

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-525953
(P2007-525953A)

(43) 公表日 平成19年9月13日(2007.9.13)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 ZNAA	2G045
C12Q 1/68 (2006.01)	C12Q 1/68 A	4B024
C12M 1/00 (2006.01)	C12N 15/00 F	4B029
C12Q 1/02 (2006.01)	C12M 1/00 A	4B063
A61K 45/00 (2006.01)	C12Q 1/02	4C084

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 156 頁) 最終頁に続く

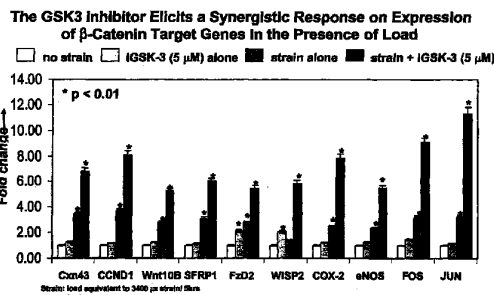
(21) 出願番号 特願2006-515244 (P2006-515244)
 (86) (22) 出願日 平成16年6月7日(2004.6.7)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年2月6日(2006.2.6)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/017951
 (87) 国際公開番号 W02005/028678
 (87) 国際公開日 平成17年3月31日(2005.3.31)
 (31) 優先権主張番号 60/476,164
 (32) 優先日 平成15年6月6日(2003.6.6)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/501,398
 (32) 優先日 平成15年9月10日(2003.9.10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 397012945
 ワイス
 アメリカ合衆国 ニュージャージー州 マ
 ジソン, ファイブ ジラルダ ファームズ
 (番地なし)
 (74) 代理人 100099623
 弁理士 奥山 尚一
 (74) 代理人 100096769
 弁理士 有原 幸一
 (74) 代理人 100107319
 弁理士 松島 鉄男
 (72) 発明者 チャタジー - キショール, モイトレイー
 アメリカ合衆国ニューハンプシャー州03
 062, ナシュア, ダリアン・サークル
 3
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 骨リモデリングを調節する物質を同定するための方法および材料、ならびにそれによって同定された物質

(57) 【要約】

本発明は、骨石灰化を研究し、骨石灰化を調整する物質を同定するための組成物、化合物、装置、およびそれらの使用方法を開示する。化合物のスクリーニングおよび調査を行うための骨石灰化遺伝子プロファイルおよび識別特性の使用法も開示する。治療および調査の両方の用途のための、骨石灰化を調節する試薬も提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

骨負荷が与えられた骨細胞の遺伝子発現プロファイルであって、該骨負荷がWnt経路モジュレーターによって調節されている、遺伝子発現プロファイル。

【請求項 2】

C O X - 2、J u n、F o s、S F R P 1、コネキシン43、およびe N O Sの遺伝子を含む、請求項1に記載の遺伝子発現プロファイル。

【請求項 3】

表1～5、11、または12の2つ以上の遺伝子を含む、請求項1に記載の遺伝子発現プロファイル。

10

【請求項 4】

前記Wnt経路モジュレーターがアゴニストである、請求項1に記載の遺伝子発現プロファイル。

【請求項 5】

前記アゴニストがG S K - 3阻害剤である、請求項4に記載の遺伝子発現プロファイル。

【請求項 6】

前記アゴニストが、W n t 3 A、W n t 3 A変異体、W n t 3 Aミメティック、またはW n t 3 Aアゴニストである、請求項4に記載の遺伝子発現プロファイル。

【請求項 7】

前記G S K - 3阻害剤が選択的G S K - 3阻害剤である、請求項5に記載の遺伝子発現プロファイル。

20

【請求項 8】

前記G S K - 3阻害剤が、塩化リチウムまたは薬学的に許容されるその塩、マレイミド、ムスカリン様アゴニスト、アロイシン(aloisine)、ヒメニジジン(hymeniniidisine)、あるいはイニジルビン(inidirubin)である、請求項5に記載の遺伝子発現プロファイル。

【請求項 9】

前記マレイミドが、3-(2,4-ジクロロフェニル)-4-(1-メチル-1H-インドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、または3-(3-クロロ-4-ヒドロキシフェニルアミノ)-4-(2-ニトロフェニル)-1Hピロール-2,5-ジオンである、請求項8に記載の遺伝子発現プロファイル。

30

【請求項 10】

前記遺伝子発現プロファイルが、培養細胞、または動物組織から得た細胞に由来する、請求項4に記載の遺伝子発現プロファイル。

【請求項 11】

前記骨細胞が、前骨芽細胞、骨幹細胞、骨芽細胞、破骨細胞、骨細胞、または間葉系系幹細胞、あるいはそれらの組み合わせである、請求項1に記載の遺伝子発現プロファイル。

【請求項 12】

Wnt経路調節物質を同定し、それによって骨リモデリングを調節する方法であって、
 (A) 候補物質に曝露した骨細胞の遺伝子発現プロファイルを得るステップと、
 (B) ステップ(A)の前記遺伝子発現プロファイルを、請求項1に記載の遺伝子発現プロファイルと比較し、それによって、Wnt経路が調節されたかどうかを決定するステップとを含む、方法。

40

【請求項 13】

動物に機械的負荷が与えられて、前記骨細胞が前記動物から得られるか、または培養骨細胞に機械的負荷が与えられるかである、請求項12に記載の方法。

【請求項 14】

機械的応力およびWnt経路モジュレーターが与えられたHBM細胞の遺伝子発現プロ

50

ファイル。

【請求項 15】

骨荷重遺伝子発現プロファイルを作成する方法であって、

(A) 骨負荷に曝露していない骨細胞の第1の遺伝子発現プロファイルと、骨負荷に曝露した骨細胞の第2の遺伝子発現プロファイルと、骨負荷およびWnt経路モジュレーターに曝露した骨細胞の第3の遺伝子発現プロファイルとを得るステップと、

(B) 前記第1、第2、および第3の遺伝子発現プロファイルを比較することによって、Wnt経路モジュレーターによって調節される遺伝子の骨荷重遺伝子発現プロファイルを得るステップとを含む、方法。

【請求項 16】

前記骨細胞が、破骨細胞、骨芽細胞、骨細胞、またはこれらの骨細胞の組み合わせである請求項15に記載の方法。

【請求項 17】

前記Wnt経路モジュレーターがWnt経路アゴニストである、請求項16に記載の方法。

【請求項 18】

前記Wnt経路アゴニストが、GSK-3阻害剤、Wnt3A、Wnt3Aミメティック、Wnt3Aアゴニスト、LRP5アゴニスト、LRP6アゴニスト、カテニンアゴニスト、またはDkk1アンタゴニストである、請求項17に記載の方法。

