的稀释剂、佐剂、赋形剂或介载体。此种药学载体可以是灭菌液体,例如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。水或水性溶液盐水溶液和水性葡萄糖和甘油溶液优选地用作载体,尤其用于可注射的溶液。适合的药物载体由 E. W. Martin 描述于“Remington's Pharmaceutical Sciences”。

[0160] 短语“治疗有效量”和“有效量”在此用于意指足以使宿主的活性、功能和反应的临床显著缺乏降低至少约 15%, 优选至少 50%, 更优选至少 90%, 和最优选阻止该临床显著缺乏的量。或者,治疗有效量是足以造成宿主中临床显著状况 / 症状改善的量。

[0161] “试剂”指可用于制备药学和诊断组合物的所有物质,或者它们可为化合物、核酸 (包括抑制性核酸如 shRNA、RNAi 等)、小分子、多肽、片段、同种型、变体或其他可独立用于此目的的物质,所有都根据本发明。

[0162] 如在此使用,“调节物”可以是任何能够增强或减少 Axin 稳定,并且从而影响 Wnt 信号的物质,包括但不限于药物、化合物、蛋白质或肽。该调节物能够以它可增强或抑制 Wnt 信号的方式而与 Axin 直接或间接相互作用。

[0163] “衍生的”指化合物、蛋白或多肽,其包括通过引入氨基酸残基取代、缺失或添加而改变了的亲代蛋白质或多肽的氨基酸序列,或者通过引入核苷酸取代或缺失,添加或突变而改变的核酸或核苷酸。衍生的核酸、核苷酸、蛋白质或多肽拥有与亲代多肽相似或相同的功能。

[0164] 如在此使用,术语“双链 RNA”或“dsRNA”指具有包括两个反平行且基本上互补的 (如上所限定) 核酸链的双链结构的核糖核酸分子的复合体,。形成该双链结构的双链可为

一个较大 RNA 分子的不同部分,或者它们可为单独的 RNA 分子。分辨 RNA 分子时,此 siRNA 通常在文献中称 siRNA(“短干涉 RNA”)。当两条链是一个较大分子的一部分并且因此通过在形成该双链结构的一条链的 3' 端和各自另一链的 5' 端之间未被打断的核苷酸链来连接时,连接 RNA 链称“发夹环”,“短发夹 RNA”或“shRNA”。当两条链通过在形成该双链结构的一条链的 3' 端和各自另一链的 5' 端之间未被打断的核苷酸链进行连接以外的手段共价连接时,该连接结构称作“接头”。RNA 链可具有相同或不同数目的核苷酸。碱基对的最大数目是 siRNA 的最短链中的核苷酸数目减去存在于该双链中的任何突出端。除了双链结构,siRNA 还可包括一个或多个核苷酸突出端。此外,如在说明书中所使用,“siRNA”可包括对于核糖核苷酸的化学修饰,包括在多个核苷酸处的实质修饰和包括在此所公开的或本领域已知的所有类型的修饰。出于本说明书和权利要求书的目的,“siRNA”包含任何此种修饰,如用于 siRNA 类型分子。

[0165] 如在此使用,“核苷酸突出端”指未配对的核苷酸或当 siRNA 的一条链的 3' 端延伸超出另一条链的 5' 端,或反过来时,从双链结构的 siRNA 突出的核苷酸。“平头”或“平头末端”指在 siRNA 的末端没有未配对的核苷酸,即没有核苷酸突出端。“平头末端的” siRNA 是在其全长上为双链的 siRNA,即在分子任一末端都没有核苷酸突出端。为了清楚,在确定 siRNA 是具有突出或是平头末端时,不考虑连接到 siRNA 的 3' 端或 5' 端的化学帽或非核苷酸化学部分。

[0166] 术语“反义链”指包括基本上与靶序列互补的区域的 siRNA 链。如在此使用,术语“互补区”指反义链上与一序列如靶序列(如在此所限定)基本上互补的区域。在互补区与靶序列不完全互补时,主要在端部区域容许错配,并且如果存在,错配通常在端部区域,例如在 5' 和 / 或 3' 端的 6、5、4、3 或 2 个核苷酸中。

[0167] 如在此使用,术语“有义链”指包括与反义链的一区域基本上互补的区域的 siRNA 链。

[0168] 当将“导入细胞中”用于指 siRNA 时,意指促进进入细胞中的摄取或吸收,如被本领域熟练技术人员所理解。siRNA 的吸收或摄取可以通过非辅助扩散或主动的细胞过程,或者通过辅助试剂或装置来发生。这一术语的含义并不限于体外细胞; siRNA 也可被“导入细胞中”,其中该细胞是活生物体的部分。在此种情况下,导入细胞中将包括递送到生物体中。例如,用于体内递送, siRNA 可以注射到组织位点或全身给予。体外导入细胞中包括本领域已知的方法,例如电穿孔和脂转染。

[0169] 术语“结合”指一组分(例如 Axin 蛋白质)与另一组分(例如 Axin 相关蛋白)的物理相连。结合的测量可以导致诸如解离常数、缔合常数、缔合速率、解离速率的数值。

[0170] 如在此使用,术语“允许该结合的条件 ”指会发生结合时的诸如温度、盐浓度、pH 和蛋白浓度的条件。确切的结合条件将根据检测法性质而改变,例如该检测法是使用纯蛋白还是仅部分纯化的蛋白。用于结合的温度可以从 15°C 至 37°C 变化,但将优选在室温和约 30°C 之间。在结合反应中 Axin 的浓度也将改变,但将优选为约 10pM 至 10nM(例如,在使用放射标记组分的反应中)。

[0171] 如该术语在此所使用,如果结合以 Kd 为 1mM 或更少,通常在 100nM 至 10pM 的范围发生,那么它是“特异的”。例如如果 Kd 是 100nM、50nM、10nM、1nM、950pM、900pM、850pM、800pM、750pM、700pM、650pM、600pM、550pM、500pM、450pM、350pM、300pM、250pM、200pM、

150pM、100pM、75pM、50pM、25pM、10pM 或更少,那么结合是特异的。

[0172] 如在此使用,“表达”包括但不限于下述一种或多种:基因转录成前体 mRNA;前体 mRNA 的剪接和其他加工以产生成熟的 mRNA;mRNA 稳定性;成熟 mRNA 翻译成蛋白质(包括密码子使用和 tRNA 可利用性);以及翻译产物的糖基化和/或其他修饰,如果为适当表达和功能所需。

[0173] 如在此使用,术语“突变体”意指任何作为突变(例如,单核苷酸多态性(“SNP”))的结果从野生型的遗传性变异。术语“突变体”和术语“标记”、“生物标记”以及“靶标”贯穿说明书互换使用。

[0174] Wnt 信号转导途径

[0175] Wnt 基因家族编码一大类与 Int1/Wnt1 原癌基因和果蝇无翅(“Wg”,果蝇 Wnt1 同源物)相关的分泌蛋白(Cadigan 等人,(1997)Genes&Development 11:3286-3305)。Wnt 在多种组织和器官中表达并且是许多发育过程所需的,包括果蝇分节;秀丽线虫的内胚层发育;以及哺乳动物的肢翼极性的建立、神经嵴分化、肾形态发生、性别决定和脑发育(Parr 等人,(1994)Curr. Opinion Genetics&Devel. 4:523-528)。Wnt 途径是动物发育(胚胎发生期间和成熟生物体中)的主要调控物(Eastman 等人,(1999)Curr Opin Cell Biol 11:233-240;Peifer 等人,(2000)Science 287:1606-1609)。

[0176] Wnt 信号通过 Frizzled(“Fz”)家族的七跨膜结构域受体来转导(Bhanot 等人,(1996)Nature 382:225-230)。Wnt 配体结合 Fzd,并且由此使得胞质蛋白蓬乱蛋白(在人和鼠中,Dvl-1,2 和 3)活化(Boutros 等人,(1999)Mech Dev 83:27-37)以及使 LRP5/6 磷酸化。由此产生阻止 Armadillo/β-连环蛋白磷酸化和降解的信号,这接下来造成 β-连环蛋白的稳定(Perrimon(1994)Cell 76:781-784)。这一稳定由 Dvl 与 axin 的关联所引起(Zeng 等人,(1997)Cell 90:181-192),Axin 是使得多种蛋白到一起的支架蛋白,包括 GSK3、APC、CK1 和 β-连环蛋白,以形成 β-连环蛋白破坏复合体。进化保守的典型 Wnt/β-连环蛋白信号转导级联控制后生动物发育的许多方面。该途径的前后(context)依赖的活化涉及胚细胞命运决定、干细胞调控和组织内稳态。Wnt/β-连环蛋白途径的关键特征是通过 β-连环蛋白破坏复合体使下游效应子 β-连环蛋白受调控地蛋白水解。β-连环蛋白破坏复合体的主要组分是结肠腺瘤样息肉(APC)、Axin 和 GSK3 α / β。在没有 Wnt 途径活化时,胞质 β-连环蛋白被组成型地磷酸化并被靶向降解。在 Wnt 刺激时,β-连环蛋白破坏复合体分离,这导致 β-连环蛋白的核积累和 Wnt 途径反应性基因的转录。

[0177] 在许多癌症中观察到由 Wnt 蛋白质过表达或影响 β-连环蛋白破坏复合体组分的突变所介导的途径的不恰当失活(Polakis, P. (2007) Curr Opin Genet Dev 17, 45-51)。显然,肿瘤抑制物 APC 的截短突变是结直肠癌中最盛行的遗传改变。此外,分别在患有肝癌和结直肠癌的患者中鉴定出了 Axin1 和 Axin2 突变。(Taniguchi, K. 等人,(2002)Oncogene 21, 4863-71;Liu, W. 等人,(2000)Nat Genet 26, 146-7;Lammi, L. 等人,(2004)Am J Hum Genet 74)。这些体细胞突变导致 β-连环蛋白的非 Wnt- 依赖型稳定以及 β-连环蛋白- 介导的转录的组成型活化。

[0178] 通过 β-连环蛋白的稳定的异常 Wnt 途径活化对许多结直肠癌的肿瘤发生起核心作用。估计 80% 的结直肠癌(CRC) 带有肿瘤抑制物 APC 失活突变,这使得不打断 Wnt 信号。此外,存在越来越多的证据表明 Wnt- 途径活化可涉及黑素瘤、乳腺癌、肝癌、肺癌和胃

癌。在 Wnt、正常发育和癌症之间存在长期公认的联系,通过将 c-Myc 原癌基因鉴定为 Wnt 信号的靶标进一步确立了此联系 (He 等人, (1998) *Science* 281 :1509–3512)。

[0179] 此外,其他紊乱与异常 Wnt 信号相关联,包括但不限于骨质疏松症、骨关节炎、多囊肾疾病、糖尿病、精神分裂症、血管疾病、心脏疾病、非致癌的增生性疾病、以及神经退行性疾病如阿尔茨海默氏病。

[0180] Axin

[0181] Axin 是 Wnt 信号的关键调控物,它起引领 β -连环蛋白破坏复合体的蛋白组分 (GSK3、APC、CK1、和 β -连环蛋白) 到一起的作用。糖原合酶激酶 3(GSK3, 在果蝇中为 shaggy), 肿瘤抑制物基因产物 APC(结肠腺瘤样息肉) (Gumbiner (1997) *Curr. Biol.* 7 : R443–436), 和 Axin 都是 Wnt 途径的负调控物。在没有 Wnt 配体时,这些蛋白形成 β -连环蛋白破坏复合体并且促进 β -连环蛋白的磷酸化和降解,而 Wnt 信号使得该复合体失活并阻止 β -连环蛋白降解。结果是,稳定的 β -连环蛋白转运到核中, β -连环蛋白在该核中结合 TCF(T 细胞因子) 转录因子(也称作淋巴增强子结合因子-1(LEF1)) 并用作 TCF/LEF-诱导的转录的辅活化子 (Bienz 等人, (2000) *Cell* 103 :311–320 ;Polakis 等人, (2000) *Genes Dev* 14 :1837–1851)。

[0182] 多-蛋白破坏复合体的有效组装取决于其主要组分的稳态水平。以将 Axin 报道为调控 β -连环蛋白破坏复合体的效力的浓度限制因子,并且增加的 Axin 表达可以增强表达截短 APC 的细胞系中的 β -连环蛋白降解。(Salic, A. 等人, (2000) *Mol Cell* 5, 523–32 ; Lee, E. 等人, (2003) *PLoS Biol* 1, E10 ;Behrens, J. 等人, (1998) *Science* 280, 596–9 ; Kishida, M. 等人, (1999) *Oncogene* 18, 979–85)。因此,可能需要紧密地调控 Axin 蛋白水平以保证适当的 WNT 途径信号。为了这一原因,端锚聚合酶抑制物如 XAV939 是 Wnt 途径信号的有效调节物。

[0183] 如在此使用,使用化学基因和蛋白质组 (proteomic) 方法来研究 Wnt 信号途径的新型调节物。如附图所述、所示,以及在此实验所述,Axin 稳定是强力的机制,通过它来调节 Wnt 信号。鉴定出低分子量化合物,该化合物可以通过抑制端锚聚合酶 (TNKS) 来延长 Axin 的半衰期和促进 β -连环蛋白降解。此外,揭示出控制 Axin 蛋白稳定性的新机制,其治疗应用为治疗 WNT 途径依赖的癌症带来希望。

[0184] 人 Axin 基因编码与鼠蛋白质有 87 % 同一性的 900 个氨基酸的多肽(称作“fused”(fu),并且显示出造成纯合的鼠胚胎中的轴复制)。该序列也含有 G 蛋白信号结构域 (RGS 结构域,其结合 APC) 的调节物、GSK3 结合结构域、 β -连环蛋白结合结构域、DIX 结构域(参与自身寡聚化)和与果蝇以及脊椎动物‘蓬乱蛋白’蛋白质的邻近 N 端的保守序列具有同源性的 C 端区域。并且尽管该序列含有双向核定位信号,但是已知 Axin 并不定位于核中。(Zeng 等人, (1997) *Cell* 90 :181)。

[0185] 如在此所述,发现包括 Axin 内的最保守片段的氨基酸的 Axin1 的小 N 端区域(氨基酸 19–30)是与端锚聚合酶相互作用所需的,并且足以进行该相互作用。Axin1 通过这一小 N- 端结构域与 TNKS1 的特异相互作用进一步通过 GST pull-down 和共免疫沉淀检测法被证实,该结构域在此被称作 TBD(端锚聚合酶 - 结合结构域)。

[0186] Axin 以至少两种形式 Axin1 和 Axin2(在非人物种中也称作 Axil 或传导蛋白 (conductin)) 之一存在。Axin1 和 Axin2 蛋白具有约 45% 的氨基酸同一性以及实质上相

同的调控 β -连环蛋白水平的功能。然而,不同于 Axin2,并不认为 Axin1 是 β -连环蛋白-TCF 调控的基因。此外,Axin2 在调控 Wnt 信号的反馈抑制物途径的功能有助于相信在 Wnt 途径活化对 Axin1 与 Axin2 的作用之间可能存在潜在的功能差异。

[0187] 本发明化合物用作 Axin 稳定物,如贯穿本申请实验性地阐述。所述化合物增加 Axin 的蛋白水平。发现通过多种检测而被鉴定为 Wnt 拮抗剂的化合物通过 Axin 稳定来起作用。这一机制的发现和确认产生了本发明的方法。

[0188] 在大量小分子黑盒筛选中发现本发明的化合物抑制 Wnt 信号。使用稳定转染有 TCF 荧光素酶报告子 SuperTopflash 的 SW480 细胞(具有 APC 截短的结肠癌细胞系)进行一种筛选。SW480 是 APC 缺陷的人结肠癌系并且表征为组成型、非配体依赖型 Wnt 信号。该信号来自稳定 β -连环蛋白在核中的异常积累,因为 β -连环蛋白并不如在正常细胞中一样被 β -连环蛋白破坏复合体所磷酸化和降解。

[0189] 另外,发现本发明的化合物在具有完整的 Wnt 信号途径的细胞系(例如 293T 细胞)中抑制 Wnt 信号。使用用 Wnt3a 条件培养基处理的 293T-STF 细胞来进行另一筛选。在这一筛选中,发现化合物在没有活化的 Wnt 信号的细胞(293T 细胞)中稳定 Axin。这以及抑制性试剂(例如 RNAi 和 Wnt 抑制物蛋白)的使用导致相信本发明的 Axin 稳定物不是 Wnt 抑制本身的结果,其中发现该抑制性试剂以不同水平阻断 Wnt 信号而没有相伴的 Axin 稳定。

[0190] 如在此所述,本发明的 Axin 稳定物(例如本发明的化合物)通过 GSK-3 依赖的机制诱导 β -连环蛋白在结肠癌细胞(例如 SW480 细胞)中的磷酸化和降解。所述稳定物在体外细胞培养检测中抑制结肠癌细胞的生长。在本发明的一个实施方案中,所述稳定物增加通过 GSK3 的 Axin 磷酸化,这再稳定 Axin 并增加 Axin 和 β -连环蛋白之间的相互作用。这导致 β -连环蛋白的加速磷酸化和降解。

[0191] TNKS 的催化活性与 Axin 的稳定性相关联,并且 Axin 和 TNKS 在共免疫沉淀实验中以及在酵母双杂交体系中显示出相互结合。

[0192] 端锚聚合酶(TNKS)

[0193] “端锚聚合酶”(与 TRF1 相互作用的锚蛋白相关的 ADP 核糖聚合酶的缩写)是拥有聚 ADP-核糖化活性的分子支架蛋白。已知根据它在非极性细胞的高尔基体中的定位来调控囊泡运输(例如,新合成蛋白的靶向递送)。(Yeh 等人, (2006) Biochem. J. 399 :415)。也可以在端粒、中心体、和核孔处发现 TNKS。TNKS 在有丝分裂分离中起重要调控作用,并且通过改变端粒长度负调控物 TRF1 来调节端粒动态平衡(Smith 等人, (1998) Science 282 :1484) (Dyneek 等人, (2004) Science 304 :97)。

[0194] TNKS1 和 2 是分别包括 1,327 和 1,166 个残基的蛋白质。它们也分别被称作 PARP-5a 和 -5b。该蛋白质共享约 83% 的序列同一性,并且主要区别于没有只在 TNK1 中存在的富含组氨酸 / 脯氨酸 / 丝氨酸(HPS)的结构域。两种蛋白都具有 24 个锚蛋白-型重复用于底物结合,参与自身寡聚化的不育 α 基序(SAM)结构域,以及 C 端聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)同源物结构域用于催化活性。NAD⁺结合和催化所需的关键残基在两种蛋白质之间是完全保守的。结合伴侣包括 IRAP(牵涉胰岛素信号)、Grb14(牵涉胰岛素信号)、NuMA(牵涉细胞周期)、和 Mcl-1(牵涉凋亡)。

[0195] 在此描述的酵母双杂交检测揭示了需要跨 TNKS1 的 III、IV、和 V 锚蛋白重复结构

域的区域并且该区域对于它与 Axin1 相互作用是足够的。此外,发现 β -连环蛋白稳定需要 TNKS1 的 Axin 结合结构域和 SAM 结构域,而非 PARP 结构域。

[0196] TNKS1 和 TNKS2 在调控 Axin 蛋白水平上冗余地起作用。如至少在 SW480、HEK293、和 DLD-1 细胞 (在此所述) 中所表明, TNKS1 和 TNKS2 需要被共同消耗以便增加 β -连环蛋白磷酸化,减少 β -连环蛋白丰度,和抑制 β -连环蛋白靶基因的转录。TNKS1 或 TNKS2 单独的消耗不导致增加的 Axin1/2 蛋白水平。

[0197] TNKS1 和 TNKS2 属于称作聚 (ADP-核糖) 聚合酶或 PARP 的 NAD⁺ 依赖的酶家族,其以 ADP-核糖聚合物修饰自身和其他底物蛋白 (Schreiber 等人, (2006) Nature Reviews Molecular Cell Biology ;7(7) :517)。ADP-核糖聚合物 (也称作聚 ADP-核糖化,或聚 (ADP-核糖) 化) 的添加是在细胞分裂、能量代谢和细胞内运输期间调控细胞存活和细胞死亡功能、转录调控、端粒黏附和有丝分裂纺锤体形成的翻译后修饰。

[0198] 在若干情形下,已将靶蛋白的聚 (ADP-核糖) 化与泛素依赖的降解相关联。例如,TRF1 通过 TNKS1 的聚 (ADP-核糖) 化将 TRF1 与端粒分离并促进其降解。(Smith S 等人, (1998) Science ;282(5393) :1484)。另外, TNKS 的自-聚 (ADP-核糖) 化促进 TNKS 的降解。(Yeh TYJ 等人, (2006) Biochemical Journal ;399 :415)。

[0199] 如通过在此所述的 siRNA-拯救方法而实验性地表明,需要端锚聚合酶的催化 (聚 ADP-核糖化) 活性来调控 Axin 蛋白水平和 Wnt 途径信号。所述催化活性通过端锚聚合酶抑制物如 XAV939 的抑制导致 Axin 稳定性,以及随后的 β -连环蛋白降解和 Wnt 信号的终止。端锚聚合酶抑制物如 XAV939 事实上在 TNKS 1/2 的催化性 PARP 结构域处与其紧密结合。端锚聚合酶抑制物如 XAV939 也阻碍 TNKS1/2 的自-聚 ADP-核糖化能力,并事实上可以增加 TNKS 蛋白水平而同时废除它们的催化功能。

[0200] 端锚聚合酶 (TNKS) 抑制和 Wnt 信号抑制

[0201] 通过在此所述的共免疫沉淀实验,发现在 SW480 细胞中 TNKS1/2 与 Axin2 相关联,而通过在此所述的酵母双杂交检测实验,证明了 Axin1/2 和 TNKS1/2 之间的强结合。由在 Axin 中进化保守的“端锚聚合酶结合结构域”(TBD) 所介导的 Axin 和 TNKS 之间的物理相互作用对于体内调控 Axin 蛋白水平是至关重要的。如在此所表明 (例如,通过 siRNA 实验), TNKS 1/2 是唯一的影响 Axin 稳定性的 PARP 家族成员。