【請求項 19】

請求項15に記載の方法によって得られた、Wnt経路モジュレーターによって制御される遺伝子を含む骨荷重遺伝子発現プロファイル。

【請求項 20】

骨負荷の関連するリモデリングを増強する物質をスクリーニングする方法であって、

(A) 前記物質を加えて培養され骨負荷に曝露された骨細胞の遺伝子発現プロファイルを得るステップと、

(B) ステップ(A)の前記遺伝子発現プロファイルを、請求項19に記載の骨荷重遺伝子発現プロファイルと比較するステップであって、前記Wnt経路モジュレーターが対照Wnt経路モジュレーターであるステップとを含む、方法。

【請求項 21】

前記参照Wnt経路モジュレーターが、GSK-3阻害剤またはWnt3Aである、請求項20に記載の方法。

【請求項 22】

候補物質を使用せずに評価される前記培養骨細胞がHBM骨細胞である請求項20に記載の方法。

【請求項 23】

前記骨細胞が、骨芽細胞、前骨芽細胞、骨幹細胞、間葉系系幹細胞、またはそれらの組み合わせである請求項20に記載の方法。

【請求項 24】

前記骨細胞が骨芽細胞であり、骨芽細胞数および/または増殖に対する前記物質の効果が、 $[^3\text{H}]$ -チミジンの混入、5-プロモ-2'-デオキシウリジン(BrdU)の混入、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム塩(MTS)アッセイ、またはアポトーシスアッセイによって測定される、請求項23に記載の方法。

【請求項 25】

請求項20に記載のステップ(A)および(B)で与えられる前記骨負荷が約50 μ ~約5,000 μ の量の機械的負荷である、請求項20に記載の方法。

【請求項 26】

請求項20に記載の方法によって同定された、低骨量状態を治療するための候補物質。

【請求項 27】

10

20

30

40

50

治療有効量の請求項 2 6 に記載の候補物質を投与するステップを含む、骨石灰化疾患または障害の治療方法。

【請求項 2 8】

前記骨疾患または障害が、骨粗鬆症、骨折、軟骨形成異常、薬物性骨障害、高骨代謝回転、高カルシウム血症、骨化過剰症、変形性関節症、骨髄炎、およびパジェット病である、請求項 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 9】

前記骨折が、股関節骨折、コーレス骨折、または椎骨粉碎骨折である、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

前記薬物性障害が、グルココルチコイド誘発性骨粗鬆症、ヘパリン誘発性骨粗鬆症、水酸化アルミニウム誘発性骨軟化症、抗痙攣薬誘発性骨軟化症、またはグルテチミド誘発性骨軟化症である、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 1】

前記候補物質が、GSK-3 アンタゴニスト、Wnt3A、Wnt3A ミメティック、Wnt3A アゴニスト、Dkk1 アンタゴニスト、LRP5 アゴニスト、カテニンアゴニスト、または LRP6 アゴニストである、請求項 2 5 に記載の候補物質。

【請求項 3 2】

複数のプローブを含む組成物であって、前記プローブが、請求項 1 9 に記載の骨荷重遺伝子発現プロファイルの核酸にアニールする核酸配列を含む、組成物。

【請求項 3 3】

前記複数のプローブが固体基体に取り付けられている、請求項 3 2 に記載の組成物。

【請求項 3 4】

前記固体基体が、ビーズ、プレート、またはスライドである、請求項 3 3 に記載の組成物。

【請求項 3 5】

前記複数のプローブが、コネキシン 4 3、COX-2、eNOS、SFRP1、Jun、および Fos タンパク質をコードする核酸配列にアニールする核酸配列を含む、請求項 3 2 に記載の組成物。

【請求項 3 6】

前記複数のプローブが、表 1 ~ 5、1 1、または 1 2 の遺伝子または遺伝子転写物の核酸配列にアニールする核酸配列を含む、請求項 3 2 に記載の組成物。

【請求項 3 7】

PDGFRA、MET、OSMR、ITGBL1、CTGF、WNT6、TIMP3、GJA1、GAS6、LOX、MYBL1、THBS1、ITGB5、CTSK、COL1A1、FBLN1、CCND1、TIMP2、COL6A3、GADD45A、WISP2、FZD2、SFRP4、IGFBP6、LRP5、LRP6、LSP1、CX3CR1、TRFBR2、VCAM1、IL6、FGF2、FGF7、STAT1、TNFRSF10B、IFG2R、IGF2、SPARC、MAPKAPK2、TNF、TNFRSF11b、TNFSF11、ACP5、FAP、MCC、DELTEX、EPHB2、CNK1、ERBB3、GRO1、MYC、および WNT10B の核酸配列にアニールするプローブをさらに含む、請求項 3 5 に記載の組成物。

【請求項 3 8】

請求項 1 または 1 4 のいずれかの骨負荷発現プロファイルが得られる物質を投与するステップを含む、細胞中の骨石灰化を調節する方法。

【請求項 3 9】

前記物質が、Wnt アゴニスト、Wnt3A、Wnt3A ミメティック、Wnt3A 変異体、Wnt3A アゴニスト、Dkk アンタゴニスト、COX-2 アンタゴニスト、LRP5 アゴニスト、LRP6 アゴニスト、GSK-3 アンタゴニスト、または カテニンアゴニストである、請求項 3 8 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 40】

前記 GSK-3 アンタゴニストが、マレイミド、ムスカリン様アゴニスト、アロイシン、ヒメニジシン、またはイニジルピンである、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記マレイミドが、第 2 の骨リモデリング調節物質と組み合わせて投与される、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

前記第 2 の骨リモデリング調節物質が、副甲状腺ホルモン、エストロゲン、ビタミン D、ビタミン D 類似体、選択的エストロゲン受容体モジュレーター、グルココルチコイド、カルシウム製剤、またはビスホスホネートである、請求項 41 に記載の方法。

10

【請求項 43】

骨石灰化および/または骨リモデリングの調節を必要とする被験体の骨石灰化および/または骨リモデリングを調節する方法であって、請求項 19 に記載の骨負荷発現プロファイルが得られる化合物を投与するステップを含む、方法。

【請求項 44】

基体と、該基体に付着させた複数の免疫グロブリンとを含む組成物であって、前記免疫グロブリンが、表 1 ~ 5、11、または 12 の 2 種類以上のタンパク質を認識してこれらと結合する、組成物。

【請求項 45】

前記複数の免疫グロブリンが、表 1 ~ 5、11、または 12 の前記 2 種類以上のタンパク質を認識してこれらと結合する 2 種類以上の免疫グロブリンを含む、請求項 44 に記載の組成物。

20

【請求項 46】

前記 2 種類以上のタンパク質が、eNOS、コネキシン 43、SFRP1、サイクリン D1、Wnt10B、Jun、Fos、または COX-2 である、請求項 45 に記載の組成物。

【請求項 47】

前記基体が、マイクロチップ、ビーズ、プレート、スライド、またはチューブである、請求項 44 に記載の組成物。

【請求項 48】

骨負荷の調節を研究するための組成物であって、

(A) 基体と、

(B) 前記基体に付着された、複数の細胞溶解物とを含み、前記溶解物が、(i) 機械的応力を与えていない細胞、(ii) 機械的応力に曝露した細胞、(iii) 機械的応力を与えていない HBM 細胞、(iv) 機械的応力に曝露した HBM 細胞、および (v) Wnt 経路モジュレーターに曝露した前記細胞のいずれかに由来するものである、組成物。

30

【請求項 49】

前記基体が、マイクロチップ、ビーズ、プレート、スライド、またはチューブである、請求項 48 に記載の組成物。

【請求項 50】

骨リモデリングおよび/または骨石灰化を調節するタンパク質と結合する試薬をスクリーニングする方法であって、

(A) 候補試薬を請求項 48 に記載の組成物に結合させるのに好適な条件下で、候補試薬を請求項 48 に記載の組成物に曝露するステップと、

(B) 前記候補試薬が請求項 48 に記載の組成物に結合したかどうかを調べ、請求項 48 に記載の組成物のタンパク質が前記候補試薬と結合したかどうかをさらに調べるステップとを含む、方法。

40

【請求項 51】

化合物または組成物が、骨細胞活性/機能、および/または石灰化に対する骨負荷の効果を増強するかどうかを決定する方法であって、

50

- (A) 前記化合物または前記組成物を細胞系に投与するステップと、
 (B) その後、機械的刺激を前記細胞系に与えるステップと、
 (C) 前記細胞系から細胞溶解物を得るステップと、
 (D) 前記細胞溶解物中のタンパク質を請求項 4 4 に記載の組成物と結合させるのに好適な条件下で、前記細胞溶解物を請求項 4 4 に記載の組成物と接触させるステップと、
 (E) ステップ (D) で得られたパターンを、機械的負荷刺激のみを与えた細胞の細胞溶解物から得られた発現パターンと比較することによって、前記化合物または前記組成物が、骨細胞活性 / 機能、および / または石灰化に対する骨負荷の効果を増強するかどうかを決定するステップとを含む、方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

(記載なし)

【背景技術】

【0002】

骨ミネラルの減少を伴う骨障害は、米国における高齢者の医療費および健康障害の大きな原因となっている。骨粗鬆症は、医療費がかさむ原因となる主要な症状である。

【0003】

骨ミネラルの減少は、骨リモデリングのホメオスタシスと正常な血清カルシウム量の維持とのバランスがとれないことによって生じる。血清カルシウムは、腸内カルシウム吸収、腎排泄、および骨格動員の相互作用、あるいはカルシウムの取り込みに依存する。血清カルシウムは、全体カルシウムの 1% 未満であるが、この血清中濃度は正常な細胞機能を維持するために非常に重要である。

20

【0004】

血清カルシウムは、3種類の主要ホルモンを調整し、これらによって調整される。副甲状腺ホルモン (PTH) および 1, 25 - ジヒドロキシビタミン D は、カルシウムおよび骨ホメオスタシスの主要調節因子である。PTH は腎臓に作用して、カルシウム再吸収、ホスフェートの排泄、および 1, 25 - ジヒドロキシビタミン D の生成を増加させる。PTH は骨吸収を増加させる。1, 25 - ジヒドロキシビタミン D は、骨吸収の強力な刺激物質であり、腸内カルシウム (およびホスフェート) 吸収のさらに強力な刺激物質である。1, 25 - ジヒドロキシビタミン D は、骨石灰化のためにも必要である。血清カルシウムの調整にかかわる第 3 のホルモンはカリシトニン (calicitonin) である。カリシトニンは、PTH および 1, 25 - ジヒドロキシビタミン D よりも弱い程度でカルシウムホメオスタシスを調節する。

30

【0005】

血清カルシウムおよび 2 つの主要な恒常性ホルモンの量を制御するために、多数のフィードバックループが機能する。副甲状腺細胞中および腎細胞中で同定され、細胞外カルシウムを感知する他の組織中에서도見いだされているカルシウム感受性受容体、カルシウムホメオスタシスにおいて重要な役割を果たす。低血清カルシウム量は、PTH 放出 (および合成) の刺激を介して、直接 1, 25 - ジヒドロキシビタミン D 合成を刺激する。血清カルシウムレベルの上昇を防止するため、第 2 のフィードバックループの組が、PTH および 1, 25 - ジヒドロキシビタミン D の量を減少させるように作用する。これらのフィードバックループは、個々で消費されるカルシウム量とは無関係に、狭い生理学的範囲内に血清カルシウムを維持する。

40

【0006】

カルシウムホメオスタシスおよびカルシウムのホルモンによる制御以外に、骨石灰化も細胞性骨リモデリングの影響を大きく受ける。骨は、細胞外マトリックス (大部分が石灰化されている)、コラーゲン、および細胞からなる。コラーゲン繊維は I 型であり、骨中の全タンパク質の 90% を構成する。これらのコラーゲン繊維の内部には、ハイドロキシアパタイト $[3Ca_3(PO_4)_2] \cdot (OH)_2$ の紡錘型または板状の結晶が存在する。こ

50

これらの紡錘型または板状の結晶は、血清カルシウムおよびホスフェートから誘導されるリン酸カルシウム含有化合物である。ハイドロキシアパタイトは「基質」上にも見いだされている。この基質は、主として糖タンパク質およびプロテオグリカンで構成される。これらの高い陰イオン性の錯体は、高いイオン結合能力を有し、したがって石灰化において重要な役割を果たしていると考えられている。

【0007】

コラーゲン以外に、骨リモデリングおよび石灰化において重要な役割を果たす数種類の細胞が存在する。骨の中の重要な細胞は破骨細胞および骨芽細胞（これは休止期骨芽細胞および骨細胞も含んでいる）である。破骨細胞は骨の吸収を担う細胞であり、造血幹細胞に由来する。骨芽細胞は局所的な間葉系細胞に由来し、骨形成に直接関与する。骨芽細胞は、パラクリン因子を介して破骨細胞の骨吸収を調節することで間接的に関与している。