[0202] 如在此所述,端锚聚合酶抑制物 (例如 XAV939) 增加 GSK3 β -Axin 复合体形成并且从而促进 GSK3 β -依赖的磷酸化和 β -连环蛋白的蛋白酶体 () 降解。这甚至在 APC 功能损害的细胞 (例如结直肠细胞系 SW480, 其带有截短的 APC 等位基因) 中发生,因为端锚聚合酶抑制物 (例如 XAV939) 可以挽救细胞本来缺乏降解 β -连环蛋白的能力。端锚聚合酶抑制物如 XAV939 物理地与 TNKS 1/2 相互作用 (如在此所示,例如在荧光偏振检测中),并且能够在 β -连环蛋白破坏复合体的上游和在该复合体的水平上起作用;它们造成 Axin 蛋白水平的增加,而没有 Axin 转录物水平的相应增加。

[0203] 如在此更详细的描述,附图所示,以及在此实验性地表明,揭示了 TNKS1/2 是 Axin 稳定物 (包括 Axin-稳定小分子、抑制性核酸和融合蛋白) 的有效靶标。结合并抑制 TNKS1/2 的催化活性的化合物,以及抗 TNKS1/2 的 siRNA 稳定 Axin,同时促进 β -连环蛋白的磷酸化和降解。

[0204] TNKS拮抗剂优选地通过降低或抑制 TNKS 蛋白的催化活性 (例如,它们使靶蛋白如

Axin 聚 ADP- 核糖化的能力, 以及它们自 - 聚 ADP- 核糖化的能力), 而非通过降低 TNKS 蛋白或转录物水平来起作用。如在此实验性地描述, TNKS 物理性地与 Axin 相关联并且需要它的聚 ADP- 核糖化的能力用来调控 Axin 蛋白水平。TNKS 促进 Axin 的泛素化和降解, 这可至少部分地, 通过 Axin 或泛素 - 蛋白酶体途径的组分的直接聚 ADP- 核糖化而被介导。

[0205] 简言之, 端锚聚合酶抑制物如 XAV939 以与 β - 连环蛋白 siRNA 类似的方式增加 Axin 蛋白水平, 增加磷酸化 - β - 连环蛋白、减少胞质 β - 连环蛋白、和影响 β - 连环蛋白靶基因。

[0206] 筛选检测

[0207] 本发明提供了鉴定例如通过 Axin 稳定和 / 或 TNKS 催化活性的废除来调节 Wnt 信号转导的调节物 (即候选者或检测化合物或试剂, 如肽、类肽物、小分子或其他药物) 的方法 (在此也称作 “ 筛选检测法 ”) 。在一个实施方案中, 所述筛选方法鉴定能够调节 Axin 稳定和 / 或 TNKS 催化活性随后能够调节 Wnt 途径信号的试剂。反过来, 通过本发明方法发现的 Axin 去稳定物可以用来传播 (propagate) 、增强或者促进 Wnt 信号。

[0208] Wnt 的调节物 (如 Axin 稳定的调节物, TNKS 调节物) 可以包括如激动剂和 / 或拮抗剂, 并且可以包括小分子 (如本发明的化合物), 抑制性核酸和融合蛋白。在本发明的实施例部分详细地描述了本发明方法的应用的实例。

[0209] 如在此使用, 术语 Wnt 信号的 “ 激动剂 ” 或 “ 模拟物 ” 意指对 TNKS 具有促进作用 (例如增强 TNKS 的催化特性), 和 / 或对于 Axin 具有去稳定作用, 并因此模拟或上调 (例如加强或补充) Wnt 信号的试剂。所述 Wnt 激动剂抑制、减少或遏制 Axin 生物活性 (例如其使 β - 连环蛋白泛素化和降解的能力), 和 / 或促进 TNKS 活性 (例如其聚 ADP- 核糖化的能力), 和 / 或导致 Axin 去稳定。 “ 模拟物 ” 和 “ 激动剂 ” 包括但不限于多肽、肽、脂、碳水化合物、核苷酸和小的有机分子。候选的模拟物可以是天然或合成的化合物, 包括如合成的小分子, 在动物、植物、细菌或真菌细胞的提取物中所含的化合物, 以及来自此种细胞的条件培养基。

[0210] Wnt 激动剂可能能够打断 Axin 蛋白和通常与它相关联的其它 Wnt 信号蛋白 (如 GSK3 、 APC 、 Dvl) 之间的结合事件或复合体形成 (即 Wnt 激动剂打断 β - 连环蛋白破坏复合体) 。所述激动剂能够作用于 β -cat 稳定和传播或促进 Wnt 信号转导。或者, Wnt 激动剂可以是增强 TNKS 催化活性的化合物或试剂。

[0211] 如在此使用, 术语 Wnt 信号的 “ 拮抗剂 ” 或 “ 抑制物 ” 意指由于它对 Axin 的稳定作用和 / 或它对 TNKS 的对抗作用而抑制、妨碍或者负调控 Wnt 信号的试剂。所述 Wnt 拮抗剂可以是废除 TNKS 蛋白的催化 (例如聚 ADP- 核糖化) 活性, 或者模拟 Axin 蛋白的生物活性 (例如形成 β - 连环蛋白破坏复合体) 的化合物或试剂。 “ 抑制物 ” 和 “ 拮抗剂 ” 可为通过一途径来减少、阻断或阻止信号 (如 Wnt 信号), 和 / 或阻止形成蛋白相互作用和复合体的试剂。

[0212] 在一个实施方案中, 本发明提供筛选结合或调节 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白或多肽或其生物活性蛋白的活性的候选物或检测化合物的检测法。作为实例, 本发明提供筛选能够调节 Axin 和 / 或 TNKS 稳定的候选或检测化合物或试剂的检测法。

[0213] 在另一实施方案中, 本发明提供用于 Axin 蛋白稳定性和 / 或水平筛选的检测法, 其可以用作初级或二级 (复筛选 (counterscreen)) 检测。例如, 可以使用荧光素酶报告子

作为初级筛选的一部分,随后用 Axin 蛋白稳定性和 / 或水平筛选作为复筛选。Axin 融合蛋白如 Axin-GFP、Axin- 荧光素酶、Axin-Renilla 等可以在细胞中产生并表达,并且随后用化合物处理以观察 Axin 是否稳定。

[0214] 在另一实施方案中,Axin 融合蛋白如 Axin-GFP、Axin- 荧光素酶、Axin-Renilla 等可以被产生并用于体外 Axin 降解检测。所述检测法使用来自培养细胞、组织或胚胎的提取物,随后用化合物处理它们以观察 Axin 融合蛋白水平是否受到影响。

[0215] 在此,例如在实施例部分描述了用于 Wnt/β-连环蛋白途径的小分子抑制物的筛选检测法的具体实例,例如在 HEK293 细胞中使用 Wnt- 反应性 Super-Topflash(STF) 荧光素酶报告子。

[0216] 本发明的检测化合物可以使用本领域已知的组合库法的诸多方法中任一而获得,包括:生物文库;空间可寻址平行固相(spatially addressable parallel solid phase)或溶液相文库;需要重叠合的合成文库法;“一珠一化合物”文库法;以及使用亲和色谱选择的合成文库法。生物文库法限于肽文库,而其他四种方法可应用于肽、非肽寡聚物或化合物的小分子文库(Lam, K. S. (1997) Anticancer Drug Des. 12 :145)。

[0217] 可以从本领域找到合成分子文库的方法的实例,例如在:DeWitt 等人,(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90 :6909 ;Erb 等人,(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 :11422 ;Zuckermann 等人,(1994) J. Med. Chem. 37 :2678 ;Cho 等人,(1993) Science 261 :1303 ;Carrell 等人,(1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33 :2059 ;Carell 等人,(1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33 :2061 ;和在 Gallop 等人,(1994) J. Med. Chem. 37 :1233。

[0218] 化合物文库可存在于溶液中(例如,Houghten(1992) Biotechniques 13 :412-421)、或者在珠上(Lam(1991) Nature 354 :82-84)、芯片上(Fodor(1993) Nature 364 :555-556)、细菌上(Ladner U. S. Pat. No. 5,223,409)、孢子上(Ladner U. S. Pat. No. '409)、质粒上(Cull 等人,(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 :1865-1869)或在噬菌体上(Scott and Smith(1990) Science 249 :386-390);(Devlin(1990) Science 249 :404-406);(Cwirla 等人,(1990) Proc. Natl. Acad. Sci. 87 :6378-6382);(Felici(1991) J. Mol. Biol. 222 :301-310);(Ladner 上文)。

[0219] 在一个实施方案中,检测法是基于细胞的检测法,其中将在其表面上表达 Wnt 受体(如 Fzd)的细胞与检测试剂接触,并测定该检测试剂调节 Wnt 信号的能力(例如通过测量 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白水平的改变,或 Axin 和 / 或 TNKS 与 Axin 相关蛋白的关联的改变)。在另一实施方案中,通过例如测量 Axin 被 GSK3 磷酸化的改变(例如通过使用磷酸化特异的抗 Axin 抗体)来测定该检测试剂调节 Wnt 信号的能力。在又另一实施方案中,通过例如测量 β- 连环蛋白的磷酸化和降解(和 / 或其任何改变)来测定该检测试剂调节 Wnt 信号的能力。

[0220] 作为非限制性实例,如通过使用本发明方法所发现,能够抑制 Wnt 信号的试剂将展现稳定 Axin 和 / 或对抗 TNKS 的能力。所述稳定将表现为,例如总 β- 连环蛋白水平的减少,和 / 或磷酸化 -β- 连环蛋白水平(即磷酸化 β- 连环蛋白)的增加。所述稳定也将表现为,例如 Axin 蛋白水平的增加,TNKS 催化活性的减少,和 / 或 Axin-GSK3 复合体形成的增加。

[0221] 例如,细胞可以是哺乳动物来源或酵母细胞。例如可以通过将检测试剂和放射性

同位素或酶标记相偶联,以便可以通过检测复合体中标记试剂来测定检测化合物与 Axin 蛋白的结合,从而实现对检测试剂与 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白结合能力的测定。例如,检测试剂可以用 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^3H 直接或间接标记,并且通过放射性发射的直接计数或通过闪烁计数来检测放射性同位素。或者,检测试剂可以用例如辣根过氧化酶、碱性磷酸酶或荧光素酶进行酶标记,并且通过测定适当底物向产物的转化来检测该酶标记。

[0222] 不标记任何相互作用物而测定检测试剂调节 Wnt 信号(例如与 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白相互作用)的能力也在本发明的范围内。例如,可以使用微生理仪(microphysiometer)来检测 Axin 或 TNKS 与检测试剂的相互作用而不用标记该检测试剂或蛋白。(McConnell, H. M. 等人, (1992) *Science* 257 :1906-1912)。如在此使用,“微生理仪”(例如 Cytosensor. TM.)是使用光寻址电位传感器(LAPS)来测量细胞使其环境酸化速率的分析仪器。这一酸化速率的改变可以用作配体和受体之间,TNKS 和 TNKS 相关蛋白之间,或者 Axin 和 Axin 相关蛋白之间相互作用的指示物。

[0223] 在一个实施方案中,该检测包括将表达 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白的细胞与已知在正常条件下与 Axin 和 / 或 TNKS 相关联的蛋白(例如本文描述的 Axin 关联蛋白),或其生物活性部分相接触,以形成检测混合物;将该检测混合物与检测试剂相接触;和测定该检测试剂与 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白相互作用的能力,其中测定所述相互作用包括测定该检测试剂打断所述 Axin 蛋白和所述 Axin 相关蛋白、或其生物活性部分之间的结合事件的能力。对正常的 Axin:Axin 相关蛋白结合事件,和 / 或 TNKS:TNKS 相关蛋白结合事件的打断可以通过与正常状态(即没有检测试剂的状态)相比的 β -连环蛋白磷酸化的改变来测量。

[0224] 在另一实施方案中,检测法是基于细胞的检测法,包括将表达 Axin 靶分子(例如 β -cat)和 / 或 TNKS 靶分子的细胞与检测试剂相接触,并测定该检测试剂调节(例如刺激或抑制)Axin 和 / 或 TNKS 靶分子活性的能力。对检测化合物调节 Axin 和 / 或 TNKS 靶分子活性的能力的测定可例如,通过比较该检测试剂存在和不存在下的 β -cat 磷酸化水平来实现。

[0225] 对 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白结合 Axin 和 / 或 TNKS 靶分子和 / 或 Axin 相关蛋白或与它们相互作用的能力的测定可以通过上述测定直接结合的方法之一来实现。在一个实施方案中,对 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白结合 Axin 和 / 或 TNKS 靶分子和 / 或 Axin 相关蛋白或与它们相互作用的能力的测定可以通过测定靶分子活性来实现。例如,靶分子活性可以通过检测该靶标的细胞二级信使(即细胞内 Ca^{2+} 、二酰基丙三醇、 IP_3 等)的诱导、检测该靶标对适当底物的催化 / 酶促活性、检测报告基因(包括与编码可检测的标记如荧光素酶有效连接的调控元件)的诱导、或者检测细胞反应,例如发育、分化或增殖速率。

[0226] 在又另一实施方案中,本发明的检测法是无细胞检测法,其中 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白或其生物活性部分与检测试剂相接触,并且测定该检测化合物结合 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白或其生物活性部分的能力。该检测化合物对 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白的结合可以按上述直接或间接测定。在优选的实施方案中,该检测法包括将 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白或其生物活性部分与结合 Axin 和 / 或 TNKS 的已知化合物相接触以形成检测混合物,将该检测混合物与检测化合物相接触,和测定该检测化合物与 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白相互作用的能力,其中测定该检测化合物与 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白相互作用的能力包括测定该检测化合物相比于已知化合物,优先结合 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白或其生物活性部分的能力。

[0227] 在另一实施方案中,该检测法是无细胞检测法,其中 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白或其生物活性部分与检测化合物相接触,并且测定该检测化合物调节(例如刺激或抑制)Axin 和 / 或 TNKS 蛋白或其生物活性部分活性的能力。对该检测化合物调节 Axin 蛋白活性的能力的测定可以通过,例如由上述测定直接结合的方法之一来测定 Axin 蛋白结合靶分子或与 Axin 相关和 / 或 TNKS 相关蛋白相互作用的能力而实现。对 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白结合靶分子的能力的测定也可以使用诸如实时生物分子间相互作用分析(Biomolecular Interaction Analysis(BIA))来实现。Sjolander, S. 和 Urbaniczky, C. (1991) Anal. Chem. 63 :2338-2345 以及 Szabo 等人, (1995) Curr. Opin. Struct. Biol. 5 :699-705。如在此使用,“BIA”是不用标记任何相互作用物(例如 BIACoreTM)而实时研究生物特异相互作用的技术。光现象表面等离子体共振(SPR)的改变可以用作生物分子间实时反应的指示。

[0228] 在替代的实施方案中,对该检测化合物调节 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白活性的能力的测定可以通过测定 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白进一步调节靶分子或 Axin 相关和 / 或 TNKS 相关蛋白的能力来实现。例如,可以按上述来测定靶分子对适当底物的催化 / 酶促活性。

[0229] 在又另一实施方案中,无细胞检测法涉及将 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白或其生物活性部分与结合 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白的已知化合物相接触以形成检测混合物,将该检测混合物与检测化合物相接触,和测定该检测化合物与 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白相互作用的能力,其中测定该检测化合物与 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白相互作用的能力包括测定 Axin 蛋白优先结合靶分子或 Axin 相关和 / 或 TNKS 相关蛋白或调节它们活性的能力。

[0230] 在许多检测化合物和天然提取物文库的药物筛选项目中,希望高通量检测法以便使得在给定时间段所调查的化合物数量最大化。在无细胞体系中进行的检测法,例如可源自纯化的或半纯化蛋白,通常称为“初级”筛选,因为可以产生它们以允许快速产生对由检测化合物介导的分子靶标的改变并相对容易地对它进行检测。此外,通常在体外体系中可以忽视检测化合物的细胞毒性和 / 或生物可利用性的影响,该检测法主要关注于药物对分子标靶的影响,其可表现为与上游或下游元件结合亲和性的改变。

[0231] 因此,在本发明示例性筛选检测法中,目的化合物与 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白或结合伴侣(如 Axin 相关和 / 或 TNKS 相关蛋白)结合。然后分别向该化合物和 Axin 蛋白或 Axin 结合伴侣的混合物加入含有 Axin 和 / 或 TNKS 结合伴侣或 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白的组合物。对 Axin 蛋白和 Axin 结合伴侣,和 / 或 TNKS 蛋白和 TNKS 结合伴侣的复合体的检测和量化,为检测化合物抑制(或加强)Axin 和结合伴侣之间的复合体形成的效力提供了手段。该化合物的效力可以通过由使用多种浓度的检测化合物所获得的数据来产生剂量反应曲线而评估。此外,也可以进行对照检测法来提供比较基准。在对照检测法中,向含有 Axin 结合伴侣或 Axin 多肽的组合物中加入分离的和纯化的 Axin 多肽或结合伴侣,并且在不存在检测化合物下量化复合体的形成。或者,在对照检测法中,向含有 TNKS 结合伴侣或 TNKS 多肽的组合物中加入分离的和纯化的 TNKS 多肽或结合伴侣,并且在不存在检测化合物下量化复合体的形成。

[0232] 本发明的无细胞检测法可适用使用分离蛋白的可溶和 / 或膜结合形式两者(例如 Axin 蛋白或其生物活性部分或 Axin 靶分子,和 / 或 TNKS 蛋白或其生物活性部分或 TNKS 靶分子)。在使用膜结合形式的分离蛋白的无细胞检测法(例如 Axin 和 / 或 TNKS 靶分子或受体)情形下,可能希望使用增溶剂以便该膜结合形式的分离蛋白保持在溶液中。此种

增溶剂的实例包括非离子清洁剂如 n- 辛基葡萄糖苷、n- 十二烷基葡萄糖苷、n- 十二烷基麦芽糖苷、辛酰基 -N- 甲基葡萄糖胺、癸酰基 -N- 甲基葡萄糖胺、Triton. RTM. X-100、Triton. RTM. X-114、Thesit. RTM. 、Isotridecypoly(乙二醇醚). sub. n、3-[(3- 胆酰胺丙基) 二甲铵基]-1- 丙磺酸盐 (酯)(CHAPS) 、3-[(3- 胆酰胺丙基) 二甲铵基]-2- 羟基 -1- 丙磺酸盐 (酯)(CHAPSO) 、或 N- 十二烷基 = N, N- 二甲基 -3- 铵基 -1- 丙磺酸盐 (酯) 。

[0233] 在上述基于细胞或无细胞检测中,可以通过使用 Axin1 或 Axin2 抗体来测量内源 Axin1 和 / 或 Axin2 水平。此外, Axin 可以用表位标签标记以允许测量细胞或提取物中的 TNKS 蛋白水平。

[0234] 在上述基于细胞或无细胞检测中,可以通过使用 TNKS1 或 TNKS2 抗体来测量内源性 TNKS1 和 / 或 TNKS2。此外,可以用表位标签来标记 Axin 以允许测量细胞或提取物中的 TNKS 蛋白水平。

[0235] 在本发明上述检测方法的一个以上的实施方案中,可能希望固定化 Axin、Axin 相关蛋白或靶分子来促进将一或两种蛋白的复合形式与未复合形式分离,以及适应该检测法的自动化。在本发明上述检测方法的一个以上的实施方案中,可能希望固定化 TNKS、TNKS 相关蛋白或靶分子来促进将一或两种蛋白的复合形式与未复合形式分离,以及适应该检测法的自动化。在存在或不存在候选化合物下,将检测化合物与 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白结合,或 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白与靶分子的相互作用可以在任何适于容纳反应物的容器中实现。此种容器的实例包括微量滴定板、试管和微离心试管。在一个实施方案中,可以提供融合蛋白,使得加入了允许一种或两种该蛋白结合基质的结构域。

[0236] 例如,谷胱甘肽 -5- 转移酶 /Axin 融合蛋白或谷胱甘肽 -5- 转移酶 / 靶融合蛋白可以吸附到谷胱甘肽琼脂糖珠 (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.) 或谷胱甘肽衍生的微滴定板上,其随后与检测化合物结合或者与该检测化合物和非吸附靶蛋白或 Axin 蛋白结合,并且在有助于复合体形成的条件下 (例如在生理条件的盐和 pH 下) 孵育该混合物。孵育后,洗涤珠或微滴定板孔以除去任何未结合的组分,在珠的情形下,基底固定化,例如,如上所述直接或间接测定复合体。或者,复合体可以自基底分离,并且使用标准技术来测定 Axin 结合或活性水平。

[0237] 其它用于在基底上使蛋白固定化的技术也可以用于本发明的筛选检测法。例如,利用生物素和链霉亲和素的缀合可以将 Axin 蛋白、Axin 相关蛋白或 Axin- 靶分子固定化。作为其它实例,利用生物素和链霉亲和素的缀合可以将 TNKS 蛋白、TNKS 相关蛋白或 TNKS- 靶分子固定化。生物素化的蛋白或靶分子可以使用本领域公知的技术 (例如,生物素化试剂盒, Pierce Chemicals, Rockford, Ill.) 从生物素 -NHS(N- 羟基 - 琥珀酰亚胺) 制备,并且在链霉亲和素包被的 96 孔板 (Pierce Chemical) 的孔中固定化。或者,可将对 Axin、Axin 相关蛋白或靶分子具有反应性但不干扰该蛋白与其靶分子结合的抗体通过抗体缀合衍生到板孔、被孔捕获的未结合的靶标、Axin 或 Axin 相关蛋白。检测此种复合体的方法,除了上述用于 GST 固定化复合体的那些以外,还包括使用对 Axin 蛋白或靶分子有反应性的抗体的复合体免疫检测法,以及依赖于检测与 Axin 蛋白或靶分子相关的酶活性的酶联检测法。

[0238] 在另一实施方案中,以一种方法鉴定 Axin 和 / 或 TNKS 表达的调控物,在该方法中,细胞与候选化合物相接触并且测定细胞中 Axin 和 / 或 TNKS mRNA 或蛋白的表达。将

mRNA 或蛋白在候选化合物存在下的表达水平与该 mRNA 或蛋白在候选化合物不存在下的表达水平相比较。然后可以根据这一比较将该候选化合物鉴定为 Axin 表达的调控物。例如，当 Axin 和 / 或 TNKS mRNA 或蛋白在候选化合物存在下的表达大于（统计学上显著大于）其不存在下的表达时，将该候选化合物鉴定为 Axin 和 / 或 TNKS mRNA 或蛋白表达的刺激物。或者，当 Axin 和 / 或 TNKS mRNA 或蛋白在候选化合物存在下的表达小于（统计学上显著小于）其不存在下的表达时，将该候选化合物鉴定为 Axin 和 / 或 TNKS mRNA 或蛋白表达的抑制物。Axin 和 / 或 TNKS mRNA 或蛋白在细胞中的表达水平可以通过在此所述的用于检测 Axin 和 / 或 TNKS mRNA 或蛋白的方法来测定。