10

【0008】

骨は絶えず再生され続けており、これが骨リモデリングと呼ばれる。正常成人では、新しい骨は骨芽細胞によって形成される。新しい骨の増殖は、破骨細胞の骨吸収と一致する。骨の代謝回転の大部分は骨表面、特に骨内膜の表面で起こる。リモデリング速度は、個々の骨に対する物理的負荷、滑膜性の連結の近傍、または骨髄中の脂肪組織ではなく造血組織の存在に起因して位置が異なると異なり、さらに骨の種類によっても異なる。海綿骨のリモデリングは皮質骨の3～10倍速い。

【0009】

リモデリングは、骨の代謝回転の基本多細胞単位または骨リモデリング単位（BMU）と呼ばれる規則的な順序に従う。このサイクルにおいて、骨吸収は、破骨細胞の動員によって開始し、これらは、休止期骨芽細胞に由来するプロテナーゼによって露出した基質に対して作用する。吸収小窩（すなわち、ハウシッポ窩）が破骨細胞によって形成される。この小窩は、破骨細胞からリソソーム酵素がポケット内部に放出され基質が吸収されることによって得られる。この吸収段階の後に骨形成段階が続き、この段階で骨芽細胞によって小窩に類骨が充填される。次に類骨ハイドロキシアパタイトで石灰化されて新しい骨基質が形成される。このリモデリングサイクルのアンカップリングによって、有害な正味の骨の変化が生じることがあり、これが骨粗鬆症および他の骨石灰化障害において観察される。

20

【0010】

骨ミネラルの減少は、骨折が生じるにもかかわらず、それ自体に臨床効果はない。骨粗鬆症または骨石灰化低下障害による骨折の好発部位としては、軽度外傷後の脊椎、手首、股関節、または骨盤の骨折が挙げられる。骨折は、前方高さの減少（すなわち楔状骨折）、中部脊椎の高さの減少（すなわち、タラ形椎）、または前方、中央、および後方の高さの減少（すなわち、圧迫骨折または粉碎骨折）において顕在化することもある。骨量減少を伴う他の疾患としては骨軟化症およびくる病が挙げられる。

30

【0011】

骨の形成が増加しても、骨折が生じる場合がある。パジェット病は、骨の局所的部分で破骨細胞が活発になりすぎるために骨の代謝回転が増加する疾患である。リモデリングが増加することで、四肢の変形、骨痛、および骨折の危険性の増加が起こり得る。

40

【0012】

現在、骨量減少を防止または抑制する方法としては、運動、女性の場合800～1200mg/日の毎日の食事性カルシウムの摂取、およびカルシウム代謝に悪影響を与える（例えば、骨芽細胞の骨形成を阻害する）コルチコステロイド類の回避が挙げられる。カルシウム吸収不良が見られる場合には、ビタミンDの補給が推奨され得る。女性の場合、エストロゲン補充療法も、IL-1およびRANKなどのサイトカインの産生を減少させることによって破骨細胞形成を減少させるので、一般的な治療法である。最後に、ビスホスホネートは、骨量減少を治療するための有効な手段である。これらの化合物は、破骨細胞の機能を阻害することによって作用する。しかし、骨石灰化を向上させる治療は存在せず、既存の治療法は、罹患した集団の骨量減少の阻害においてはあまり有効ではない。大部

50

分の治療法は、骨量減少の進行を遅延させるのみであり、罹患した個人は治療にもかかわらず骨の質量密度が低下し続ける。

【0013】

血清カルシウムホメオスタシスおよび骨リモデリングホメオスタシスが複雑であること、これらを制御するフィードバック機構、および骨障害を治療するために使用することができる現行の治療方法を考慮すると、骨リモデリング障害を治療するためのさらに別の方法が必要である。骨リモデリングおよび石灰化を調節する物質をスクリーニングする方法も必要である。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0014】

本発明は、骨リモデリングおよび/または石灰化を調節する新規な試薬の提供に関する。本発明はさらに、骨リモデリングを調節する新しく解明された経路であるWnt経路に基づいて骨リモデリングおよび/または石灰化を調節する化合物および組成物をスクリーニングすることができる新規リサーチツールを提供する。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明の一態様は、骨負荷がWnt経路モジュレーターによって調節されている、骨負荷を受けた骨細胞の遺伝子発現プロファイルに関する。この遺伝子発現プロファイルは、表1～5または12のいずれかの任意の2つ以上の遺伝子、あるいは、図16の経路モデル中に含まれるそれらに由来する遺伝子およびタンパク質を含む。好ましくは、このWnt経路モジュレーターがWnt経路のアゴニストである。より好ましくは、このアゴニストは、GSK-3阻害剤、あるいはWnt3A、Wnt3Aミメティック、またはWnt3Aアゴニストである。他の好ましいモジュレーターについては本明細書で議論する。好ましいGSK-3阻害剤としては、塩化リチウムまたは他のリチウム塩、マレイミド、ムスカリン様アゴニスト、アロイシン(aloisine)、ヒメニジシン(hymenidinidine)、またはイニジルピン(inidirubin)が挙げられる。好ましいマレイミドは、3-(2,4-ジクロロフェニル)-4-(1-メチル-1H-インドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン、または3-(3-クロロ-4-ヒドロキシフェニルアミノ)-4-(2-ニトロフェニル)-1Hピロール-2,5-ジオンである。

20

30

【0016】

本発明の別の態様においては、本発明の遺伝子プロファイルは培養細胞、好ましくは骨細胞に由来する。好ましい骨細胞は、骨芽細胞、破骨細胞、骨細胞、前骨芽細胞、骨幹細胞、または間葉系系幹細胞、あるいはこれらの細胞のあらゆる組み合わせである。

【0017】

本発明の別の目的は、Wnt経路調節物質を同定し、それによって骨リモデリングを調節する方法であって、

(A) 候補物質に曝露した骨細胞の遺伝子発現プロファイルを作成するステップと、

(B) ステップ(A)の遺伝子発現プロファイルを好ましい遺伝子発現プロファイルと比較し、それによって、Wnt経路が調節されたかどうかを決定するステップとを含む方法を提供することである。

40

【0018】

本発明のさらに別の態様においては、本発明の遺伝子発現プロファイルは、培養細胞、または動物から得られる細胞(インビボ)に由来するものであってよい。これらの細胞は、好ましくは骨細胞または幹細胞であり、例えば骨芽細胞、破骨細胞、骨細胞、または間葉系細胞である。得られるプロファイルとしては、機械的負荷をかけた細胞または負荷をかけていない細胞から得られるデータが挙げられる。さらに別のプロファイルを、高い骨量の表現型が得られるLRP5変異を発現する細胞(HBM細胞)から得ることができる。