[0239] 在本发明又另一方面，Axin 和 / 或 TNKS 蛋白可以在双杂交检测或三杂交检测中用作“诱饵蛋白”（例如参见 U. S. Pat. No. 5, 283, 317 ;Zervos 等人，(1993) Cell 72 :223-232 ;Madura 等人，(1993) J. Biol. Chem. 268 :12046-12054 ;Bartel 等人，(1993) Biotechniques 14 :920-924 ;Iwabuchi 等人，(1993) Oncogene 8 :1693-1696 ;和 Brent W094/10300），来鉴定其它与 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白结合（“结合蛋白”或“bp”）或相互作用并调节 Axin 和 / 或 TNKS 活性的蛋白。此种结合蛋白也可能参与由 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白作为，例如 Axin 介导的信号途径的下游元件的信号传播。或者此种结合蛋白也可能为与非 Axin 表达细胞相关的细胞表面分子，其中此种结合蛋白参与信号转导。

[0240] 双杂交体系基于多数转录因子的调节性质，该转录因子由可分离的 DNA- 结合和活化结构域组成。简言之，该检测法利用两种不同的 DNA 构建体。在一种构建体中，编码 Axin 蛋白的基因与编码已知转录因子（例如 GAL-4）的 DNA 结合结构域的基因融合。在另一构建体中，来自 DNA 序列文库的编码未鉴定蛋白（“被捕获物”或“样品”）的 DNA 序列与编码已知转录因子的活化结构域的基因融合。如果“诱饵”和“被捕获物”蛋白能够在体内相互作用形成 Axin 依赖的复合体，那么转录因子的 DNA 结合和活化结构域紧密接近。这一接近允许报告基因（例如 LacZ）的转录，该报告基因有效地连接响应该转录因子的转录调控位点。可以检测报告基因的表达，并且可以分离含有功能性转录因子的细胞群落，并将它用于获得编码与 Axin 蛋白相互作用的蛋白的克隆基因。

[0241] 本发明还关于由上述筛选检测法鉴定的新型试剂以及通过使用这些检测法来生产此种试剂的方法。因此，在一个实施方案中，本发明包括可通过包括任一种上述筛选检测法（例如基于细胞的检测法或无细胞检测法）来获得的化合物或试剂。例如，在一个实施方案中，本发明包括可通过一种方法获得的化合物或试剂，该方法包括将表达靶分子的细胞与检测化合物相接触，并测定该检测化合物结合该靶分子，或调节该靶分子活性的能力。在另一实施方案中，本发明包括可通过一种方法获得的化合物或试剂，该方法包括将表达靶分子的细胞与 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白或其生物活性部分相接触以形成检测混合物，将该检测混合物与检测化合物相接触，以及测定该检测化合物结合该靶分子，或调节该靶分子活性的能力。

[0242] 在另一实施方案中，本发明包括可通过一种方法获得的化合物或试剂，该方法包括将 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白或其生物活性部分与检测化合物相接触，并测定该检测化合物结合该 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白或其生物活性部分，或调节（例如刺激或抑制）其活性的能力。在又另一实施方案中，本发明包括可通过一种方法获得的化合物或试剂，该方法包括将 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白或其生物活性部分与已知结合 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白的化合物相接

触以形成检测混合物,将该检测混合物与检测化合物相接触,以及测定该检测化合物结合该 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白,或调节其活性的能力。

[0243] 因此,在适当动物模型中进一步使用按在此所述而鉴定的试剂也在本发明范围内。例如,可以将按在此所述而鉴定的试剂(例如 Axin 和 / 或 TNKS 调节剂,反义 Axin 和 / 或 TNKS 核酸分子,或 Axin 和 / 或 TNKS 结合伴侣)用于动物模型以测定用此试剂治疗的效力、毒性或副作用。或者,可以将按在此所述而鉴定的试剂用于动物模型以测定此种试剂的作用机制。

[0244] 本发明也关于按上述筛选检测法而鉴定的新型试剂按在此所述在诊断、预测和治疗的应用。因此,按在此所述,使用此种试剂来设计、配制、合成、制造和 / 或生产用于诊断、预测或治疗的药物或药学组合物也在本发明的范围内。例如,在一个实施方案中,本发明包括通过参考可由上述筛选检测法之一获得的化合物的结构和 / 或特性来合成或生产药物或药学组合物的方法。

[0245] 例如,可以根据由一种方法获得的化合物的结构和 / 或特性来合成药物或药学组合物,在该方法中,表达靶分子(例如 Axin 下游蛋白,如 β -cat) 的细胞与检测化合物相接触并且测定该检测化合物结合该靶分子,或调节该靶分子活性的能力。在另一示例性实施方案中,本发明包括根据可由一种方法获得的化合物的结构和 / 或特性来合成或生产药物或药学组合物的方法,在该获得化合物的方法中,Axin 和 / 或 TNKS 蛋白或其生物活性部分与检测化合物相接触,并测定该检测化合物结合该 Axin 和 / 或 TNKS 蛋白或其生物活性部分,或调节(例如刺激或抑制)其活性的能力。

[0246] 本发明的化合物

[0247] 术语“本发明的化合物”和类似术语,如在此进一步定义,在此用来描述可以用于例如对抗 Wnt 途径信号(例如通过稳定 Axin 和 / 或抑制 TNKS 催化活性)的化合物。该化合物包括但不限于 XAV939。

[0248] 该化合物还包括“本发明化合物”的药学可接受盐、对映异构体、立体异构体、旋转异构体、互变异构体、非对映异构体、或外消旋物等。

[0249] 药学组合物

[0250] 在此所述的组合物可为药学组合物。本发明提供药学组合物,包括与生理学上相容的载体混合的 Wnt 信号拮抗剂。所述药学组合物适合给药于温血动物,尤其是人(或源于温血动物,尤其是人的细胞或细胞系),以治疗、改善、诊断或预防 Wnt 信号相关的紊乱。

[0251] 除了活性成分,这些药学组合物可含有大量的一种或多种无机物或有机物、固体或液体、药学可接受载体,和生理学可接受的稀释剂(例如水、磷酸盐缓冲盐水或盐水),它们可以在药学上使用。

[0252] 短语“治疗有效量”和“有效量”在此用于意指足以使宿主的活性、功能和反应的临床显著缺乏降低至少约 15%,优选至少 50%,更优选至少 90%,和最优选阻止该临床显著缺乏的量。或者,治疗有效量是足以造成宿主中临床显著状况 / 症状改善的量。

[0253] 该有效量可以根据诸如受试者体型和体重、疾病类型或本发明的特定化合物这些因素来改变。例如本发明化合物的选择可以影响由什么来组成“有效量”。本领域熟练技术人员将能够研究在此所含的因素并确定本发明化合物的有效量而不用过多的实验。

[0254] 给药方案可以影响由什么来组成有效量。本发明的化合物可以在 Wnt 信号相关系

乱发作之前或之后给予受试者。另外,可以每日或顺序给予若干分开剂量,以及交错剂量,或者该剂量可以连续灌注,或者可以团注。另外,本发明化合物的剂量可以按治疗或预防情况的急迫所示而成比例地增加或减少。

[0255] 词语“药学制剂”或“药学组合物”包括适合给药于哺乳动物如人类的制剂。当本发明的化合物作为药物给予哺乳动物如人类时,它们可以以本身给予或者作为药学组合物给予,该药学组合物含有,例如,与药学可接受介载体组合的0.1至99.5% (更优选0.5至90%) 的活性成分。

[0256] 短语“药学可接受的”指当给予人类时,生理学上耐受的并且通常不产生过敏或类似不良反应,例如肠胃不适、头晕等的分子实体和组成。优选地,如在此使用,术语“药学可接受的”意指被联邦或国家政府的管理机构所批准的或列于美国 Pharmacopeia 或其他通常公认用于动物,并且尤其是人的药典。

[0257] 短语“药学可接受的载体”是本领域公认的并且包括适于向哺乳动物给予本发明组合物的药学可接受物质、组合物或介载体。载体包括参与从一个器官或身体的部分向另一个器官或身体的部分携带或传递本发明试剂的液体或固体填料、稀释剂、赋形剂、溶剂或包封物质。每种载体必须是“可接受的”,意味着它与制剂的其他成分是兼容的并且对于患者无害。可以用作药学可接受载体的物质的一些实例包括:糖,如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素和它的衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和乙酸纤维素;粉末状西黄蓍胶;麦芽;明胶;滑石;赋形剂,如可可脂和栓蜡;油,如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和豆油;二醇类,如丙二醇;多元醇,如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;酯,如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原的水;等渗盐水;林格氏溶液;乙醇;磷酸盐缓冲溶液;和其他用于药学制剂的非毒性可兼容物质。适合的药学载体由 E. W. Martin 描述于“Remington's Pharmaceutical Sciences”。

[0258] 润湿剂、乳化剂和润滑剂,如十二烷基硫酸钠和硬脂酸镁、以及着色剂、释放剂 (release agent)、包被剂、甜味剂、调料和香料、防腐剂和抗氧化剂也可以存在于该组合物中。

[0259] 药学可接受的抗氧化剂的实例包括:水溶性抗氧化剂,例如:抗坏血酸、盐酸半胱氨酸、硫酸氢钠、焦亚硫酸钠、亚硫酸钠等;油溶性抗氧化剂,如抗坏血酸棕榈酸酯、丁羟茴醚 (BHA)、丁羟甲苯 (BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等;和金属螯合剂,如柠檬酸、乙二胺四乙酸 (EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等。

[0260] 本发明制剂包括适于口服、经鼻、局部、口腔、舌下、直肠、阴道和 / 或非经肠道给药的那些。制剂可常规地以单位剂量形式存在并且可用药物领域公知的任何方法来制备。可以与载体物质组合来生产单一剂量形式的活性成分的量将通常是产生治疗效果的化合物的量。通常,以百分之百计,这一量将在约1%至约99%的活性成分的范围,优选约5%至约70%,最优选约10%至约30%。

[0261] 制备这些制剂或组合物的方法包括将本发明的化合物与载体,以及任选地,一种或多种辅助成分相结合的步骤。通常,通过将本发明的化合物与液体载体,或细分的固体载体,或此两者均一且密切地相结合,然后在需要时成型该产物来制备该制剂。

[0262] 适合口服给药的本发明制剂可为胶囊、扁囊剂、丸剂、片剂、锭剂 (使用调味基底,

通常是蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶)、粉剂、颗粒的形式,或者作为溶液或在水性或非水性液体中的悬液,或者作为水包油或油包水液体乳液,或者作为酏剂或浆液,或者作为软锭剂(使用惰性基底,如明胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯胶)和/或作为漱口剂等,每种含有预定量的本发明化合物作为活性成分。本发明化合物也可作为丸药、药糖剂或糊给予。

[0263] 在口服给药的本发明的固体剂量形式(胶囊、片剂、丸剂、糖衣丸、粉剂、颗粒等)中,活性成分与一种或多种药学可接受载体混合,如柠檬酸钠或磷酸二钙,和/或下述任意:填料或填充剂,如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇,和/或硅酸;粘结剂,如羧甲基纤维素、海藻酸盐、明胶、聚乙烯基吡咯烷酮、蔗糖和/或阿拉伯胶;湿润剂,如丙三醇;崩解剂,如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐、和碳酸钠;溶液阻滞剂、如石蜡;吸收加速剂,如季铵化合物;润湿剂,如鲸蜡醇和单硬脂酸甘油酯;吸收剂,如高岭土和皂土;润滑剂,如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙烯二醇类、十二烷基硫酸钠、和它们的混合物;以及着色剂。在胶囊、片剂和丸剂的情形下,药学组合物也可包括缓冲剂。相似类型的固体组合物也可使用如乳糖或乳糖(milk sugar),以及高分子量聚乙二醇等的赋形剂在软性和硬性填充的明胶胶囊中用作填料。

[0264] 片剂可通过压缩或模塑来制成,任选地和一种或多种辅助成分一起。压制片剂可使用粘结剂(例如明胶或羟丙甲基纤维素)、润滑剂、惰性稀释剂、防腐剂、崩解剂(如羧甲基淀粉钠或交联的羧甲基纤维素钠)表面活性剂或分散剂来制备。模制片可通过在适当的仪器上模塑以惰性液体稀释剂润湿的粉末状化合物的混合物而制成。

[0265] 本发明药学组合物的片剂,以及其他固体剂量形式,例如糖衣丸、胶囊、丸剂和颗粒,可任选地被压痕并制备成具有包衣或壳,例如肠溶衣和其他药物配制领域公知的包衣。它们也可使用例如不同比例的羟丙甲基纤维素来提供想要的释放谱、其他聚合物基底、脂质体和/或微球来配制以提供其中活性成分的缓释或控释。它们可被灭菌,例如在马上使用前通过经细菌滞留过滤器过滤,或通过加入可以在灭菌水中溶解的灭菌固体组合物形式的灭菌剂,或一些其他可注射的灭菌介质。这些组合物也可任选地含有遮光剂并且可以是这样的组合物,该组合物仅仅,或优选地在某一部分胃肠道释放,并且任选地,以延缓的方式。可以使用的包埋组合物的实例包括聚合物质和蜡。适当时,活性成分也可以是具有一种或多种上述赋形剂的微包封的形式。

[0266] 口服给药的本发明化合物的液体剂量包括药学可接受乳剂、微乳剂、溶液、悬剂、浆液和酏剂。除了活性成分,液体剂量形式可含有本领域通常使用的惰性稀释剂,例如水或其他溶剂,增溶剂和乳化剂,例如乙醇、异丙醇、碳酸乙酯、乙酸乙酯、苄基醇、苯甲酸苄酯、丙二醇、1,3-丁二醇、油(尤其是棉籽、落花生、玉米、胚芽、橄榄、蓖麻和芝麻油)、丙三醇、四氢呋喃基醇、聚乙二醇和山梨醇的脂肪酸酯,以及它们的混合物。

[0267] 除了惰性稀释剂,口服组合物也可以包括佐剂如润湿剂、乳化剂和悬浮剂、甜味剂、调味料、着色剂、香料和防腐剂。

[0268] 悬剂,除了活性组合物以外,可含有悬浮试剂,如乙氧基化异十八醇、聚氧乙烯山梨醇和山梨糖醇酯、微晶纤维素、aluminum metahydroxide、皂土、琼脂和黄蓍胶、以及它们的混合物。

[0269] 用于直肠或阴道给药的本发明药学组合物的制剂可以栓剂存在,其可通过将一种或多种本发明化合物与一种或多种适当的无刺激性的赋形剂或载体混合来制备,赋形剂或

载体包括例如可可脂、聚乙二醇、栓剂蜡或水杨酸盐（酯），并且该栓剂室温下为固体，而体温下为液体，并因此将在直肠或阴道腔内熔化而释放活性化合物。

[0270] 适合阴道给药的本发明的制剂也包括含有本领域认为是适合载体的阴道环、棉塞、乳霜、凝胶、糊剂、泡沫或喷雾制剂。

[0271] 用于局部或经皮给药本发明化合物的剂量形式包括粉剂、喷雾、软膏、糊剂、乳霜、乳液、凝胶、溶液、贴剂和吸入剂。活性化合物可在灭菌条件下与药学可接受载体，以及可能需要的任何防腐剂、缓冲剂或推进剂混合。

[0272] 药膏、糊剂、乳霜和凝胶除了本发明的活性化合物，可含有赋形剂，如动物和植物脂肪、油、蜡、石蜡、淀粉、黄蓍胶、纤维素衍生物、聚乙二醇、硅氧烷、皂土、硅酸、滑石和氧化锌，或它们的混合物。

[0273] 粉剂和喷雾，除了本发明的化合物，可以含有赋形剂如乳糖、滑石、硅酸、氢氧化铝、硅酸钙和聚酰胺的粉末，或这些物质的混合物。喷雾可另外含有常规推进剂，如氯氟烃以及挥发性未取代烃，如丁烷和丙烷。

[0274] 经皮贴剂具有向身体提供本发明化合物的受控递送的附加优点。此剂量形式可以通过在适当介质中溶解或分散该化合物而制成。吸收增强剂也可以用于增加该化合物穿过皮肤的流量。此种流量的速率可以通过提供速度控制膜或在聚合物基底或凝胶中或分散活性化合物来控制。

[0275] 眼药制剂、眼膏剂、粉剂、溶液等也被考虑在本发明范围内。

[0276] 适合非经肠道给药的本发明药学组合物包括本发明的一种或多种化合物与一种或多种药学可接受的灭菌等渗水性或非水性溶液、分散剂、悬剂或乳剂，或与可就在使用前重构为灭菌可注射溶液或分散剂的灭菌粉末组合，该组合物可含有抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂、造成制剂与想要的接受者的血液等渗的制剂的溶质、或悬液或增稠剂。

[0277] 可用于本发明药学组合物的适合的水性和非水性载体的实例包括水、乙醇、多元醇（如丙三醇、丙二醇、聚乙二醇等），和它们适当的混合物，植物油如橄榄油，和可注射的有机酯如油酸乙酯。例如通过使用包衣物质，如卵磷脂，在分散剂的情形下通过维持需要颗粒的大小，以及通过使用表面活性剂可以维持适当的流动性。

[0278] 这些组合物也可含有佐剂，如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。可通过包括多种抗细菌和抗真菌试剂，如对羟苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚山梨酸等来保证防止微生物的作用。也可能想要在组合物中包括等渗试剂，如糖、氯化钠等。此外，可通过包括延缓吸收的试剂，如单硬脂酸铝和明胶而得到可注射药学形式的延长吸收。

[0279] 在一些情形下，为了延长药物的作用，想要减缓从皮下或肌下注射的药物的吸收。这可通过使用具有较差水溶性的结晶或非晶物质的液体悬液来实现。药物的吸收速率从而取决于其溶出的速率，这又可取决于晶体大小和结晶形式。或者，非经肠道给予的药物形式的延缓吸收可通过在油介载体中溶解或悬浮该药物来实现。

[0280] 通过在生物可降解的聚合物如聚乳酸-聚乙醇酸交酯中形成本发明化合物的微囊基质来制成可注射的储存物形式。根据药物与聚合物的比率，以及所用特定聚合物的性质，可以控制药物释放的速率。其他可生物降解的聚合物的实例包括聚（原酸酯）和聚（酸酐）。也可通过将药物封闭到与机体组织相容的脂质体或微乳剂中来制备可注射的贮存型制剂。

[0281] 本发明制剂可口服、非经肠道、局部或直肠给予。当然，通过适用各给药途径的形式来给予它们。例如，它们以片剂或胶囊形式通过注射、吸入、洗眼剂、药膏、栓剂等给予，通过注射、灌注或吸入给予；通过洗液或药膏局部给予；和通过栓剂的直肠给予。优选口服和 / 或 IV 给药。

[0282] 如在此使用，短语“非经肠道给药”和“非经肠道给予”意指除了肠内和局部给药以外的给药模式，通常通过注射，并且包括而不限于静脉、肌肉内、动脉、鞘内、囊内、心脏内、皮肤内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、被膜下、蛛网膜下、脊柱内和胸骨内注射和灌注。

[0283] 如在此使用，短语“全身给药”、“全身给予”、“外周给药”和“外周给予”意指化合物、药物或其他物质除了直接向中枢神经系统以外的给药，以便它进入患者的系统，并因此进行代谢等过程，例如皮下给药。

[0284] 这些化合物可通过任何适当的给药途径给予人或其他动物用于治疗，包括口服、经鼻，通过例如喷雾，直肠、阴道内、非经肠道、脑池内和局部给予，通过粉剂、药膏或滴剂，包括口腔和舌下。

[0285] 不论所选的给药途径，将可以以适当的含水形式使用的本发明化合物，和 / 或本发明药学组合物通过本领域技术人员已知的常规方法配制成药学可接受的剂量形式。

[0286] 本发明药学组合物中的活性成分的实际剂量水平可不同以便获得对于实现对特定患者、组合物和给药模式的想要的治疗反应有效而对患者没有毒性的活性成分的量。

[0287] 所选剂量水平将取决于多种因素，包括本发明所用特定化合物，或它的酯、盐或酰胺的活性，给药途径，给药时间，所用特定化合物的排泄速率，治疗持续期，与所用化合物组合使用的其它药物、化合物和 / 或物质，被治疗的患者的年龄、性别、体重、状况、总体健康以及之前的药物史，及医学领域公知的类似的因素。

[0288] 具有本领域普通技能的医生或兽医可以容易地确定所需药学组合物的有效量并开出处方。例如，医生或兽医可以在药学组合物中比实现想要的治疗效果所需更低的剂量来开始给予所使用的本发明化合物，并逐渐增加该剂量直到达到想要的效果。

[0289] 通常，本发明化合物的适当的每日剂量将为对于产生治疗效果有效的最低剂量的化合物的量。此种有效剂量将通常取决于上述因素。通常，当用于指定的止痛作用时，用于患者的本发明化合物的静脉和皮下剂量将在约 0.0001 至约 100mg 每千克体重每天的范围，更优选约 0.01 至约 50mg 每千克体重每天，并且还更优选约 1.0 至约 100mg 每千克体重每天。有效量为治疗 Wnt 信号相关紊乱的量。

[0290] 按需要，活性化合物的有效每日剂量可以按单独给予的 2、3、4、5、6 或更多的亚剂量贯穿一天以适当的间隔来给予，任选地，以单位剂量形式。

[0291] 尽管可以单独给予本发明的化合物，优选将该化合物作为药学组合物给予。

[0292] 合成方法

[0293] 本发明的化合物用本领域熟练技术人员已知的方法从通常可获得的化合物来制备，包括下面条件中的任何一种或多种，但不限于此：

[0294] 在这一文本的范围内，除非上下文另有指明，否则只将并非本发明化合物特别想要的终产物的组分而可容易地移除的基团指定为“保护基团”。此种保护基团对官能团的保护，该保护基团自身，以及它们的切割反应描述于例如标准文献著作，如 *Science of*