50

【0019】

本発明のさらに別の目的は、骨荷重遺伝子発現プロファイルを作成する方法であって、
 (A) 機械的応力にさらされていない骨細胞集団の遺伝子発現プロファイル、および機械的応力にさらされた骨細胞集団の遺伝子発現プロファイルを得るステップと、

(B) 機械的応力にさらされていない遺伝子発現プロファイルを、機械的応力にさらされた遺伝子発現プロファイルと比較することによって、骨荷重遺伝子発現プロファイルを得るステップとを含む方法を提供することである。この方法は、

(C) Wnt 経路モジュレーターおよび機械的応力が与えられた骨細胞集団の遺伝子発現プロファイルを得るステップと、

(D) ステップ(C)の遺伝子発現プロファイルを、ステップ(A)および(B)の遺伝子発現プロファイルと比較することによって、増強された骨荷重遺伝子発現プロファイルを得るステップとをさらに含むことができる。この方法は好ましくは、破骨細胞、骨芽細胞、または他の骨細胞を使用する。 10

【0020】

本発明の別の態様においては、上記方法のモジュレーターがWnt 経路アゴニストまたはアンタゴニストである。好ましいアゴニストとしては、Dkk アンタゴニスト(好ましくはDkk1 アンタゴニスト)、Wnt 3A アゴニストまたはミメティック(およびWnt 3A) GSK-3 アンタゴニスト、LRP5 アゴニスト、LRP6 アゴニスト、カテナンアゴニストが挙げられる。

【0021】

本発明の別の目的は、機械的負荷によって骨リモデリングを強化する物質をスクリーニングする方法であって、

候補物質の非存在下と候補物質の存在下とで得られた遺伝子発現プロファイルからのデータセットを比較することによって、培養骨細胞の負荷応答に対する候補物質の効果を測定するステップを含む方法を提供することである。好ましくはこのようなスクリーニングツールおよび方法は、基準化合物(コントロール)を含む。ポジティブコントロールとしては、例えばGSK-3 阻害剤、および副甲状腺ホルモンおよびが挙げられる。他の基準サンプルは、本開示より明らかとなるであろう。 20

【0022】

上記方法によって同定された物質は、骨粗鬆症、骨折、軟骨形成異常、薬物性骨障害、高骨代謝回転、高カルシウム血症、骨過形成、変形性関節症、骨髄炎、およびパジェット病などの症状および疾患の治療に使用することができる。好ましい骨折としては、限定するものではないが、股関節骨折、コーレス骨折、椎骨粉碎骨折が挙げられる。好ましい薬物性障害としては、限定するものではないが、グルココルチコイド誘発性骨粗鬆症、ヘパリン誘発性骨粗鬆症、水酸化アルミニウム誘発性骨軟化症、抗痙攣薬誘発性骨軟化症、またはグルテチミド誘発性骨軟化症が挙げられる。 30

【0023】

さらに別の態様においては、本発明は、骨荷重遺伝子発現プロファイルの遺伝子に対応する複数のプローブを含む組成物に関する。これらの複数のプローブは、好ましくは、コネキシン43、COX-2、eNOS、SFRP1、Jun、およびFos、あるいは表 1~5、11または12に記載されるあらゆる遺伝子の核酸配列に結合するプローブを含む。 40

【0024】

本発明の別の態様は、上記骨負荷または機械的負荷発現プロファイルの1つが得られる試薬を使用して細胞中の骨石灰化を調節することを意図している。好ましい試薬は、限定するものではないが、例えばマレイミド、ムスカリン様アゴニスト、アロイシン、ヒメニジシン、またはイニジルピンなどのGSK-3 アンタゴニストである。Wnt 3A、そのミメティック、またはそれらの機能的変異体、およびWnt 3A アゴニストも好ましい。

【0025】

別の態様において、これらの試薬は、既に承認されている治療法と併用することができる。例えば、Wnt経路のアゴニストは、既存の骨石灰化調節物質と併用することができる。例えば、限定するものではないが、副甲状腺ホルモン、エストロゲン、ビタミンD、ビタミンD類似体、選択的エストロゲン受容体モジュレーター、グルココルチコイド、カルシウム製剤、またはビスホスホネートなどと併用することができる。

【0026】

本発明の別の目的においては、表1~5、11、または12の遺伝子によってコードされる2種類以上のタンパク質と結合して認識する複数の試薬（例えば、免疫グロブリンまたは他のタンパク質結合リガンド）を含む組成物を提供する。これらの試薬によって認識され結合する好ましいタンパク質は、2種類以上のタンパク質であり、eNOS、コネキシン43、SFRP1、サイクリンD1、Wnt10B、Jun、Fos、およびCOX-2である。

【0027】

本発明の別の態様は、骨負荷調節を研究するための組成物であって、(A)基質と、(B)(i)機械的応力を受けていない細胞、(ii)機械的応力を受けた細胞、(iii)機械的応力を受けていないHBM細胞、(iv)機械的応力を受けたHBM細胞、(v)Wnt経路モジュレーターを有する上記細胞のいずれか、からの2種類以上の溶解物である複数の骨細胞溶解物とを含む組成物を提供する。

【0028】

次に、これらの組成物は、上記タンパク質と結合する試薬のスクリーニングに使用することができる。

【0029】

本発明の別の目的は、ある化合物または組成物が、骨細胞活性/機能および/または石灰化に対する骨負荷の影響を強化するかどうかを調べる方法であって、

(A)前記化合物または前記組成物を細胞系に与えるステップと、

(B)その後、機械的刺激を前記細胞系に与えるステップと、

(C)前記細胞系から細胞溶解物を取得するステップと、

(D)好適な条件下で前記細胞溶解物を固体基体（例えば、プレート、スライド、ビーズなど）と接触させて、前記細胞溶解物中のタンパク質を前記固体基体と結合させるステップと、

(E)ステップ(D)から得られたパターンを、機械的負荷刺激のみを与えた細胞の細胞溶解物から得た発現パターンと比較することによって前記化合物または前記組成物が、骨細胞活性/機能および/または石灰化に対する骨負荷の影響を強化するかどうかを決定するステップとを含む方法を意図している。