Synthesis :Houben-Weyl Methodsof Molecular Transformation. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany. 2005. 第 41627 页 (URL :<http://www.science-of-synthesis.com>(电子版, 48Volumes)) ;J. F. W. McOmie, " Protective Groups inOrganic Chemistry " , Plenum Press, London and New York 1973, 在T. W. Greene and P. G. M. Wuts, " Protective Groups in OrganicSynthesis " ,第三版, Wiley, New York 1999,在" The Peptides " ; Volume3(编辑 :E. Gross 和 J. Meienhofer), Academic Press, London and NewYork 1981, 在" Methoden der organischen Chemie " (Methods of OrganicChemistry), Houben Weyl, 第四版, Volume 15/I, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1974, 在 H. -D. Jakubke and H. Jeschkeit, " **Aminosäuren**, Peptide, Proteine " (Amino acids, Peptides, Proteins), Verlag Chemie, Weinheim, Deerfield Beach, and Basel 1982, 以及在 Jochen Lehmann, " Chemie der Kohlenhydrate :Monosaccharide und Derivate" (Chemistryof Carbohydrates :Monosaccharides and Derivatives), Georg ThiemeVerlag, Stuttgart1974。保护基团的特性是它们可以被容易地移除(即不发生不想要的二级反应),例如通过溶剂分解、还原、光解或者在生理条件下(例如通过酶切)。

[0295] 本发明化合物的酸加成盐最适于由药学可接受酸来形成,并且包括例如由无机酸如盐酸、氢溴酸、硫酸或磷酸和有机酸如琥珀酸、马来酸、乙酸或富马酸所形成的那些。其他非药学可接受的盐如草酸盐可以用于例如分离本发明的化合物,在实验室使用,或用于随后向药学可接受酸加成盐的转化。本发明范围内也包括本发明的溶剂化物和水合物。

[0296] 给定化合物盐向想要的化合物盐的转化可通过应用标准技术来实现,其中用碱性溶液如碳酸钠或氢氧化钾处理给定盐的水性溶液,以释放游离碱,该游离碱随后被提取到适当溶剂如醚中。游离碱然后自水性溶液分离、干燥并用需要的酸来处理以得到想要的盐。

[0297] 本发明某些化合物的体内可水解酯或酰胺可以通过在惰性溶剂(如二氯甲烷或氯仿)中存在碱下,用想要酯的酰基氯处理具有游离羟基或氨基官能性的那些化合物来形成。适当的碱包括三乙基胺或吡啶。相反,具有游离羧基基团的本发明化合物可以用标准条件来酯化,其可以包括活化,随后在存在适当碱下用想要的醇进行处理。

[0298] 药学可接受的加成盐的实例包括,但不限于,非毒性无机和有机酸加成盐,例如源自盐酸的氯化物、源自氢溴酸的溴化物、源自硝酸的硝酸盐、源自高氯酸的高氯酸盐、源自磷酸的磷酸盐、源自硫酸的硫酸盐、来自甲酸的甲酸盐、源自乙酸的乙酸盐、源自乌头酸的乌头酸盐、源自抗坏血酸的抗坏血酸盐、源自苯磺酸的苯磺酸盐、源自苯甲酸的苯甲酸盐、源自肉桂酸的肉桂酸盐、源自柠檬酸的柠檬酸盐、源自扑酸(embonic acid)的扑酸盐(embonate)、源自庚酸的庚酸盐、源自富马酸的富马酸盐、源自谷氨酸的谷氨酸盐、源自乙醇酸的乙醇酸盐、源自乳酸的乳酸盐、源自马来酸的马来酸盐、源自丙二酸的丙二酸盐、源自扁桃酸的扁桃酸盐、源自甲基磺酸的甲基磺酸盐、源自 2-萘磺酸的 2-萘磺酸盐、源自邻苯二甲酸的邻苯二甲酸盐、源自水杨酸的水杨酸盐、源自山梨酸的山梨酸盐、源自硬脂酸的硬脂酸盐、源自琥珀酸的琥珀酸盐、源自酒石酸的酒石酸盐、源自对甲苯磺酸的对甲苯磺酸盐等。特别优选的盐是本发明化合物的钠、赖氨酸和精氨酸盐。此种盐可通过本领域公知和描述的方法来形成。

[0299] 不能考虑作为药学可接受的其他酸如草酸可以用于制备盐,该盐用作获得本发明的化学化合物及其药学可接受酸加成盐的中间产物。

[0300] 本发明化学化合物的金属盐包括碱金属盐、例如含有羧基基的本发明化学化合物的钠盐。

[0301] 可以以本身已知的方式将可根据本发明获得的异构体的混合物分离为单个异构体；非对映异构体可以例如通过在多相溶剂混合物之间的分配、重结晶和 / 或色谱分离，如在硅胶上，或通过例如在反相柱上的中压液相色谱来分离，并且外消旋物可以通过例如，用光学上纯的成盐剂形成盐并例如通过馏分结晶，或通过在光活性柱材料上进行色谱来分离由此可获得的非对映异构体混合物。

[0302] 可以根据标准方法，例如使用色谱方法、分布方法、（重）结晶等将中间产物和终产物整理和 / 或纯化。

[0303] 普通工艺条件

[0304] 下面总体上应用于贯穿本公开内容提及的所有工艺。

[0305] 合成本发明化合物的工艺步骤可以在本身已知的反应条件下进行，包括具体提及的那些，没有或通常在存在溶剂或稀释剂，包括如对所用反应剂惰性并溶解它们的溶剂或稀释剂，没有或存在催化剂、缩合或中和试剂，例如离子交换剂，如阳离子交换剂，如以 H⁺的形式，这取决于在降低、正常或升高温度下的反应和 / 或反应剂的性质，例如在约 -100 °C 至约 190 °C 的温度范围，包括例如约 -80 °C 至约 150 °C，例如在 -80 至 -60 °C，在室温，在 -20 至 40 °C 或在回流温度，在大气压或在密闭容器中，适当时处于压力下，和 / 或在惰性环境下，例如在氩或氮环境下。

[0306] 在反应的所有阶段，形成的异构体混合物可以分离成单个异构体，例如非对映异构体或对映异构体，或者分离成想要的异构体混合物，例如外消旋物或非对映异构体的混合物，例如与 *Science of Synthesis :Houben-Weyl Methods of Molecular Transformation*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany. 2005 所述方法类似。

[0307] 可从中选择适于任何特定反应的那些溶剂包括具体提及的那些，或者例如，水，酯，如低级烷基 - 低级链烷酸酯，如乙酸乙酯，醚例如脂肪醚如二乙醚或环醚如四氢呋喃或二氧己环 (dioxane)，液态芳香烃，如苯或甲苯，醇，如甲醇、乙醇或 1- 或 2- 丙醇，腈，如乙腈，卤代烃，如二氯甲烷或氯仿，酰胺，如二甲基甲酰胺或二甲基乙酰胺，碱，如杂环含氮碱基，如吡啶或 N- 甲基吡咯烷 -2- 酮，羧酸酸酐，如低级链烷酸酸酐，如乙酸酐，环状、线性或分支烃，如环己烷、己烷或异戊烷，或那些溶剂的混合物，例如水性溶剂，除非在工艺的描述中另有指明。此溶剂混合物也可用于整理，例如通过色谱或分配。

[0308] 该化合物，包括它们的盐，也可以以水合物，或者它们的晶体的形式获得，例如，包括用于结晶的溶剂。可存在不同的晶体形式。

[0309] 本发明也涉及那些工艺形式，其中将在该工艺任何阶段可作为中间产物获得的化合物用作起始材料并且进行剩下的工艺步骤，或者其中在该反应条件下形成起始材料，或该起始材料以衍生物的形式使用，例如以受保护形式或以盐的形式，或者可由本发明工艺获得的化合物在该工艺条件下生产并进一步原位加工。

[0310] 前药

[0311] 本发明也包括含有本发明化合物的药学可接受前药的药学组合物，以及通过给予本发明化合物的药学可接受前药来治疗 Wnt 相关紊乱的方法。例如，具有游离氨基、酰胺基、羟基或羧基基团的本发明化合物可以转换成前药。前药包括化合物，其中氨基酸残基，

或者具有两个或更多个（例如两个、三个或四个）氨基酸残基的多肽链通过酰胺或酯键共价结合本发明化合物的游离氨基、羟基、或羧酸基团。氨基酸残基包括但不限于通常由3字母符号表示的20个天然发生的氨基酸并且也包括4-羟脯氨酸、羟赖氨酸、demosine、isodemosine、3-甲基组氨酸、戊氨酸(norvalin)、 β -丙氨酸、 γ -氨基丁酸、瓜氨酸、同型半胱氨酸、同型丝氨酸、鸟氨酸和甲硫氨酸砜。也包括其他类型的前药。例如，游离羧基基团可以衍生为酰胺或烷基酯。游离羟基基团可使用如Advanced Drug Delivery Reviews, 1996, 19, 115所列出的基团包括但不限于半琥珀酸酯、磷酸酯、二甲基氨基乙酸酯和磷酰基氧甲基氧羰基来衍生。也包括羟基和氨基基团的氨基甲酸酯前药，还有碳酸酯前药，羟基基团的磺酸酯和硫酸酯。也包括羟基基团衍生为(酸氧基)甲基和(酸氧基)乙基醚，其中酰基基团可为烷基酯，任选地被基团包括但不限于醚、胺和羧酸官能团所取代，或者其中酰基基团是如上所述的氨基酸酯。这一类型的前药描述于J. Med. Chem. 1996, 39, 10。游离胺也可以衍生为酰胺、氨磺酰或磷酰胺。所有这些前药部分可加入基团，包括但不限于醚、胺和羧酸官能团。

[0312] 在适当以及需要的时候，对本发明化合物的任何提及因此应理解为也指本发明化合物的相应前药。

[0313] 融合蛋白

[0314] 本发明提供了嵌合或融合蛋白。如在此使用，“嵌合蛋白”或“融合蛋白”包括有效地与异源多肽（即除了与本发明的同一多肽）连接的全部或部分的（优选生物活性的）本发明多肽。在融合蛋白中，术语“有效地连接的”旨在指本发明的多肽和异源多肽彼此按读框融合。异源多肽可以与本发明多肽的N端或C端融合。

[0315] 一种有用的融合蛋白是GST融合蛋白，其中本发明的多肽与GST序列的C端融合。此种融合蛋白可以促进本发明重组多肽的纯化。

[0316] 在另一实施方案中，融合蛋白在其N端含有异源信号序列。例如，可以除去本发明多肽的天然信号序列并用来自另一蛋白质的信号序列所代替。例如，可以使用杆状病毒包膜蛋白的gp67分泌序列作为异源信号序列(Current Protocols in Molecular Biology, Ausubel等人编, John Wiley& Sons, 1992)。真核生物异源信号序列的其他实例包括蜂毒素和人胎盘碱性磷酸酶的分泌序列(Stratagene ; La Jolla, California)。在又一实例中，有用的原核生物异源信号序列包括phoA分泌信号(Sambrook等人, 上文)和蛋白A分泌信号(Pharmacia Biotech ; Piscataway, New Jersey)。

[0317] 在又一实施方案中，融合蛋白是免疫球蛋白融合蛋白，其中全部或部分的本发明多肽与源自免疫球蛋白家族的成员序列相融合。本发明的融合免疫球蛋白可以掺入到药物组合物中并给予受试者以抑制配体(可溶或膜结合)和在细胞表面上的蛋白(受体)的相互作用，从而遏制体内信号转导。融合免疫球蛋白可以用于影响本发明多肽的同源配体的生物可利用性。配体/受体相互作用的抑制可在治疗学上用于治疗增生型和分化型紊乱以及用于调节(例如促进或抑制)细胞存活。此外，本发明的融合免疫球蛋白可以用作免疫原以在受试者中生产针对本发明多肽的抗体，纯化抗体并在筛选检测中鉴定抑制受体与配体相互作用的分子。

[0318] 可以通过标准重组DNA技术来生产本发明的嵌合和融合蛋白。在另一实施方案中，可以通过包括自动DNA合成的常规技术来合成融合基因。或者，基因片段的PCR扩增可

以使用锚定引物来进行,这在两连续基因片段之间产生互补突出,其可以随后被退火并再扩增以产生嵌合基因序列(参见例如Ausubel等人,上文)。此外,许多已经编码融合部分(例如GST多肽)的表达载体是市售可得的。可以将编码本发明多肽的核酸克隆到使得融合部分与本发明多肽依读框连接的表达载体中。

[0319] RNAi

[0320] 本发明提供小干涉核糖核酸序列(siRNA),以及使用siRNA在细胞或哺乳动物中抑制TNKS1/2基因或其他负责Axin稳定的基因表达的组合物和方法。本发明也提供使用siRNA来治疗Wnt信号相关紊乱的组合物和方法,该紊乱包括由TNKS1/2基因或其他负责Axin稳定的基因在哺乳动物中的异常表达造成的,或由以所述基因为内在成员的途径的异常信号造成的病理状况和疾病。siRNA通过称为RNA干扰(RNAi)的过程而指导mRNA的序列特异性降解。

[0321] 本发明的siRNA包括具有长度小于30个核苷酸,通常长度为19-24个核苷酸的区域,并且基本上与TNKS1/2基因或其他负责Axin稳定的基因的至少一部分mRNA转录本互补的RNA链(反义链)。这些siRNA的使用使得在如Wnt信号途径中牵涉的基因的mRNA靶向降解。

[0322] 根据本发明的siRNA介导RNA干扰(“RNAi”)。术语“RNAi”是本领域公知的并且通常理解为意指通过具有与靶基因互补区域的siRNA来抑制细胞中的一或多个靶基因。检测siRNA介导RNAi能力的多种检测法是本领域已知的(参见例如Elbashir等人,Methods 26(2002),199-213)。当与没用根据本发明的RNA分子处理的细胞相比时,根据本发明的siRNA对基因表达的作用通常将导致靶基因的表达被抑制至少10%、33%、50%、90%、95%或99%。

[0323] 根据本发明的“siRNA”或“小干涉核糖核酸”具有本领域已知的含义,包括下面的方面。siRNA由两条核糖核苷酸链组成,这两条链在生理条件下沿互补区杂交。链是分离的但是在某些实施方案中可由分子接头连接。单独的核糖核苷酸可为未修饰的天然发生的核糖核苷酸,未修饰的天然发生的脱氧核糖核苷酸或者它们可为按本文他处所述而化学修饰的或合成的。

[0324] 根据本发明的siRNA分子包括基本上与靶基因的mRNA区相同的双链区。与靶基因的相应序列具有100%同一性的区域是适合的。这一状态被称作“完全互补”。然而,根据被靶向的mRNA区域的长度,该区域相比于靶基因的相应区域也可含有一个、两个或三个错配,并且如此可能不是完全互补的。在一个实施方案中,本发明的RNA分子特定地靶向一个给定基因。为了只靶向想要的mRNA,siRNA试剂可与靶mRNA具有100%同源性以及与细胞或生物体中存在的所有其他基因具有至少2个错配核苷酸。分析和鉴定具有足够序列同一性的siRNA以便有效抑制特定靶序列表达的方法是本领域已知的。序列同一性可通过本领域已知的序列比较和比对算法来优化(参见Gribskov and Devereux,Sequence Analysis Primer, StocktonPress, 1991,以及其中引用的参考文献)并且通过例如,在BESTFIT软件程序中使用缺省参数实施Smith-Waterman算法(例如University of Wisconsin Genetic Computing Group)来计算核苷酸序列之间的百分数差别。

[0325] 影响RNAi试剂效力的另一因素是靶基因的靶区域。可由实验来确定对RNAi试剂的抑制有效的靶基因区域。适合的mRNA靶区域应是编码区。未翻译区如5'-UTR,3'-UTR

以及剪接点也是适合的。例如,为此目的可进行 Elbashir S.M. 等人,2001 EMBO J.,20, 6877-6888 所述的转染检测。本领域存在许多其他适合的检测法和方法,它们是熟练技术人员公知的。

[0326] 根据本发明,siRNA 与靶标互补区的长度可为 10 至 100 个核苷酸,12 至 25 个核苷酸,14 至 22 个核苷酸,或 15、16、17 或 18 个核苷酸。当对相应靶区域存在错配时,互补区的长度通常在一定程度上需要更长。

[0327] 由于 siRNA 可能带有突出端(它可能与靶标互补或不互补),或者与自身而非靶基因互补的其他核苷酸,所以 siRNA 的每一单独链的总长度可为 10 至 100 个核苷酸,15 至 49 个核苷酸,17 至 30 个核苷酸,或 19 至 25 个核苷酸。

[0328] 短语“每条链为 49 个核苷酸或更少”意指链中的连续核苷酸的总数,包括所有修饰的或未被修饰的核苷酸,但不包括可能加到该链的 3' 或 5' 端的任何化学部分。不计算插入到该链中的短化学部分,但是不将设计用来连接两条分离链的化学接头当作产生连续核苷酸。

[0329] 短语“1 至 6 个核苷酸在 5' 端或 3' 端中至少一端突出”指由两条分离链在生理条件下形成的互补 siRNA 结构。如果末端核苷酸是 siRNA 的双链区的一部分,那么认为该 siRNA 是平端末端的。如果一个或多个核苷酸在端部未配对,那么产生了突出。由突出核苷酸的数目来测量突出长度。突出核苷酸可以在每条链的 5' 端或 3' 端。

[0330] 根据本发明的 siRNA 通过在至少一条链中引入至少一个修饰核苷酸而赋予适于口服递送的高体内稳定性。因此,根据本发明的 siRNA 含有至少一个修饰的或非天然的核糖核苷酸。在公开的 PCT 专利申请 WO 200370918 中提出了对许多已知的化学修饰的冗长说明,并且在此将不再重复。在实施例和说明书中更具体地提出适于口服递送的修饰。适当的修饰包括但不限于对糖部分的修饰(即糖部分的 2' 位置,例如 2'-0-(2-甲氧基乙基) 或 2'-MOE, Martin 等人, Helv. Chim. Acta, 1995, 78, 486-504), 即烷氧基烷氧基基团) 或对碱部分的修饰(即维持与在可选的核苷酸链中另一特定碱基配对能力的非天然或经修饰的碱基)。其他修饰包括所谓的“骨架”修饰,包括但不限于磷酸酯基团的代替(以诸如硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯或二硫代磷酸酯连接毗邻核糖核苷酸)。最后,有时在此称为 3' 加帽或 5' 加帽的端部修饰可能是重要的。帽可由本领域熟练技术人员已知的更复杂的化学物组成。

[0331] 在一个实施方案中,本发明提供抑制 TNKS1/2 基因或负责 Axin 稳定的其他基因的表达的双链核糖核酸(dsRNA) 分子。dsRNA 包括至少两条彼此互补的序列。dsRNA 包括含第一序列的有义链和含第二序列的反义链。反义链包括与编码 TNKS1/2 基因或负责 Axin 稳定的其他基因的 mRNA 的至少一部分基本上互补的核苷酸序列,并且互补区的长度小于 30 个核苷酸,通常长度为 19-24 个核苷酸。该 dsRNA 在与表达 TNKS1/2 基因或负责 Axin 稳定的其他基因的细胞接触时,抑制所述基因表达至少 40%。

[0332] 在另一实施方案中,本发明提供包括本发明 dsRNA 之一的细胞。该细胞通常是哺乳动物细胞,例如人细胞。

[0333] 在另一实施方案中,本发明提供一种药学组合物,用于抑制生物体,通常是人受试者中 TNKS1/2 基因或其他负责 Axin 稳定的基因的表达,该药学组合物包括一种或多种本发明的 dsRNA 和药学可接受的载体或递送介载体。

[0334] 在另一实施方案中,本发明提供抑制细胞中 TNKS1/2 基因或其他负责 Axin 稳定的基因表达的方法,包括下面的步骤:

[0335] (a) 将双链核糖核酸(dsRNA) 导入细胞,其中 dsRNA 包括至少两条彼此互补的序列。dsRNA 包括含第一序列的有义链和含第二序列的反义链。反义链包括与编码 TNKS1/2 基因或负责 Axin 稳定的其他基因的 mRNA 的至少一部分基本上互补的互补区,并且互补区的长度小于 30 个核苷酸,通常长度为 19–24 个核苷酸。该 dsRNA 在与表达 TNKS1/2 基因或负责 Axin 稳定的其他基因的细胞接触时,抑制所述基因表达至少 40%;和

[0336] (b) 维持步骤(a)产生的细胞足以使 TNKS1/2 基因或其他负责 Axin 稳定的基因的 mRNA 转录本降解的时间,从而抑制所述基因在细胞中的表达。

[0337] 在另一实施方案中,本发明提供抑制细胞中 TNKS1/2 基因或其他负责 Axin 稳定的基因表达的载体,包括有效地连接编码本发明一种 siRNA 的至少一条链的核苷酸序列的调控序列。

[0338] 本发明的抑制性核酸化合物可通过常规手段在市售可得的自动 DNA 合成仪,例如 Applied Biosystems(Foster City, CA) 型号 380B, 392 或 394DNA/RNA 合成仪或类似仪器上合成。可使用亚磷酰胺化学物。本发明的抑制性核酸化合物也可被修饰,例如可使用描述于许多文献中的抗核糖酶骨架如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、氨基磷酸酯等。抑制性核酸的长度需要足以保证生物活性被抑制。因此,例如在反义寡核苷酸的情形下,需要足够长至保证只在想要的靶多核苷酸而不在其他偶然的位点处发生特异结合。长度上限由若干因素决定,包括合成和纯化长度大于约 30–40 个核苷酸的寡聚物的不便性和花费,较长寡核苷酸比较短寡核苷酸对于错配的更大耐受性,等。优选地,本发明的反义寡核苷酸具有约 15 至 40 个核苷酸范围的长度。更优选地,寡核苷酸部分具有约 18 至 25 个核苷酸范围的长度。

[0339] 双链 RNA,即有义-反义 RNA,也称作小干涉 RNA(siRNA) 分子,也可以用于抑制 TNKS1/2 基因或其他负责 Axin 稳定的基因的核苷酸表达。RNA 干涉是给予外源性短 RNA 双链的方法,其中一条链对应于靶 mRNA 的编码区(Elbashir 等人, (2001) Nature 411 :494)。在进入细胞时,siRNA 分子不仅造成外源 RNA 双链的降解,而且也造成具有相同序列的单链 RNA,包括外源信使 RNA 的降解。因此,siRNA 可能比传统反义 RNA 方法更加有力和有效,因为相信该技术通过催化机制起作用。优选的 siRNA 分子通常长度为 19–25 个核苷酸,优选长约 21 个核苷酸。将 siRNA 递送到靶细胞的有效策略包括例如,使用物理或化学转染进行转导。

[0340] 或者,可使用,例如允许功能 siRNA 或其前体转录的多种 PolIII 启动子表达盒在细胞中表达 siRNA。参见例如, Scherr 等人, (2003) Curr. Med. Chem. 10 (3) :245;Turki 等人, (2002) Hum. Gene Ther. 13 (18) :2197;Cornell 等人, (2003) Nat. Struct. Biol. 10 (2) :91。本发明也涵盖其他能够介导 RNA 干涉(RNAi)的小 RNA,例如微 -RNA(miRNA) 和短发夹 RNA(shRNA)。

[0341] 下面的实例是实施本发明方面所用的技术的代表。应理解尽管这些技术是实施本发明优选实施方案的示例,但本领域技术人员考虑本公开内容,将意识到可以进行多种修改而不悖离本发明的精神和想要的范围。

实施例

[0342] 实施例 1 :筛选检测以鉴定小分子 Wnt 抑制剂

[0343] 为了鉴定 Wnt/β - 连环蛋白途径的小分子抑制物,在 HEK293 细胞中使用 Wnt- 反应性 Super-Topflash (STF) 荧光素酶报告子检测法,进行多于一百万种化合物的高通量化合物筛选。根据其选择性图谱和效力,后续研究关注于在此称作 XAV939 化合物。XAV939 强烈抑制 HEK293 细胞中 Wnt3A 刺激的 STF 活性,但不影响 CRE、NF-κ B 或 TGF β 荧光素酶报告子。相反,XAV939 的紧密结构类似物 LDW643 对 Wnt3A 诱导的 STF 报告子没有活性。发现 XAV939 治疗阻断 HEK293 细胞中 Wnt3A 诱导的 β - 连环蛋白积累,表明该化合物调节 β - 连环蛋白上游的 WNT 途径活性。

[0344] 为了检测 XAV939 是否作用于破坏复合体的上游或该破坏复合体水平来促进 β - 连环蛋白降解,检测了化合物治疗在结直肠癌细胞系 SW480 细胞中的作用。SW480 细胞系带有截短的 APC 等位基因并因此具有受损的破坏复合体活性。令人感兴趣的是, XAV939 也抑制 SW480 细胞中的 STF 活性,虽然没有 HEK293 细胞中的程度大,该 HEK293 细胞中具有完整的 WNT 途径级联。与在 STF 活性中的这一降低一致,XAV939 减少 SW480 细胞中的 β - 连环蛋白丰度但显著增加 β - 连环蛋白磷酸化 (S33/S37/T41),表明 XAV939 促进 β - 连环蛋白的磷酸化依赖的降解。这些发现表明 XAV939 即使在具有受损 APC 功能的细胞中也可以恢复 β - 连环蛋白降解,这可能是通过调节该破坏复合体的活性。

[0345] 为了探究 XAV939 可如何增加破坏复合体的活性,研究了化合物治疗对已知 WNT 途径组分的蛋白水平的影响。惊人地,在 XAV939 治疗后,Axin1 和 Axin2 的蛋白水平强烈增加,而它们的转录本水平不受化合物治疗的影响。此外,观察到 Axin-GSK3 β 复合体形成的强烈增加,假定这是由于响应增加的 Axin 蛋白水平而对 Axin 复合体的增强的 GSK3 β 募集。这一现象被在 DLD-1 细胞中观察到 XAV939 对 Axin1/2 蛋白水平,β - 连环蛋白降解和 β - 连环蛋白靶基因表达的影响所证实,该 DLD-1 细胞是具有截短的 APC 的另一结直肠癌细胞系。

[0346] 重要地, siRNA- 介导的 Axin1/2 在 SW480 细胞中的消耗使 XAV939 对 β - 连环蛋白降解的影响逆转,并减少 XAV939 对 STF 报告子的抑制活性,进一步地表明 XAV939 通过增加 Axin1/2 蛋白水平而抑制 WNT 信号。这些发现一起表明 XAV939 增加 GSK3 β -Axin 复合体形成并从而促进 β - 连环蛋白的 GSK3 β - 依赖的磷酸化和蛋白酶体降解。

[0347] 至少在实施例 1 中描述的 SuperTopFlash (STF) 方法使用按下述制造的质粒:通过将 12 个 TCF 结合位点插入 pTA-Luc (Clontech) 而产生 SuperTopflash 报告子。将小鼠 Axin1 和它的突变体与 GFP 或 FLAG 表位在氨基末端融合并克隆到金属硫蛋白启动子控制下的逆转录病毒载体中。人 TNKS1/2 和它的突变体用在氨基末端融合的 FLAG 表位来标记,并克隆到巨细胞病毒 (CMV) 启动子控制下的哺乳动物表达载体中。与三个 HA 表位在羧基末端融合的果蝇 Axin 克隆到金属硫蛋白启动子控制下的果蝇表达载体中。将编码小鼠 Axin1 的氨基末端片段 (氨基酸 1-87) 的序列克隆到 Tet- 调控的表达载体 pcDNA4-T0 (Invitrogen) 中。使用 Gateway 技术 (Invitrogen) 将若干蛋白克隆到表达载体 pDEST15 (Invitrogen, Carlsbad, CA) :TNKS1-P (1088-1327)、TNKS2-P (934-1166)、TNKS2-SP (872-1166)、PARP1-P (662-1014) 和 PARP16-P (93-273)。

[0348] 实施例 3 :XAV939 通过抑制端锚聚合酶来调控 Axin 蛋白水平

[0349] 实施例 3a :iTRAQ 定量化学蛋白组学方法

[0350] 为了鉴定 XAV939 通过它来上调 Axin 蛋白水平的细胞效力靶标, 使用 3 通道 iTRAQ 定量化学蛋白组学方法。这一策略是基于 XAV939 的生物活性类似物的固定化以对来自 HEK293 细胞裂解物的细胞蛋白亲和捕获。为了将特异结合与非特异结合相区别, 通过在用固定化化合物进行孵育之前, 将过量 (20 μ M) 亲本化合物 XAV939、无活性类似物 LDW643 或 DMSO 摄加到细胞裂解物来进行竞争实验。与固定化化合物, 例如假定的效力靶标和潜在的脱靶标的特异结合将由 XAV939 (而非 LDW643) 竞争。

[0351] 通过使用化学肽标记技术的 iTRAQ, 重复 3 次样品并由 LC-MS/MS 分析相对于介载体 (DMSO) 来量化结合替代 (竞争%)。量化了总共 699 种蛋白质。然而, 只有 18 种蛋白质被可溶性 XAV939 显著地且特异地竞争掉 (> 65%, > 平均值的 2 σ), 包括聚 (ADP- 核糖) 聚合酶 PARP1 (93% 竞争), PARP2 (88% 竞争), PARP5a/TNKS1 (79% 竞争) 和 PARP5b/TNKS2 (74% 竞争)。此外, 含有已知 PARP1 底物的若干蛋白分子, 如 KU70 复合体组分 (XRCC5, XRCC6) 和 FACT 组分 (SUPT16H, SSRP1) 被显著地竞争, 假定是由于和 PARP1 一起的共纯化。大多数蛋白未被竞争的 (< 平均值的 2 σ), 表明这些是高丰度的低亲和结合物、或是在以与溶液中的游离化合物结合所不同的结合模式富集到亲和基质上的蛋白质。

[0352] 按 Bantscheff 等人 (2007) 所述进行 iTRAQ 方法。简言之, 横过分离范围将凝胶泳道切片, 并进行凝胶内的胰蛋白酶消化, 随后进行 iTRAQ 标记 (Applied Biosystems)。用 iTRAQ 试剂 116 来标记从 DMSO 介载体对照提取的肽并与来自分别用 iTRAQ 试剂 114 和 115 标记的化合物处理的样品的提取物组合。通过在 LTQ-Orbitrap 质谱仪 (Thermo-Finnigan) 上的液相色谱 - 串联质谱进行测序。使用脉冲-Q 分离产生串联质谱, 使得可以对 iTRAQ 报告子离子的检测。用 Mascot (Matrix Science), 使用肽质量和分段数据来查询 IPI 数据库的内部专业版 (curated version)。使用诱饵数据库来验证蛋白鉴定。用内部开发的软件来进行基于 iTRAQ 报告子离子的量化。

[0353] 实施例 3b : 化合物竞争

[0354] 为了建立对已鉴定的 PARP 蛋白的体内结合亲和, 进行剂量反应化合物竞争实验, 这显示出 XAV939 以 0.1 μ M 阻断 TNKS 结合并且以 1 μ M 阻断 PARP1/2 结合。如所期待, 无活性化合物 LDW643 在这一检测中没有活性。使用 Cy5- 标记的 XAV939 和重组 PARP 蛋白进一步表征化合物结合。发现 XAV939 紧密结合 TNKS1 和 TNKS2 的催化 (PARP) 结构域 (分别为 K_d 0.099 μ M 和 0.093 μ M)。XAV939 也结合重组 PARP1, 但以较低的结合亲和性 (K_d 1.2 μ M)。

[0355] 为了测定 XAV939 与 TNKS1、TNKS2 和 PARP1 的亲合性 (平衡解离常数, K_d), 将含有 TNKS1、TNKS2 或 PARP1 的 PARP 结构域的 GST 融合蛋白滴定与在 50 mM Tris-HCl pH 8.0/50 mM NaCl/0.08% Triton X-100/10 mM MgCl₂ 中的 50 nM 缀合 Cy5 的 XAV939 (XAV939^{Cy5}) 于 30 °C 在黑 384 孔板中孵育 2 小时。随后, 使用对 Cy5FP 优化的光学 (优化的 Cy5FP 二元发射标记, Perkin-Elmer) 在 Perkin-Elmer Envision 读板器中获得荧光偏振 (FP) 数值。输出原始 mP [1000x (S-G*P/S+G*P)] 数据并使用 GraphPad Prism 用单位点总结合饱和算法来分析。

[0356] 实施例 3c : siRNA 实验

[0357] 为了测定哪个 (些) PARP 家族成员是 XAV939- 诱导的 Axin 蛋白积累的实际效力靶标, 评估了它们的 siRNA- 介导的功能丧失表型。为了避免密切的家族成员之间的潜在的冗余, 同时靶向两种端锚聚合酶旁系同源物 TNKS1 和 TNKS2, 以及 PARP1 和 PARP2。显著地, TNKS1 和 TNKS2 的共消耗通过增加 Axin1 和 Axin2 两者的蛋白水平来表型模拟 XAV939 的作

用,而 PARP1/2 击倒不影响 Axin 蛋白水平。与 XAV939 显示对 TNKS1/2 比对 PARP1 亲和性更高的事实一起,这些结果强烈地表明 TNKS1 和 TNKS2 是 XAV939 的细胞效力靶标。

[0358] 使用其它 siRNA 来进一步证明在 SW480 细胞中 TNKS1 和 TNKS2 的共消耗增加 β -连环蛋白磷酸化,减少 β -连环蛋白丰度,和抑制 β -连环蛋白靶基因的转录。显著地, TNKS1 或 TNKS2 单独的消耗不导致 Axin1/2 蛋白水平的增加,表明 TNKS1 和 TNKS2 在调节 Axin 蛋白水平上冗余地起作用。TNKS1 和 TNKS2 的共消耗也在 HEK293 和 DLD-1 细胞中表型模拟 XAV939。

[0359] 由于许多关键 Wnt 途径组分是进化上保守的,检查了 TNKS 也调控果蝇细胞中 Axin 蛋白水平和 Wnt 信号的能力。靶向果蝇 TNKS 的双链 RNA(dsRNA) 增加在 S2 细胞中外源表达的果蝇 Axin 的蛋白水平,而非 mRNA 水平。此外, TNKS dsRNA 特异地抑制 Wnt/ 无翅报告子,但不影响 BMP 或 JAK/STAT 途径活性。这些结果支持了 TNKS 在调控 Axin 蛋白水平和 Wnt 信号的进化上保守的作用。

[0360] TNKS1 和 TNKS2 是聚 (ADP- 核糖) 聚合酶 (PARP) 家族的成员,其通过添加多 ADP- 核糖单元在翻译后修饰它们的底物,称作聚 -ADP- 核糖化 (聚 ADP- 核糖化)。使用 siRNA- 拯救方法来测定 TNKS 的聚 ADP- 核糖化活性对于调控 Axin 蛋白水平是否是必要的。当耗尽内源性 TNKS1/TNKS2,由强力霉素反应性启动子来诱导外源 siRNA- 抗性野生型 TNKS2 或无催化活性 TNKS2-M1054V 突变体的表达 (Sbodio, J. I. 等人, (2002) Biochem J 361, 451-9)。野生型而非突变 TNKS2 的表达拯救了 TNKS1/2 siRNA 对 Axin 蛋白表达的影响,表明端锚聚合酶的催化活性是 Axin 蛋白水平和 WNT 途径信号的调控所需要的。

[0361] 这一研究中使用的 siRNA 的序列如下,表 1 中所示:

siRNA	有义链(5' -> 3')	反义链(5' -> 3')	供应商
TNKS1A	CUACAACAGAGUUUCGAAUAIUU	UAUUCGAACUCUGUUGUAGUU	Dharmacon
TNKS1B	GCAUGGAGCUUGUGUUAAUUU	AUUUACACAAGCUCCAUGCUU	Dharmacon
TNKS2A	GAGGGUAUCUCAUUAAGGUAUU	UACCUAAUGAGAUACCUCUU	Dharmacon
TNKS2B	GGAAAAGACGUAGUUGAAUAUU	UAUIUCAACUACGUCUUUCCUU	Dharmacon
AXIN1	GGGGCAUUAUCUGGAUACCUGdTdT	CAGGUUAUCCAGAU AUGCCdTdT	Ambion
AXIN2	GAGUAGGCCAAAGCGAUCUAddTdT	UAGAUCGCUUUGGCCUACUCdTdT	Qiagen
PARP1	AAAAACAGGUAUJGGUAUAAA	AUAUCCAAUACCUGUUUUCUU	Dharmacon
PARP2	AAGGAUUGCUUCAAGGUAAA	UUACCUUGAAGCAAUCUUU	Dharmacon
PGL2	CGUACCGGGAAUACUUCGAddTdT	UCGAAGUAUUCCGCGUACGdTdT	Dharmacon
CTNNB1 SP	GAUCCUAGCUAUCGUUCUUUU	AAGAACGUAUAGCUAGGAUCUU	Dharmacon
[0362]	UAAUGAGGACCUAACUJUAUU	UAAGGUUAAGGUCCUCAUUAUU	
	GCGUUUUGGCUGAACCAUCAUU	UGAUGGUUCAGCCAAACGCUU	
TNKS1 SP	GGUACGAGCUGCUAUGUUUU	GAACAUAGCAGCUCGUACCUU	
	CUACAAACAGAGUUUCGAAUAUU	UAUUCGAACUCUGUUGUAGUU	Dharmacon
TNKS2 SP	GCAUGGAGCUUGUGUUAAA	AUUUACACAAGCUCCAUGCUU	
	CGAAAAGAGCCCACUAAUGAAA	AUCAUUAUGGGCUCUUUCGUU	
	GAGAGUACACCUAACGUAAA	UACGUUAUAGGUGUACUCUU	
	GAGGGUAUCUCAUUAAGGUAAA	UACCUAAUGAGAUACCUCUU	
	GGAAAAGACGUAGUUGAAUAAA	UAUUCAACUACGUCUUUCCUU	
	UAGCAUAAACUCAUUCGUAAA	UACGAUUAUGAGUUAUGCUAAA	
	AGACAGAACUUGUUACAUUUU	AAUGUAACAAGAACUGUCUUU	Dharmacon

[0363] 表 I

[0364] 实施例 3d : 自聚 ADP- 核糖化活性检测

[0365] 基于上面这些结果,检查了 XAV939 通过抑制端锚聚合酶的聚 ADP- 核糖化活性来调控 Axin 蛋白水平的能力。使用体外聚 ADP- 核糖化检测法对 TNKS2 的 C 端 PARP 结构域 (GST-TNKS2PARP) 有效地进行自 - 聚 ADP- 核糖化 (auto-PARsylation) 并且这被 XAV939 完

全抑制。相反,自聚 ADP- 核糖化不受无活性对照化合物 LDW64 3 的影响。报道了 TNKS 的自聚 ADP- 核糖化通过泛素 - 蛋白酶体途径来促进其降解 (Yeh, T. Y. 等人, (2006) Biochem J399, 415–25)。发现 XAV939 处理显著增加 TNKS 蛋白水平、表明 XAV939 也抑制体内的 TNKS 自 - 聚 ADP- 核糖化。这些遗传和生化分析一起表明 XAV9 39 通过抑制 TNKS 的催化活性而增加 Ax in 蛋白水平。

[0366] 为了评估化合物对 TNKS 的自 - 聚 ADP- 核糖化的影响,按下面进行体外自 - 聚 ADP- 核糖化检测 :

[0367] 端锚聚合酶,利用 NAD⁺,催化其自身 (自聚 ADP-核糖化) 或靶蛋白 (底物聚 ADP-核糖化) 的聚 (ADP- 核糖基) 化。在各反应周转中,酶消耗一个单位的 NAD⁺,向聚合物链添加一个单位的 ADP- 核糖,释放一个单位的烟酰胺。设计自聚 (ADP- 核糖) 化活性检测来监控烟酰胺形成和烟酰胺形成在存在端锚聚合酶小分子抑制物下的减少。通过液相色谱 / 质谱 (LC/MS) 进行烟酰胺的量化。该检测配置为 384 孔形式并适于高通量筛选。

[0368] 通常,在含有下述的反应溶液中,以 40 μ L 体积进行自聚 (ADP- 核糖) 化反应 : 5 μ L 化合物 (在 20% DMSO 中),在测试缓冲液中的 (50mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM MgCl₂, 50mM NaCl, 1mM DTT, 0.02% Tween-20, 8% 丙三醇) 中的 15 μ L 端锚聚合酶, 20 μ L 的 NAD⁺。最终反应混合物含有浓度为 0.0086–18.75 μ M 的化合物 (抑制物), 2.5 % DMSO, 20nM GST-TNKS2P (或 60nM GST-TNKS1P), 250 μ M NAD⁺。所有的反应在室温下于 384- 孔 Greiner 平底板 (Costar, Cat. No. 781201) 上进行 120min, 然后通过加入含有 500nM d4- 烟酰胺 (CDN Isotopes, Inc. Cat. No. D3457) 的 10 μ L 20% 甲酸而淬火。LC/MS 分析之前, 加入两等分乙腈后通过沉淀 / 离心方法除去反应混合物中的蛋白。然后将所获得的上清液注射到 LC/MS/MS 体系 (Agilent 1200SL LC 体系, LEAP CTC HTC 自动进样器和 Sciex API 4000 质谱仪), 其中烟酰胺和氘化的的内部标准由 Hypercarb 柱 (2.1X20mm, 5 μ M 颗粒, Thermo Scientific Inc) 保留, 梯度洗脱并由在电喷射离子化的正模式下操作的质谱仪来检测。

[0369] LC 以 1mL/min 的流速而乙腈为 0.8min 中 5 至 95% 的梯度运行。将 25mM 重铬酸铵 (ammonium biocarbonate) 加入水性流动相而 0.1% 氢氧化铵加入乙腈流动相。质谱仪以 MRM 模式运行并且对于烟酰胺和 d4- 烟酰胺的质量转换分别是 123 → 80 和 127 → 84。报道了对于相应样品孔的相对反应 (由酶反应产生的烟酰胺与内部标准的 d4- 烟酰胺的比率) 来评估抑制物活性或绘制 IC₅₀ 曲线。注意 : IC₅₀ < 0.0086nM 或 IC₅₀ > 10 μ M 表明实际的 IC₅₀ 脱离了实验范围。用于端锚聚合酶 1 和端锚聚合酶 2 检测的蛋白分别是截短的 N-GST- 端锚聚合酶 1 (1088–1327) 和截短的 N-GST- 端锚聚合酶 2 (934–1166)。

[0370] 实施例 4 :TNKS 与 Axin 的保守 N 端结构域的结合对于调节 Axin 蛋白水平是至关重要的

[0371] 为了探究 TNKS 如何调控 Axin 蛋白水平, 进行共免疫沉淀实验, 其中发现 TNKS1 和 TNKS2 在 SW480 细胞中与 Axin2 相关联。此外, 在酵母双杂交检测中检测到了 Axin1/2 和 TNKS1/2 的强烈结合。按下面进行酵母双杂交检测 :

[0372] 使用 Matchmaker 双杂交体系 3 (Clontech), 按制造商的说明来完成酵母双杂交检测。简言之, 将小鼠 Axin1 的不同片段克隆到诱饵质粒 pGBK-T7, 并且将人 TNKS1 的不同片段克隆到被捕食物质粒 pGAD-T7。用诱饵和被捕食物质粒转化 AH109 细胞。在 Trp- 和 Leu- 板上筛选双转化体并用提升过滤 (filter lift) 的 5- 溴-4- 氯-3- 吡啶基 -β-D- 半

乳毗喃糖昔 (X-gal) 检查 LacZ 表达。

[0373] 为了限定 Axin1 的 TNKS 结合结构域, 对多种 Axin1 片段检测它们结合 TNKS 的能力。惊人地, 包括 Axin 内的氨基酸的最保守片段的 Axin1 的小 N 端区域 (氨基酸 19–30) 是与 TNKS1 相互作用所必需的且足以进行该相互作用的。Axin1 与 TNKS1 通过这一小 N 端区域, 在此称作 TBD (端锚聚合酶结合结构域) 特异相互作用, 进一步通过 GST pull-down 和共免疫沉淀检测法所证实。

[0374] 通过将 pcDNA4-TO-Axin1 1–87 稳定转染到 HEK293-TRX 细胞 (Invitrogen) 并用 10ng/ml 强力霉素诱导细胞 24 小时, 完成了氨基端 Axin1 的诱导表达。用 Dual Luciferase Assay 试剂盒 (Promega) 按照制造商的说明进行荧光素酶检测。