【発明を実施するための最良の形態】

【0030】

本明細書において開示される方法、組成物、およびアッセイは、骨石灰化障害および疾患の治療のための化合物および組成物の同定および分析、ならびにそれらの使用に関する。このような障害および疾患としては、限定するものではないが、骨発育障害、骨折（例えば、脊椎、股関節、手首、または骨盤の骨折、楔状骨折、圧迫骨折、および粉碎骨折）、年齢と関連する骨量減少、軟骨ジストロフィー（例えば、軟骨形成不全症、致死性骨異形成、FGFR-2の変異を伴うジャクソンワイズ症候群、およびFGFR-1の変異を伴うプファイファー症候群）、薬物性骨障害（例えば、グルココルチコイド誘発性骨量減少）、高骨代謝回転、高カルシウム血症、骨過形成、骨髄炎、骨粗鬆症、大理石骨病、中部脊椎、前方、中部、または後方の高さの減少、パジェット病、あるいは本明細書において議論されるあらゆる他の障害および疾患が挙げられる。

【0031】

(1. 定義および略語)

(1.1 定義)

「被験体」とは、あらゆる動物を意味する。好ましい動物としては、鳥類、魚類、哺乳

10

20

30

40

50

類、および齧歯類が挙げられる。動物の他の分類としては、家畜動物または農業用動物（例えば、ニワトリ、シチメンチョウ、カモ、およびウズラなどの家禽、ならびにブタ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、バッファローなど）が挙げられる。好ましい哺乳類としては、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウシ、および霊長類であり、好ましい霊長類はヒトである。

【0032】

「物質」または「試薬」は、好ましくはWnt経路またはそのメンバーを調節する化合物または組成物を含むことを意味している。

【0033】

「基準化合物」は、コントロールとして機能することができ、Wnt経路、より好ましくはWnt経路および骨リモデリングの両方を調節する化合物を含むことを意味している。基準化合物としては、限定するものではないが、副甲状腺ホルモン（PTH）およびGSK阻害剤が挙げられる。

10

【0034】

「調節する」または「制御する」とは、タンパク質、タンパク質をコードする核酸、経路（例えばWnt経路）、経路内のタンパク質などの活性のアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションによって変化させる能力を意味する。

【0035】

「骨細胞の調節」は、骨密度および/または骨石灰化の調節を含むことを意味している。骨細胞の調節は、骨石灰化、アルカリホスファターゼの誘導、または骨芽細胞の誘導における変化を評価することによってインビトロで決定することができる。インビボでの骨調節は、インビトロで研究されているものと同じあらゆる方法によって、ならびに、骨のスキャンによる骨の質量密度の変化、あるいはカテニン、または本明細書において議論される骨調節に関する他のマーカーに関して組織サンプルを染色することによるWnt経路活性の変化を調べることによって、評価することができる。

20

【0036】

用語「力」、「負荷」、「応力」、および「ひずみ」は、本明細書において交換可能に使用され、身体の位置を維持または変化させる、またはそれをひずませる傾向にある力学的なあらゆる作用である力の原理と関係するものであり、この用語は本明細書において負荷と交換可能に使用される。単位面積当たりの大きさとしての力は、「応力」として定義され、これは本明細書においては「機械的応力」とも記載され、どのように力（負荷）が加わるかによって圧縮、引張、または剪断として分類することができる。具体的には、負荷が加わって材料が短くなる場合には圧縮応力が発生し、一方、材料が延伸される場合には引張応力が発生する。剪断応力は、材料の一領域が隣接する領域に対して摺動する場合に発生する。応力の結果は、変形として定義され、相対的な変形または長さの変化の%値を「ひずみ」と呼ぶ。例えば材料が、その元の長さの101%まで延伸される場合、これは0.01または1%のひずみを有する。ひずみは単位を有さないもので、これは、0.01のひずみが1%変形に等しい場合の相対変形として、またはマイクロストレインで記載される場合には10,000マイクロストレインが0.01ひずみまたは1%変形と等しい場合として報告される（Turner et al., Bone, 14: 595-608 (1993)）。

30

40

【0037】

「Wnt経路」は、Wntタンパク質活性の下流または上流のあらゆるタンパク質を含むことを意味する（図16参照）。例えば、これは、LRP5、LRP6、Dkk、GSK-3、Wnt10B、Wnt6、Wnt3（例えば、Wnt3A）、Wnt1、または本明細書において議論されるあらゆる他のタンパク質、ならびにこれらのタンパク質をコードする遺伝子を含むことができる。Wnt経路の記述は、骨リモデリングに含まれるWntの下流の全ての経路、例えば、LRP5またはHBM経路、Dkk経路、カテニン経路、MAPKAPK2経路、OPG/RANK経路などを含むことも意味する。

【0038】

「GSK阻害剤」とは、GSK活性を阻害するあらゆる物質を意味する。このようなも

50

のとしては、非選択的 G S K 阻害剤、例えば L i C l または他のリチウム塩、ならびに選択的 G S K 阻害剤を挙げることができる。好ましい G S K 阻害剤は G S K - 3 阻害剤である。より好ましい G S K 阻害剤は G S K - 3 アイソフォーム特異的阻害剤、例えば G S K - 3 または G S K - 3 の阻害剤である。さらに別の阻害剤としては、限定するものではないが、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、あるいはそれらの免疫原性活性フラグメント、ペプチドアプタマー、G S K 結合タンパク質、G S K 核酸に対するアンチセンス分子、R N A 干渉分子、モルホリノオリゴヌクレオチド、ペプチド核酸 (P N A)、リボザイム、およびペプチドが挙げられる。

【 0 0 3 9 】

「 D k k 1 アントゴニスト」は、限定するものではないが、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体、あるいはそれらの免疫原性活性フラグメント、ペプチドアプタマー、G S K 結合タンパク質、G S K 核酸に対するアンチセンス分子、R N A 干渉分子、モルホリノオリゴヌクレオチド、ペプチド核酸 (P N A)、リボザイム、および W n t 経路において D k k 1 活性を阻害するペプチドを含むことを意味している。

10

【 0 0 4 0 】

「 W n t 3 A アゴニスト」は、W n t 3 A の合成および/または活性をアップレギュレートする試薬を含むことを意味している。「 W n t 3 A ミメティック」とは、好ましくは実施例 9 に見られるような方式で W n t 3 A と活性が類似している分子を意味する。「 W n t 3 A 変異体」は、負荷が与えられた場合に W n t / カテニン応答とともに活性化を増大させることができるあらゆる機能性変異体を含む。

20

【 0 0 4 1 】

「骨障害」および「骨疾患」は、被験体の骨石灰化ホメオスタシスが悪い方向に乱れる障害を含むことを意味している。悪い方向の混乱は、骨石灰化の増加および骨石灰化の減少の形態であってよい。骨障害としては、本明細書において議論されるあらゆる障害が挙げられる。好ましい骨障害としては、骨量の減少、または骨石灰化ホメオスタシスの低下が挙げられる。例えば、好ましい骨の障害および疾患としては、限定するものではないが、骨粗鬆症、骨折、軟骨形成異常、薬物性骨障害、高骨代謝回転、高カルシウム血症、骨過形成、変形性関節症、骨髄炎、およびパジェット病が挙げられる。好ましい骨折としては、限定するものではないが、股関節骨折、コーレス骨折、または椎骨粉碎骨折が挙げられる。好ましい薬物性障害としては、限定するものではないが、グルココルチコイド誘発性骨粗鬆症、ヘパリン誘発性骨粗鬆症、水酸化アルミニウム誘発性骨軟化症、抗痙攣薬誘発性骨軟化症、またはグルテチミド誘発性骨軟化症が挙げられる。

30

【 0 0 4 2 】

「骨細胞」は、組織培養から得られた細胞 (「培養細胞」) または骨組織から得られた細胞を含むことを意味している。このような細胞としては、限定するものではないが、骨芽細胞、前骨芽細胞、骨幹細胞、破骨細胞、骨細胞、間葉系系幹細胞、またはそれらのあらゆる組み合わせが挙げられる。骨組織は、これらの細胞の組み合わせを含むことを意味し、骨生検から得ることができる。

【 0 0 4 3 】

「骨リモデリング」とは、骨の成長および代謝回転の過程を意味する。「骨リモデリング物質」とは、骨リモデリングを調節する化合物または組成物を意味する。好ましくはこの物質は、骨リモデリングを増強させ、それによって骨石灰化を向上させ骨吸収を抑制する。したがって、このような物質は、「骨石灰化モジュレーター」を含むこともできる。骨リモデリングはインビボおよびインビトロの両方で研究することができる。

40

【 0 0 4 4 】

「骨石灰化」とは、骨中でハイドロキシアパタイトが形成される過程を意味する。骨石灰化を調節する試薬が本明細書において考慮され、この場合、骨中で形成されるハイドロキシアパタイトの量が調節される。例えば、骨石灰化アゴニストは、ハイドロキシアパタイト形成量をそれを必要とする被験体中で増加させるアゴニストである。骨リモデリングは、インビボおよびインビトロの両方で研究することができる。

50

【 0 0 4 5 】

「LRP5経路」および「HBM経路」は、LRP5またはHBMミュータント、および骨リモデリングに関連するシグナリングに關与するLRP5またはHBMミュータントの下流のタンパク質を含むあらゆるタンパク質/遺伝子を意味する。好ましい本発明の物質は、骨量減少が関連する障害の治療に有用なLRP5経路のアゴニストである。関連するLRP6経路のアゴニストである物質も考慮される。LRP5とLRP6との類似性が高いので、LRP5およびHBMの調節に関する全ての言及は、LRP6に関するものも考慮している。

【 0 0 4 6 】

「HBM」は、高い骨量、およびHBM1家系と関連する表現型を含むことを意味している。ヒトLRP5においては、HBM1家系において観察される表現型が得られるG171Vの変異が存在する。しかしこの部位におけるあらゆる変異は、ヒトLRP5遺伝子、またはあらゆる哺乳類LRP5遺伝子、またはLRP6のプロペラ中の同等の部位にあると考えられる。

【 0 0 4 7 】

「HBM表現型」は、HBM1家系で観察されるような表現型が得られるあらゆる変異を含むことを意味している。これらの変異は、ヒトLRP5の残基171、またはLRP5における他の部位、または動物において発現される場合に高骨量が誘発されるLRP6における類似の部位にあってよい。

【 0 0 4 8 】

「カテニン経路」とは、カテニン、および骨リモデリングと関連するシグナリングに關与するカテニンの下流のタンパク質を含むあらゆるタンパク質/遺伝子を意味する。本発明の好ましい物質は、カテニン経路を活性化する物質(すなわちカテニンアゴニスト)である。

【 0 0 4 9 】

「MAPKAPK2経路」とは、MAPKAPK2、および骨リモデリングと関連するシグナリングに關与するMAPKAPK2の下流のタンパク質を含むあらゆるタンパク質/遺伝子を意味する。

【 0 0 5 0 】

「OPG/RANKL経路」とは、OPG/RANKL、ならびに骨リモデリングと関連するシグナリングに關与するOPGおよびRANKLの下流のタンパク質を含むあらゆるタンパク質/遺伝子を意味する。

【 0 0 5 1 】

「Dkk経路」は、Wnt経路の一部であるDkk-1およびLRP5および/またはLRP6の相互作用に關与するあらゆるタンパク質/遺伝子を含むことを意味している。Dkk-1はLRP5活性を阻害する。したがって骨量減少障害の場合、Dkk-1アンタゴニストが好ましい。

【 0 0 5 2 】

「タンパク質」とは、ペプチド結合によって互いに結合したアミノ酸残基のポリマーを意味する。本明細書において使用される場合、この用語は、任意の大きさ、構造、または機能のタンパク質、ポリペプチド、およびペプチドを意味する。しかし典型的には、タンパク質は少なくとも6個のアミノ酸の長さである。好ましくは、タンパク質が短いペプチドである場合、少なくとも約10アミノ酸残基の長さとなる。また「タンパク質」は、天然、組換え、または合成のタンパク質を含んでいる。この用語を使用して、タンパク質フラグメントを指す場合もある。タンパク質は、1分子であってもよいし、複数分子の複合体であってもよい。タンパク質という用語は、1つ以上のアミノ酸残基が、対応する天然アミノ酸の人工的化学類似体である、アミノ酸ポリマーにも適用することができる。1つ以上のアミノ酸残基が「非天然の」アミノ酸であり、全ての天然アミノ酸に対応していないアミノ酸ポリマーも、用語「タンパク質」の使用に含めることができる。好ましくはタンパク質は、骨リモデリングおよび/または骨石灰化に関する生物活性を有する。

10

20

30

40

50

【0053】

「タンパク質のフラグメント」または「タンパク質フラグメント」は、別のタンパク質の一部であるタンパク質/ポリペプチドを意味する。例えば、タンパク質のフラグメントは、培養細胞から単離された全長タンパク質を消化することで得られたポリペプチドであってよい。タンパク質のフラグメントは典型的には少なくとも6個のアミノ酸を含む。より典型的には、フラグメントは少なくとも10個のアミノ酸を含む。好ましくは、フラグメントは少なくとも約16個のアミノ酸を含む。このようなタンパク質フラグメントは好ましくは生物活性を有する。このような生物活性は、好ましくは、骨石灰化の調節につながるWnt経路の調節である。