[0375] 评估了打断 Axin 和 TNKS 之间物理相互作用的功能后果。虽然表达野生型 GFP-Axin1 的细胞显示了响应于 XAV939 治疗而被强烈增加的低基底蛋白水平, 但表达 GFP-Axin1 Δ 19–30 的细胞已经展现出不进一步响应化合物处理的高基底蛋白水平。重要地, 通过将 IRAP 或 TRF1 的异源性 TNKS 结合结构域与 GFP-Axin1 Δ 19–30 融合而恢复 TNKS1-Axin1 相互作用使其对 XAV939 的响应完全恢复。这些结果表明 Axin 的 N 端结构域的过表达可与内源性 Axin 对 TNKS 的结合相竞争, 并因此增加内源性 Axin1 的蛋白水平。事实上, GFP-Axin1N (氨基酸 1–87), 而非缺失 TBD (缺少氨基酸 19–30) 的突变体的过表达, 实质上增加了内源性 Axin1 蛋白水平而没有影响它的 mRNA 表达。这些结果一起表明由进化保守的 TBD 介导的 Axin 和 TNKS 之间的物理相互作用对于体内调控 Axin 蛋白是至关重要的。

[0376] 端锚聚合酶含有用于底物结合的锚蛋白重复结构域, 用于自身寡聚化的 SAM 结构域, 和用于催化活性的 PARP 结构域。使用酵母双杂交检测, 显示出 TNKS1 的 III、IV 和 V 锚蛋白重复结构域的区域是它与 Axin1 相互作用所需的并且足以进行该相互作用。检测了 TNKS 过表达对 Wnt 信号的影响, 这揭示了 TNKS1 在 HEK293 细胞中的瞬时转染显著增加 STF 报告子活性并稳定 β-连环蛋白。这一活性需要 TNKS1 的 Axin 结合结构域和 SAM 结构域, 而非 PARP 结构域。报道了过表达的 TNKS 通过 SAM 结构域介导的寡聚化形成大的栅格样结构。(De Rycker, M. 等人, (2004) Mol Cell Biol 24, 9802–12)。我们假设过表达的 TNKS 捕获这一栅格样结构的 Axin 并阻止它在 β-连环蛋白破坏复合体中执行正常功能。

[0377] 实施例 5 : 免疫印迹、免疫沉淀和 GST pull-down 检测

[0378] 通过在 RIPA 缓冲液 (50mM Tris-HCl, pH 7.4, 150mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% 脱氧胆酸钠, 0.1% SDS, 1mM EDTA) 中裂解细胞来制备全细胞裂解物。通过 SDS-PAGE 分离等量蛋白质, 转移到硝酸纤维素膜并用所指示的抗体探测。对于共免疫沉淀实验, 在 EBC 缓冲液 (50mM Tris-HCl, pH 7.4, 150mM NaCl, 0.5% NP-40, 1mM EDTA) 中裂解细胞, 用指示的抗体和 ProteinG-sepharose 珠在 4°C 孵育澄清后的细胞裂解物过夜。用裂解缓冲液洗涤珠五次。将结合的蛋白质溶解在 SDS 上样缓冲液中, 用 SDS-PAGE 分离, 并用指示的抗体进行印迹检测。为了检测蛋白体内泛素化和聚 ADP- 核糖化, 用补充有 5mM NEM 和 5 μM ADP-HPD 的 RIPA 缓冲液裂解细胞以阻断去泛素化酶和 PARG 的活性, 并且随后用所指示的抗体进行免疫沉淀。

[0379] 对于 GST pulldown 检测, 在大肠杆菌中生产 GST-Axin1 融合蛋白并用谷胱甘肽 - 琼脂糖珠 (Amersham Biosciences) 进行纯化。用 EBC 缓冲液裂解过表达 Flag-TNKS1

的 HEK293 细胞,用带有 GST 融合蛋白的谷胱甘肽 - 琼脂糖珠在 4°C 孵育澄清的裂解物 4 小时,然后用 EBC 缓冲液洗涤珠五次。用 SDS-PAGE 分离结合物质并用指示的抗体进行印迹检测。为了产生胞质裂解物,将细胞刮到低渗缓冲液 (10mM Tris-HCl pH7.5, 10mM KC1), 并且在 4 次冻融循环后离心澄清细胞裂解物。在所有上面的实验中, 将 1x 蛋白酶抑制物混合物 (Sigma) 和 1x 磷酸酶抑制物混合物 (Upstate) 加入裂解缓冲液中。用于这一研究中的商品化抗体包括山羊抗 -Axin1 抗体 (R&DSystems)、兔抗 -Axin2 抗体和兔抗 - 磷酸化 - β - 连环蛋白 (pSer33/37/Thr41) 抗体 (Cell Signaling Technology)、小鼠抗 -TNKS 抗体 (Abcam)、小鼠抗 -HA (HA.11) 抗体 (Covance)、小鼠抗 - β - 连环蛋白抗体、兔抗 - 聚 (ADP- 核糖) 抗体和兔抗 -PARP1 抗体 (BD Pharmingen)、小鼠抗 - 泛素抗体 (MBL)、兔抗 -GFP 抗体 (Clontech)、小鼠抗 - 微管蛋白和小鼠抗 -Flag (M2) 抗体 (Sigma)。

[0380] 实施例 6 :XAV939 通过调节 Axin 的泛素化和聚 ADP- 核糖化来稳定 Axin

[0381] Axin 蛋白响应 XAV939 治疗的增加可能由于对翻译或蛋白稳定性的调节。与后一可能性一致,发现 XAV939 治疗显著延长 SW480 细胞中的内源性 Axin2 的半衰期。Axin 的降解可能被泛素 - 蛋白酶体途径所介导,因为 Axin1 的聚泛素化在加入蛋白酶体抑制物 MG132 后显著增加。相反, XAV939 与 MG132 的共处理显著减少 Axin1 和 Axin2 的聚泛素化,表明 XAV939 可能通过阻止其聚泛素化而使 Axin 稳定。

[0382] TNKS 的自 - 聚 ADP- 核糖化或 TNKS- 介导的 TRF1 聚 ADP- 核糖化分别导致 TNKS 或 TRF1 增加的泛素化和降解 (Yeh, T. Y. 等人, (2006) Biochem J 399, 415-25; Chang, W. 等人, (2003) Genes Dev 17, 1328-33)。TNKS 与 Axin 物理性地相关联并且对于 Axin 蛋白水平的调控需要它的聚 ADP- 核糖化活性,与这一内部结果一起,这表明可通过由 TNKS 的直接聚 ADP- 核糖化来促进 Axin 降解。事实上, TNKS2 能够使含有 TBD 的 Axin1 片段 (氨基酸 1-280) 在体外聚 ADP- 核糖化,这被 XAV939 处理完全抑制。使用特异识别聚 ADP- 核糖化 (PAR) 修饰的抗体,发现外源性表达的 GFP-Axin 在细胞中聚 ADP- 核糖化。此外,在存在 XAV939 下,聚 ADP- 核糖化信号被强烈减少,表明 TNKS 可在体内介导 Axin 聚 ADP- 核糖化。

[0383] 用 XAV939 处理细胞以增加内源性 Axin2 水平,这使得内源性 Axin2 泛素化和聚 ADP- 核糖化更容易被检测。在洗掉 XAV939 后, Axin2 在一小时内快速降解。如所期望,用 MG132 处理细胞阻断了 Axin2 降解并强烈地增加其聚泛素化。然而,用 XAV939 和 MG132 的共处理完全阻断了 Axin2 的泛素化。令人感兴趣的是,与 Axin2 共迁移的抗 -PAR 抗体反应性信号在单独用 MG132 处理细胞时被检测到,而在也用 XAV939 处理细胞时消失。这些结果一起表明 TNKS 促进 Axin 的泛素化和降解,这可至少部分地,通过 Axin 的直接聚 ADP- 核糖化而被介导。

[0384] 实施例 7 :XAV939 抑制 APC- 突变 DLD-1 癌细胞的集落形成

[0385] 将 APC 突变的结直肠癌与组成型活化的 β - 连环蛋白信号相联系的强有力的遗传证据促进了对于鉴定 WNT 途径抑制物的许多努力,但是已经证明寻找特异阻碍失调的 WNT 途径活性的药学抑制物面临挑战。根据 XAV939 即使在 APC 突变细胞中也能够抑制 β - 连环蛋白的内在发现,检测了这一化合物抑制 APC 突变结直肠癌细胞增殖的能力。当用一组具有靶向 β - 连环蛋白的可诱导的 shRNA 筛选细胞系时,发现结直肠癌细胞系 DLD-1 对于 shRNA- 介导的 β - 连环蛋白抑制最敏感。此外,相比于在 SW480 细胞中,通过 XAV939 对 β - 连环蛋白靶基因的调控在 DLD-1 中更强。使用 RKO 结直肠癌细胞系,其没有任何 WNT 途

径突变，并且对于作为阴性对照的 β -连环蛋白消耗不敏感。在低血清生长条件下，XAV939 显著抑制 DLD-1 细胞的集落形成，而 LDW643 的无活性结构类似物即使在最高浓度下也不影响增殖。重要地，XAV939 不影响非 β -连环蛋白依赖型 RKO 细胞中的集落形成。

[0386] 按下面进行集落形成检测：将 DLD1 和 RKO 细胞分别以 500 和 1000 细胞 / 孔接种到 6 孔板中的低血清生长培养基 (0.5% FBS)。铺板 16 小时后，按指示浓度加入化合物。每两天补充培养基直到观察到集落形成。将集落用在缓冲福尔马林中的 2mg/ml 结晶紫溶液染色并在 Molecular ImagerChemiDoc XRS System(BioRad) 上成像。

[0387] 已经描述了 TNKS1/TNKS2 调控有丝分裂进展、端粒维持和 GLUT4 转运 (Canudas, S. 等人, (2007) Embo J 26, 4867-78 (2007); Seimiya, H. 等人, (2002) J Biol Chem 277, 14116-26)。特别地，提出 TNK1 是分离姐妹端粒联合或双极性纺锤体组装所需的，并且报道了 TNK1 击倒造成强的有丝分裂停滞。(Chang, P. 等人, (2005) Nat Cell Biol 7, 1133-9; Dynek, J. N. 等人, (2004) Science 304, 97-100) 然而，用这一研究中的细胞系，不管在低血清还是高血清条件下，使用 XAV939 处理或单独 / 组合的 TNKS1/TNKS2 siRNA 击倒没有导致任何明显的有丝分裂停滞表型，表明 XAV939 不通过抗有丝分裂功能来抑制 DLD1 细胞的增殖。

[0388] 如果 XAV939 对 DLD1 细胞的抗 - 增殖作用其实是被 Axin 蛋白水平的增加所介导，那么将预测 Axin1/2 表达的击倒会拯救化合物处理的抗 - 增殖作用。事实上，siRNA- 介导的 Axin1/2 的消耗完全消除了 XAV939 的抗增殖作用。这些发现一起表明 XAV939 在 DLD1 细胞中的抗增殖作用是由于 WNT 途径信号的 Axin 依赖型抑制。

[0389] 至少在实施例 6 中描述的细胞培养方法按下面进行：于含有 5% CO₂ 的 37°C 湿度培养箱中，在补充有 10% FCS 的 DMEM 或 RPMI1640 中生长 HEK293、SW480、DLD1 和 RKO 细胞。按照制造商的说明，使用 Fugene 6 (Roche) 进行质粒转染并使用 Darmafect 1 (Dharmacon) 进行 siRNA 转染。

[0390] 实施例 8 :材料和方法

[0391] 在此提及但还没有详细描述的用来进行实验，以及实现结果的任何材料和方法如下：

[0392] 实施例 8a :定量 RT-PCR

[0393] 使用 RNeasy Mini Kit (Qiagen) 提取化合物或 siRNA 处理的细胞的总 RNA，并用 Taqman 反转录试剂 (Applied Biosystems) 按照制造商说明进行反转录。使用 ABI PRISM 7900HT 序列检测系统来评估转录物水平。在由 0.6 μ l 的 20x Assay-on-Demand 混合物（对于每种引物为 18 μ M 的预混浓度和 5 μ M 探针），6 μ l Taqman 通用 PCR 主混合，和 5.4 μ l cDNA 模板组成的 12 μ l 反应中进行实时 PCR。所用的热循环条件为 50°C 持续 2min, 95°C 持续 10min，随后 95°C 持续 15sec 和 60°C 持续 1min 的 40 个循环。所有实验以三个重复进行。使用用持家基因 GUSB 进行归一化的比较 C_T 法进行基因表达分析。

[0394] 实施例 8B :脉冲追踪实验

[0395] 在代谢标记前一天以 2 百万细胞 / 板将 SW480 细胞接种到 10cm 板中。第二天，用 PBS 洗涤细胞 3X 并用没有 L- 甲硫氨酸 (Mediatech) 的 DMEM 使细胞饥饿 1 小时随后用 ³⁵S- 甲硫氨酸 (100 μ Ci/ml) (Amersham) 标记 30 分钟。完成标记后，除去培养基并用含有 100X 过量的冷甲硫氨酸的培养基代替。通过 RIPA 在指示的时间点收获细胞裂解物。将等量的放

射性标记裂解物用抗-Axin2 抗体过夜免疫沉淀。用 RIPA 缓冲液在第二天进行 SDS-PAGE 前彻底洗涤免疫沉淀物，然后进行转移。用 PhosphoImager 检测放射活性信号。

[0396] 实施例 8C：化合物亲和纯化

[0397] 本质上按所述 (Bantscheff 等人 2007) 进行化合物偶联和亲和纯化。合成具有 1° 胺基团的衍生的生物活性类似物 LDW639 以允许偶联到 NHS- 活化的 Sepharose 4 珠 (Amersham) 上。使用杜恩斯匀化器在冰上于裂解缓冲液 (50mM Tris/HCl pH 7.5, 5% 丙三醇, 1.5mM MgCl₂, 150mM NaCl, 20mM NaF, 1mM Na₃VO₄, 1mM DTT, 5 μM 花萼海绵诱癌素 A, 0.8% 聚乙二醇苯基醚-CA630 和蛋白酶抑制物混合物) 中使 293T 细胞均质化。通过离心预澄清裂解物并通过 Bradford 检测法来测量蛋白浓度。将化合物 X 和 Y 溶解在二甲亚砜 (DMSO) 中并于 4°C 以终浓度 20 μM (或 DMSO 单独) 加入到裂解物中 30min。然后加入 100 μl 阴性对照基质并重新开始在 4°C 再孵育 60min。离心后，将珠转移到柱 (MoBiTech) 中并洗涤。用 NuPAGE LDS 上样缓冲液 (Invitrogen) 洗脱结合物质并且洗脱物被还原、烷基化、在 4-12% NuPAGE 凝胶 (Invitrogen) 上分离，并用胶体考马斯亮蓝染色。

[0398] 实施例 8D：果蝇报告子检测

[0399] 将 S2R 细胞接种到 384- 孔板中并用所指示的 dsRNA 处理 3 天。然后用具有 0.5ng pPac-Renilla, 以及对于 Wnt 报告子检测时和 2.5ng Lef-Luc 和 2.5ng pPac-Lef1 一起, 对于 BMP 报告子检测时和 5ng pcopHSP-BRE-Luc 一起, 或者对于 JAK/STAT 检测时和 18ng Draf-Luc 一起, 用 Effectene (Qiagen) 转染细胞。PUC19 作为载体 DNA 加入以在每孔中得到 25ng 的 DNA。转染后 24 小时, 加入 12.5% 无翅条件培养基, 50ng/ml 重组人 BMP-2 (R&D Systems), 或 50% UPD 条件培养基, 并使用 Duo-Glo 荧光素酶检测试剂盒 (Promega) 在 48 小时后进行荧光素酶检测。使用 MEGAscript 高产率转录试剂盒 (Ambion), 将使用 T7- 连接的引物 (对于白, 正向 5'-ACCTGTGGACGCCAAGG-3' (SEQ ID NO:); 反向, 5'-AAAAGAACGTCGACGGCTTC-3' (SEQ ID NO:))。对于 TNKS, 正向, 5'-GATAGGATTGCGGATGAGGA-3' (SEQ ID NO:); 反向, 5'-TCCAATGAAGAAGAATCGGG-3' (SEQ ID NO:)) 从 S2R 细胞 RNA 扩增的 PCR 片段用于 dsRNA 生产。为了检测 TNKS 消耗对 Axin 的影响, 将稳定转染有 DAxin-3XHA 的 S2R 细胞接种到 24 孔板中并用所指示的 dsRNA 处理 5 天。

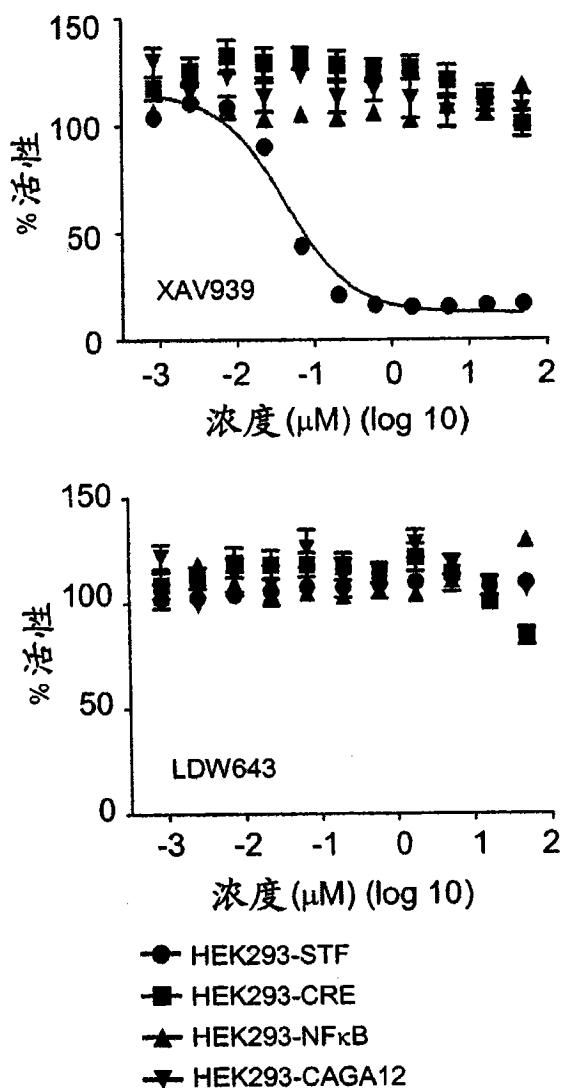


图 1A

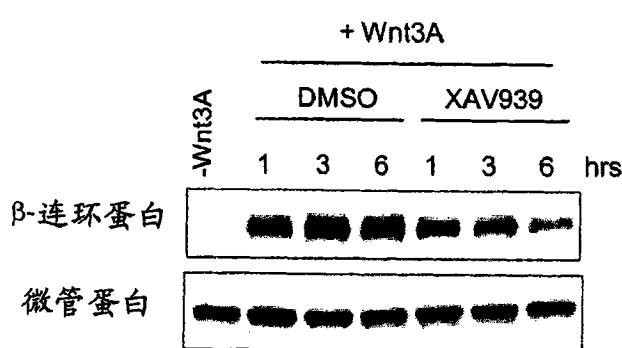


图 1B

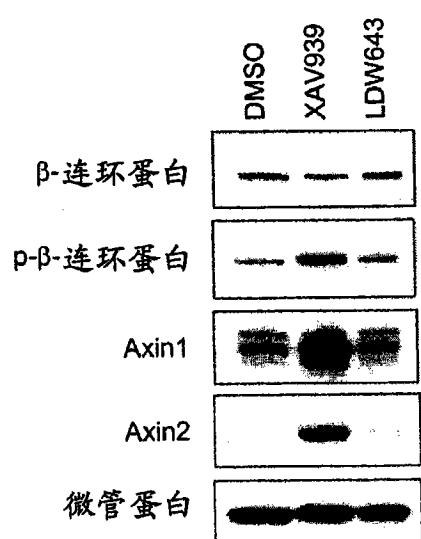


图 1C

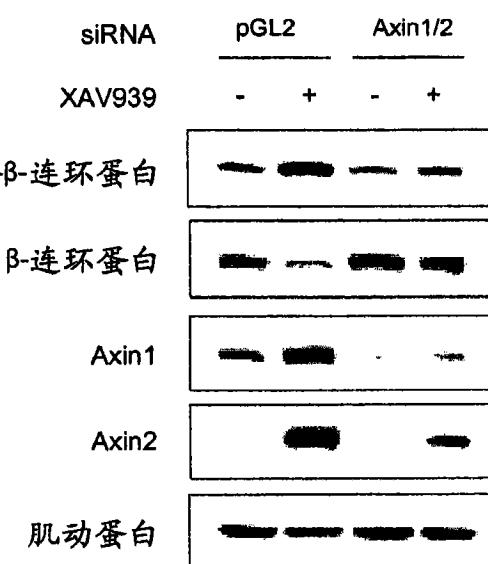


图 1D

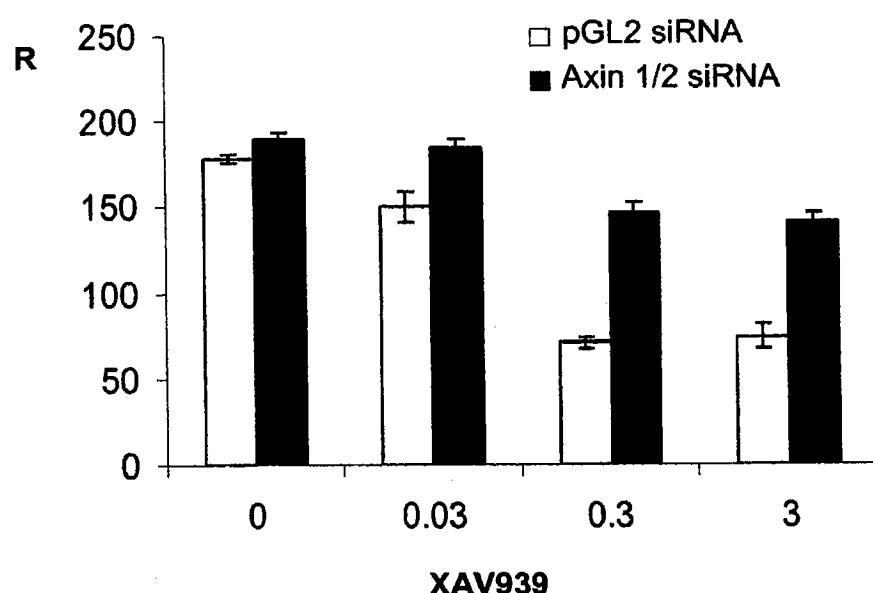


图 1E

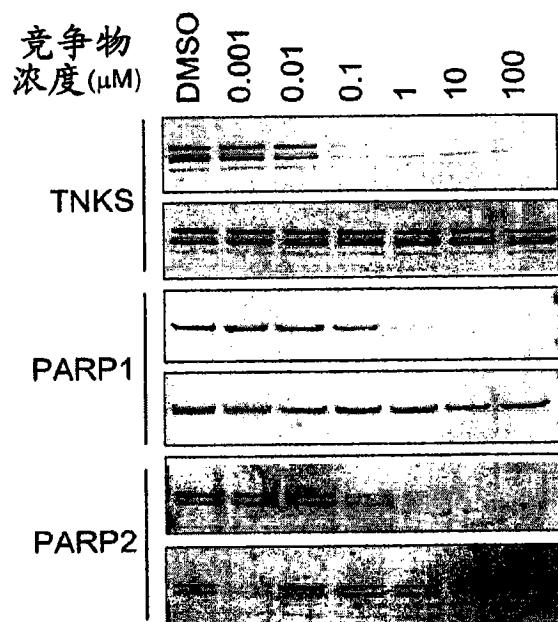


图 2A

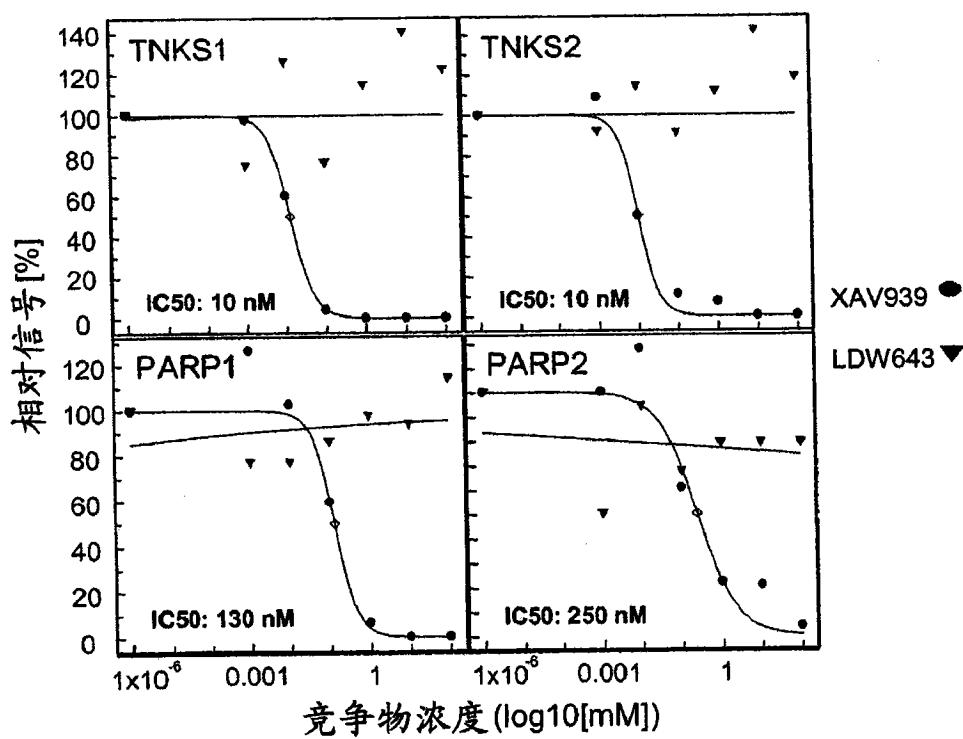


图 2B

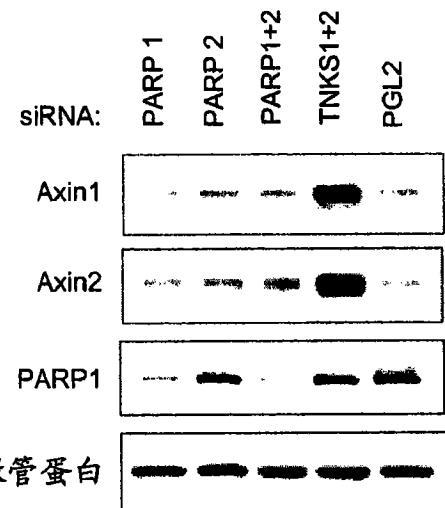


图 3A

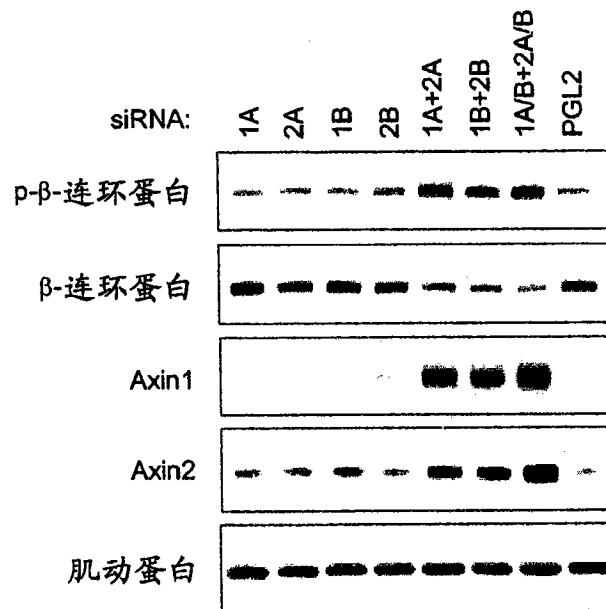


图 3B

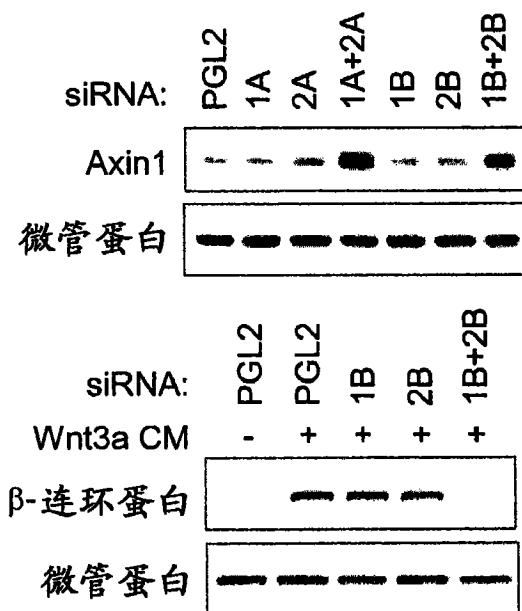


图 3C

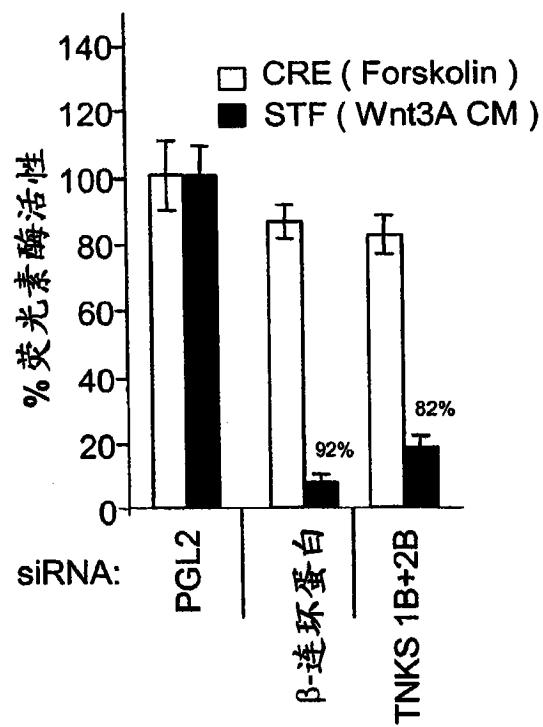


图 3D

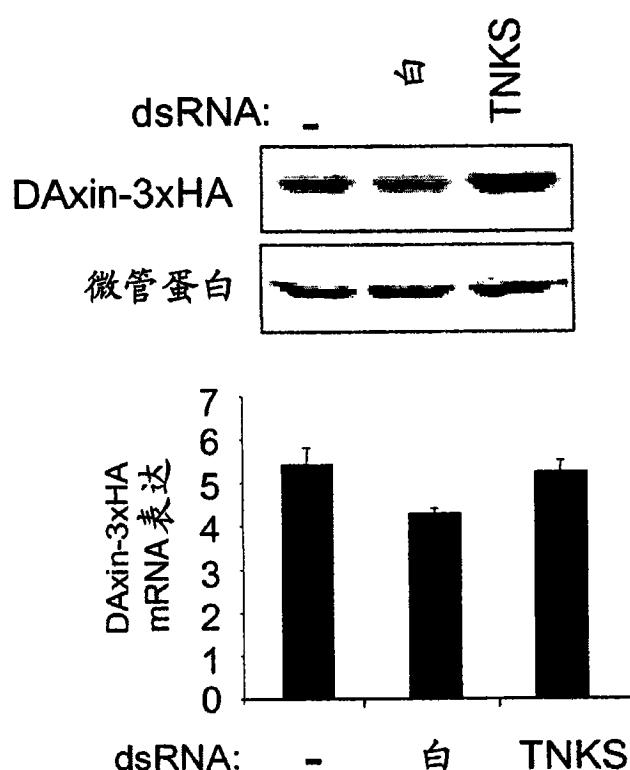


图 3E

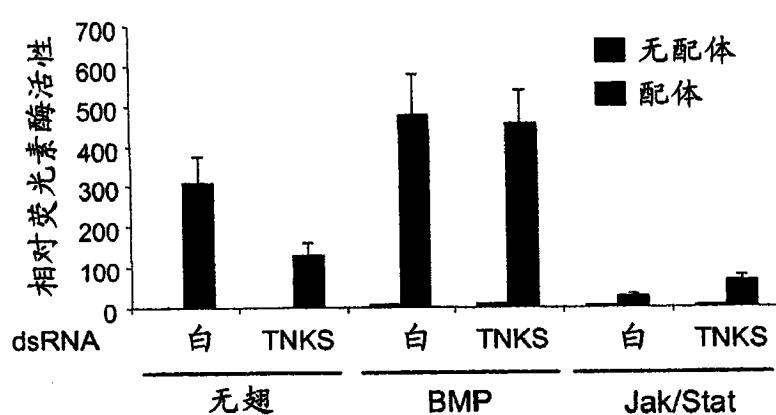


图 3F

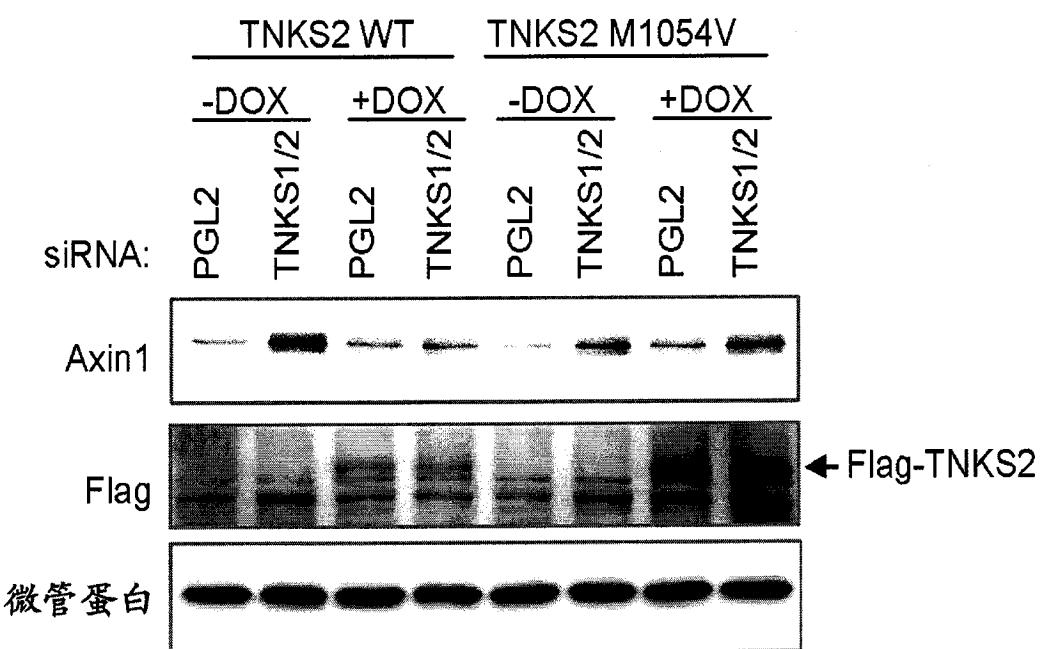


图 3G

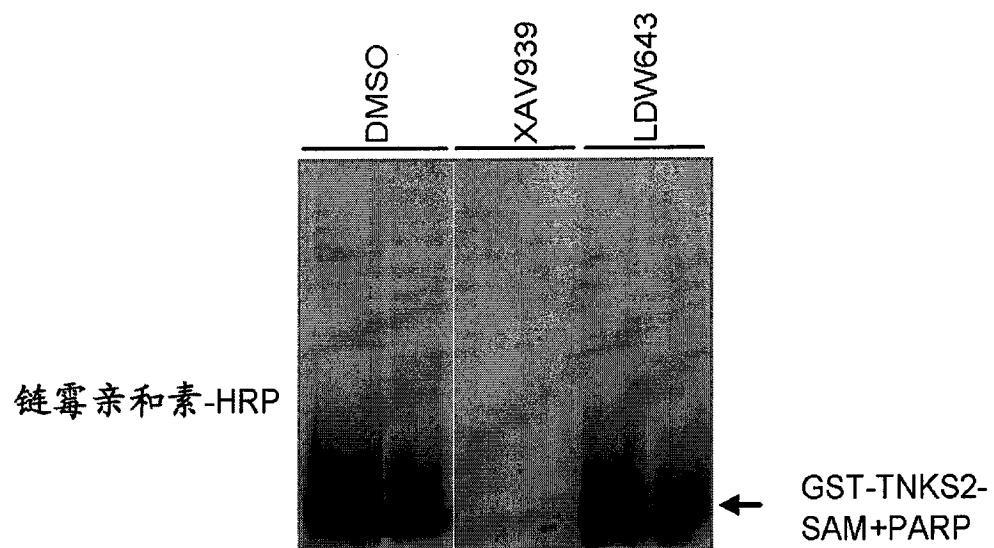


图 3H

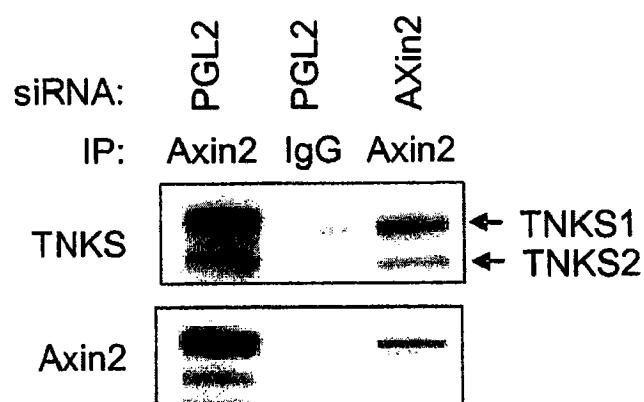


图 4A

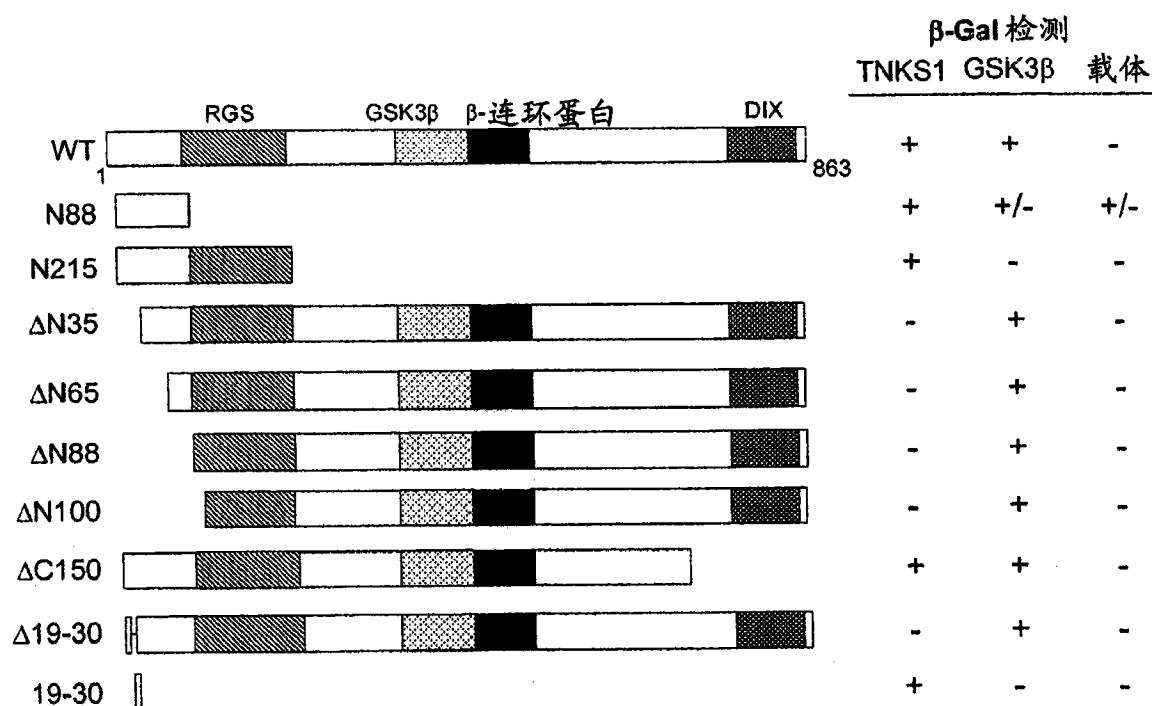


图 4B

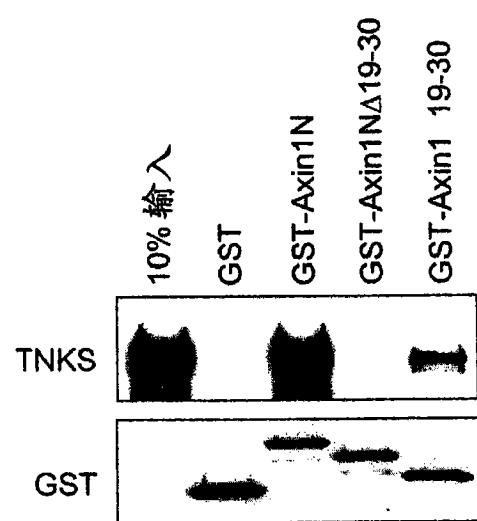


图 4C

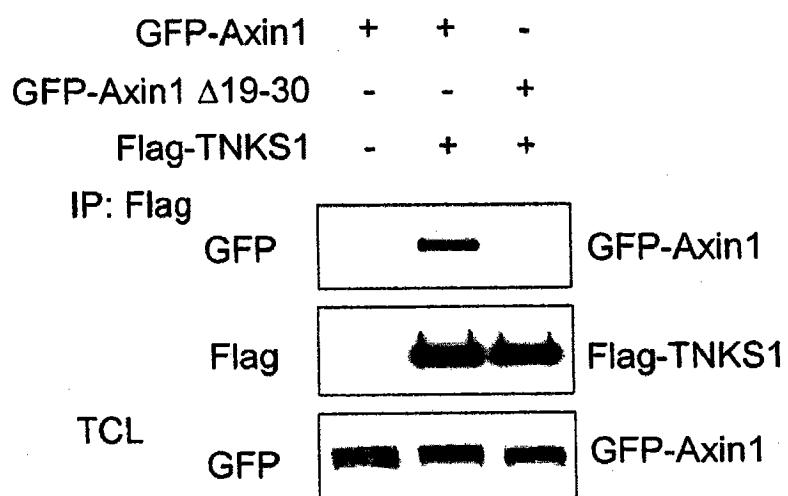


图 4D

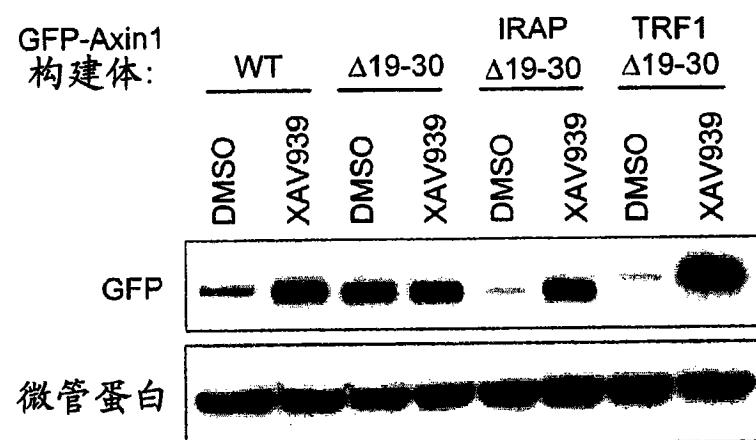


图 4E

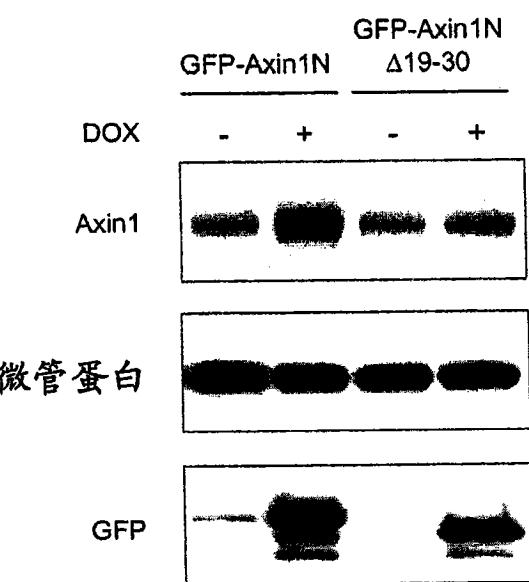


图 4F

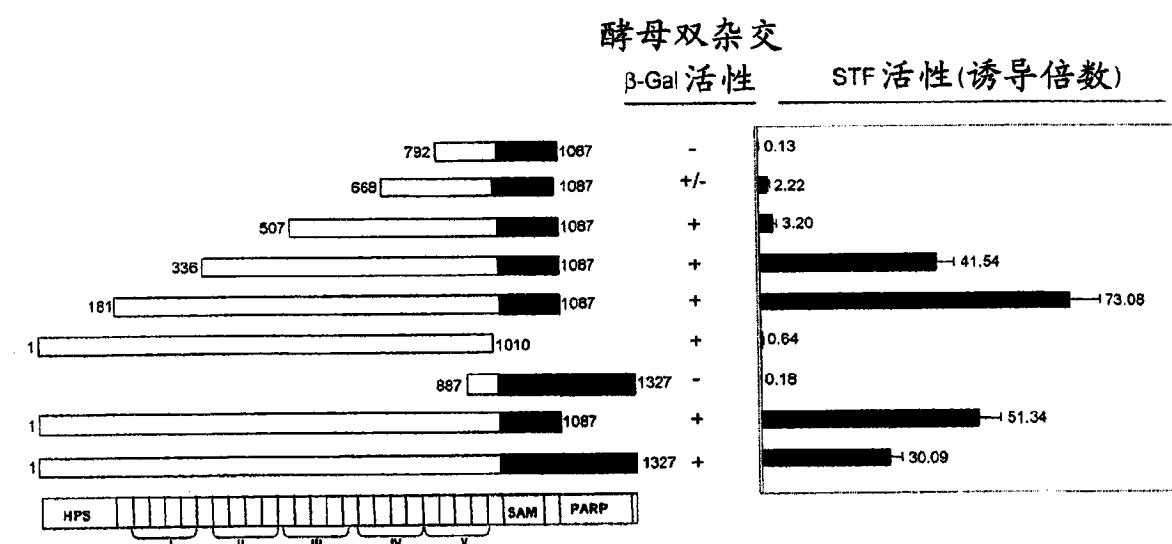
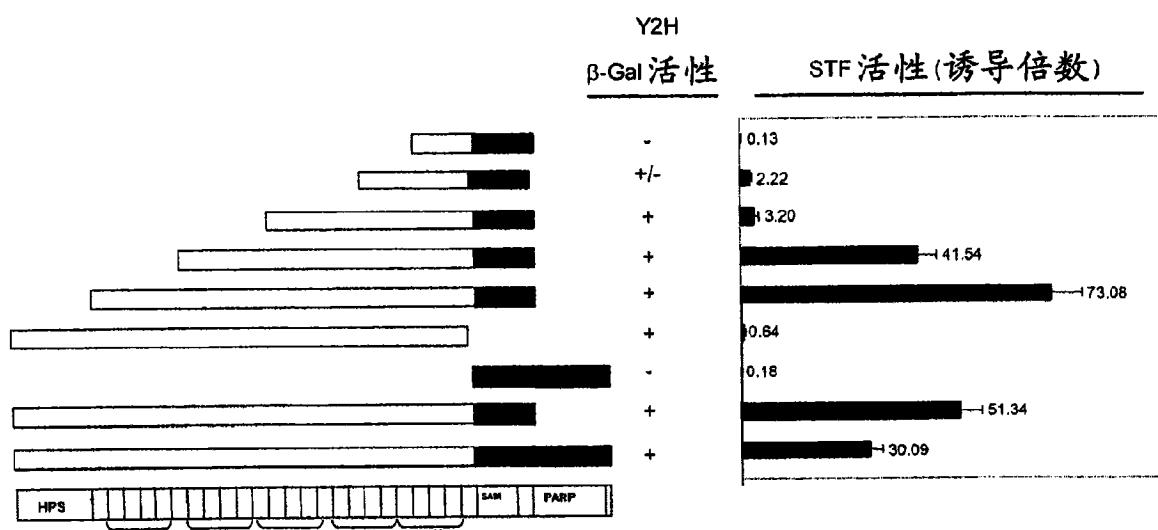


图 4G

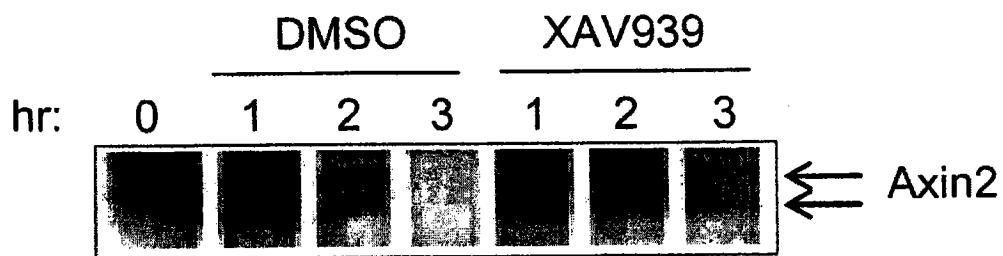


图 5A

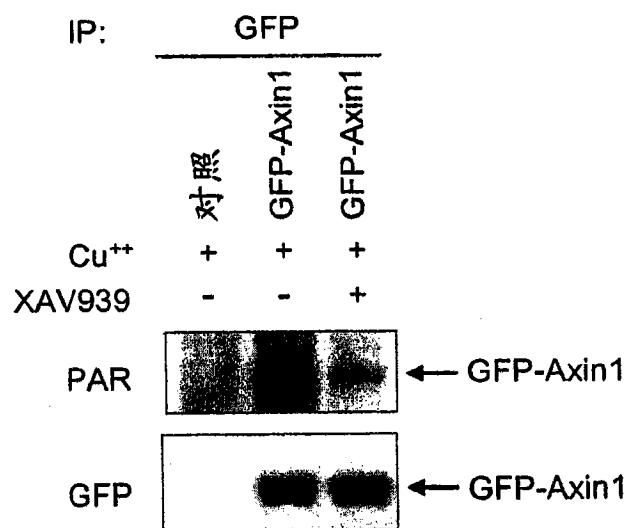


图 5B

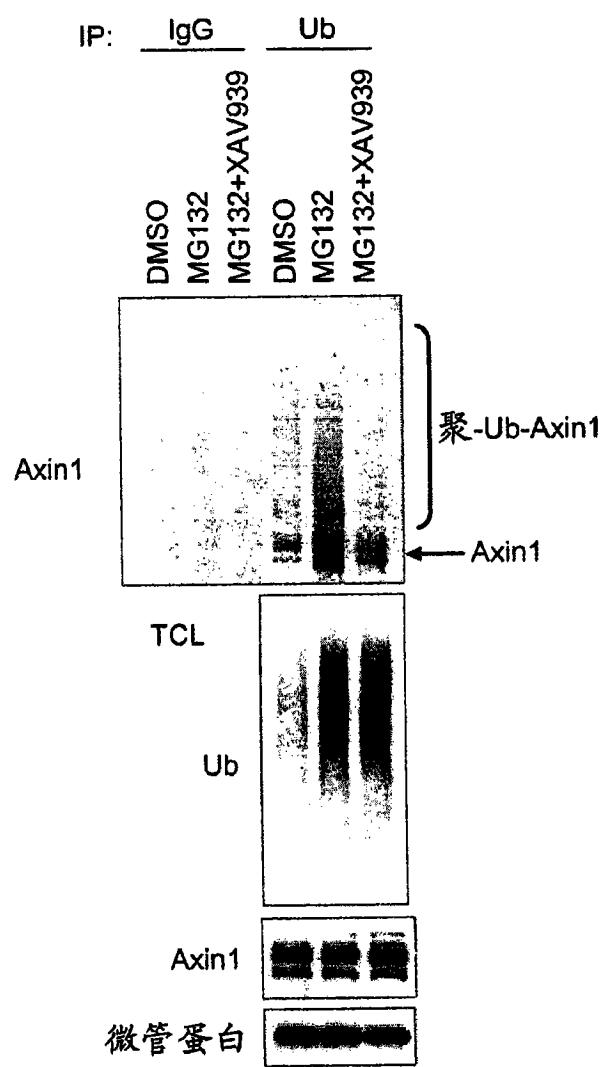


图 5C

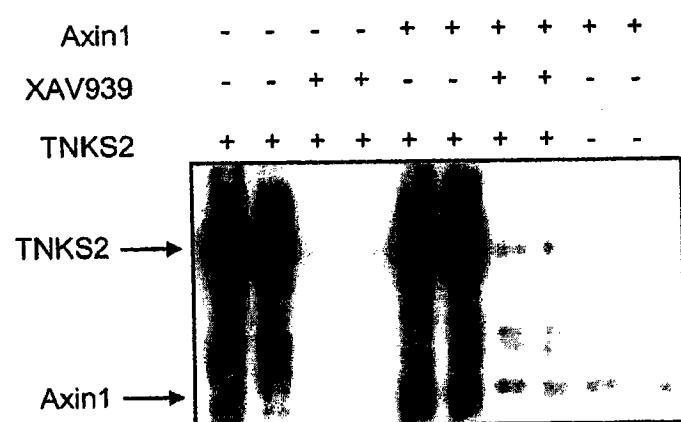


图 5D

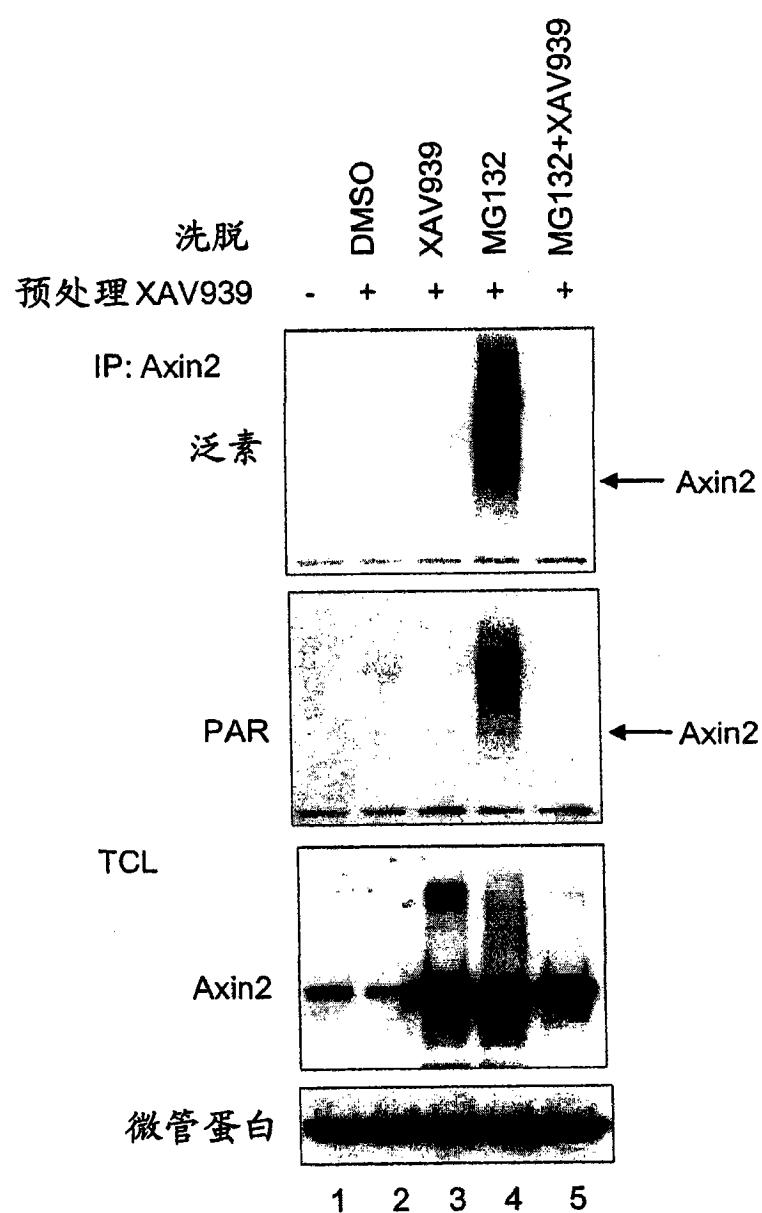


图 5E

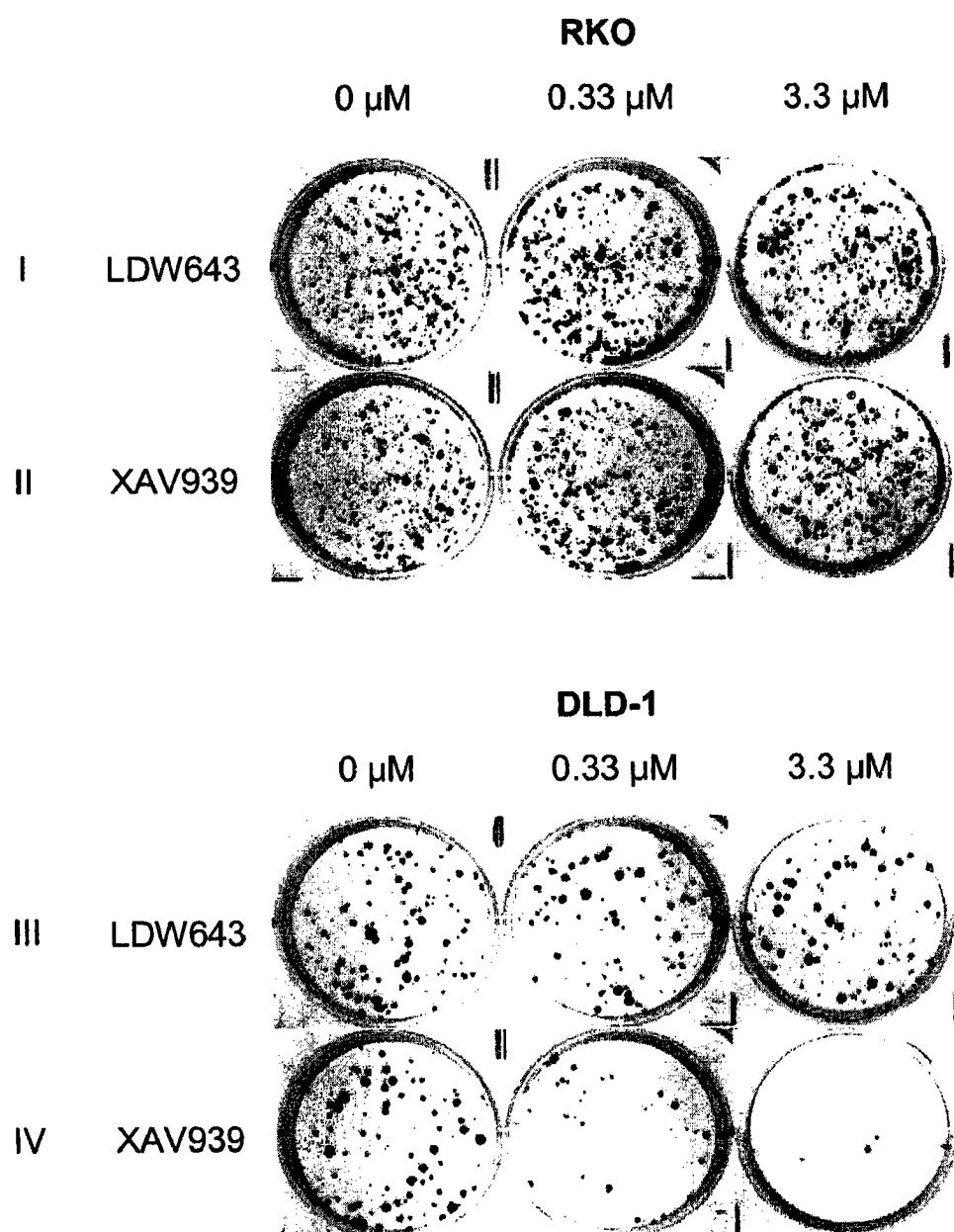


图 6A

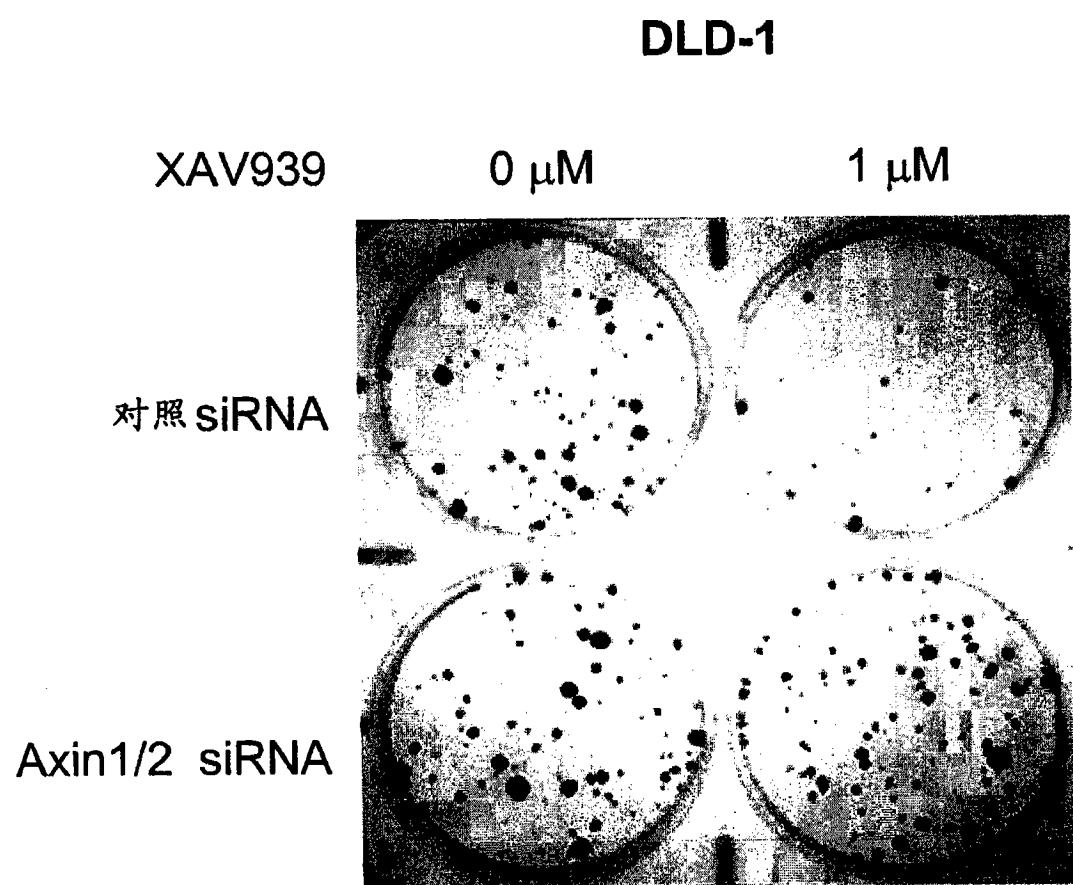


图 6B

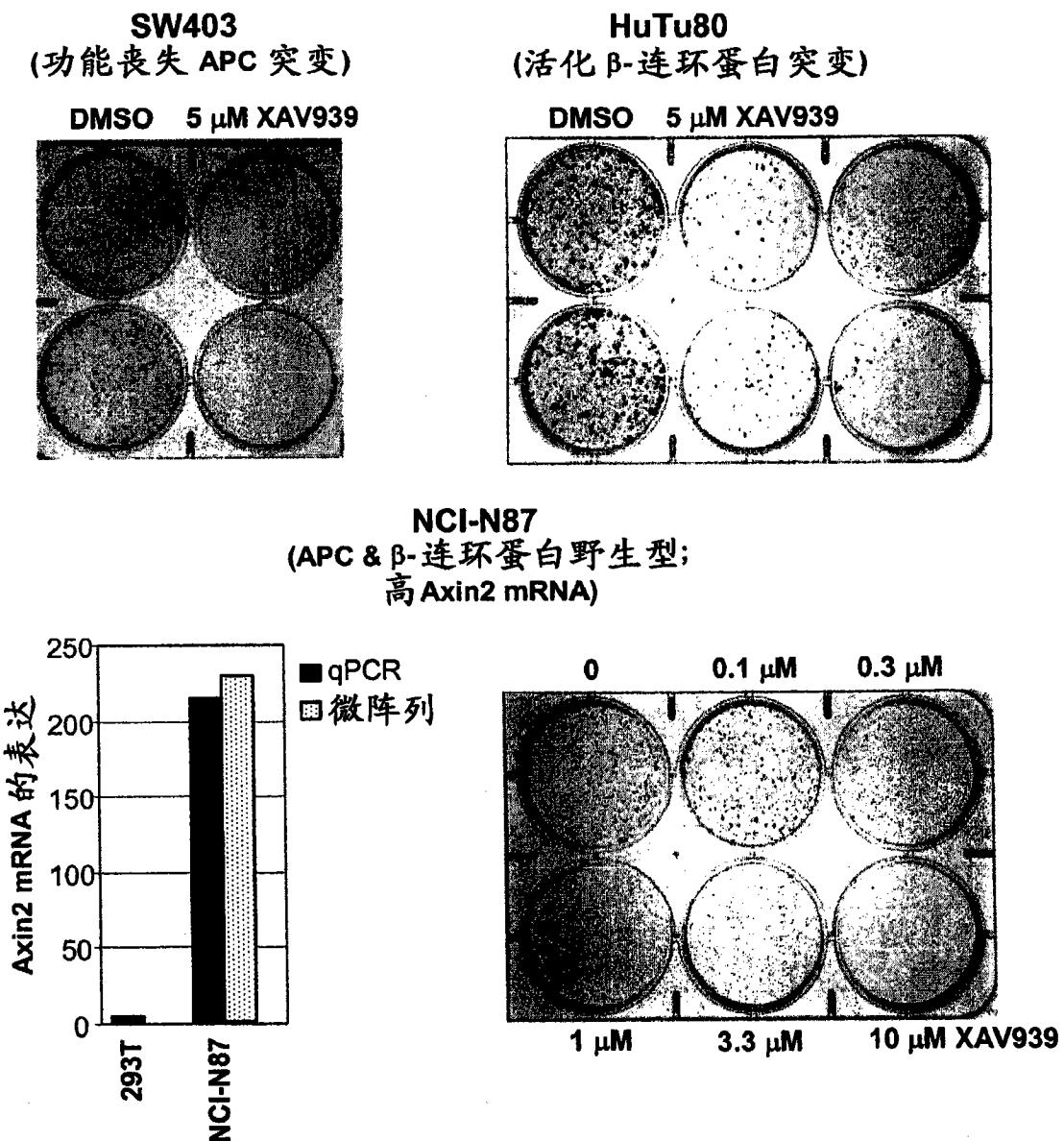


图 7