【0054】

「免疫グロブリン」は、抗体、抗体フラグメント、および抗体の一部である組換えタンパク質を含むことを意味している。用語「抗体」の使用は、天然、あるいは全体または一部が合成によって生成された免疫グロブリンを意味している。抗原と特異的に結合する能力を維持するそれらのあらゆる誘導体もこの用語に含まれる。この用語は、免疫グロブリンの結合領域と同じまたは大部分が同じである結合領域を有するあらゆるタンパク質も含んでいる。これらのタンパク質は、自然源から誘導されてもよいし、部分的または完全に合成されてもよい。抗体は、モノクローナルでもポリクローナルでもよい。抗体は、あらゆる免疫グロブリンクラス、例えばあらゆるヒトのクラス：IgG、IgM、IgA、IgD、およびIgE、ならびにサブクラス（例えば、IgG1、IgG2）のメンバーであってよい。しかしIgGクラスの誘導体が、本発明において好ましい。

【0055】

用語「抗体フラグメント」とは、全長よりも短い抗体のあらゆる誘導体を意味する。好ましくは、抗体フラグメントは、全長抗体の特異的結合能力の少なくとも実質的な部分を維持する。抗体フラグメントの例としては、限定するものではないが、Fab、Fab'、(Fab')₂、scFv、Fv、dsFv二重特異性抗体(dibody)、およびFdフラグメントが挙げられる。抗体フラグメントはあらゆる手段によって生成することができる。例えば、抗体フラグメントは、無傷の抗体の断片化によって酵素的または化学的に生成することができるし、あるいは、部分抗体配列をコードする遺伝子からの組換えによって生成することもできる。あるいは、抗体フラグメントは、全体または一部を合成することによって生成することもできる。抗体フラグメントは、場合によっては1本鎖の抗体フラグメントであってよい。あるいは、フラグメントは、例えばジスルフィド結合などによって互いに結合した複数の鎖を含むこともできる。フラグメントは、場合により多分子複合体であってよい。機能性抗体フラグメントは、典型的には少なくとも約50個のアミノ酸を含み、より典型的には少なくとも約200個のアミノ酸を含み、あるいはこれらの値のあらゆる長さとなる。

【0056】

「一本鎖Fv」(「scFvs」)は、ポリペプチドリンカーによって互いに共有結合した軽鎖可変領域(V_L)および重鎖可変領域(V_H)のみからなる組換え抗体フラグメントである。V_LまたはV_HのいずれかがNH₂末端領域であってよい。このポリペプチドリンカーは、重大な立体障害なしに2つの可変領域を架橋させる限り、種々の長さおよび組成を有することができる。典型的には、このリンカーは、主としてグリシン残基およびセリン残基で構成され、溶解性のためにある程度グルタミン酸残基またはリジン残基が散在している。

【0057】

「二重特異性抗体」は、二量体のscFvsである。ダイアボディの構成要素は、典型的には、ほとんどのscFvsよりも短いペプチドリンカーを有し、これらは二量体として会合していることが好ましい。

【0058】

「Fv」フラグメントは、非共有相互作用によって互いに維持される1つのV_H領域および1つのV_L領域からなる抗体フラグメントである。本明細書において用語「dsFv

10

20

30

40

50

」は、 $V_H - V_L$ の組を安定化させるための改変された分子間ジスルフィド結合を有するFvを指すために使用される。

【0059】

「F(ab')₂」フラグメントは、pH 4.0 ~ 4.5において酵素ペプシンで消化することによって免疫グロブリン（典型的にはIgG）から得られるものと実質的に同じ抗体フラグメントである。このフラグメントは組換えによって生成することもできる。

【0060】

「Fab」フラグメントは、F(ab')₂フラグメント中の2つの重鎖断片を連結する1つ以上のジスルフィド架橋の還元によって得られるものと実質的に同じ抗体フラグメントである。このFabフラグメントは組換えによって生成することもできる。

10

【0061】

「Fab」フラグメントは、免疫グロブリン（典型的にはIgG）を酵素パパインで消化することによって得られるものと実質的に同じ抗体フラグメントである。Fabフラグメントは組換えによって生成することもできる。Fabフラグメントの重鎖セグメントはFd断片である。

【0062】

用語「タンパク質捕捉剤」は、タンパク質と結合することができる分子または多分子複合体を意味する。タンパク質捕捉剤は、好ましくは、実質的に特異的な方式でそれらの結合相手と結合する。解離定数(K_D)が約 10^{-6} 未満であるタンパク質捕捉剤が好ましい。抗体または抗体フラグメントは、タンパク質捕捉剤として非常に好適である。抗原も、抗体と結合できるため、タンパク質捕捉剤として機能することができる。タンパク質リガンドと結合する受容体は、可能性のあるタンパク質捕捉剤の別の例である。非共有相互作用を介してそれらの結合相手と相互作用するだけである物質に、タンパク質捕捉剤が限定されるものではないことを理解されたい。場合によってはタンパク質捕捉剤は、結合するタンパク質と共有結合してもよい。例えば、タンパク質捕捉剤は、結合相手と結合した後で光架橋させることができる。

20

【0063】

用語「結合相手」とは、特定のタンパク質捕捉剤と、好ましくは実質的に特異的な方法で、結合するタンパク質を意味する。場合によっては、結合相手は、タンパク質捕捉剤であるタンパク質とインピボで通常結合するタンパク質であってよい。しかし、別の実施形態においては、結合相手は、それによってタンパク質捕捉剤が選択される（インピトロまたはインピボの選択）、または産生される（抗体の場合など）タンパク質またはペプチドであってよい。結合相手は、2つ以上のタンパク質捕捉剤によって共有されてもよい。例えば、種々のポリクローナル抗体と結合する結合相手は、多数のエピトープを有することができる。1つのタンパク質捕捉剤が多数の結合相手と結合することもできる（例えば、複数の結合相手が同じエピトープを共有する場合）。

30

【0064】

「タンパク質の結合に好適な条件」とは、溶液中でタンパク質とその結合相手との間で結合が起こる条件（塩濃度、pH、界面活性、タンパク質濃度、温度などに関する）を意味する。好ましくは、これらの条件は、有意量の非特異的タンパク質結合が起こるほど緩い条件ではない。

40

【0065】

「アレイ」は、基体上のパターンの配列のことである。このパターンは多くの場合二次元パターンであるが、アレイ基体に材料をより多く適用するため、このパターンが三次元パターンであってもよい。

【0066】

用語「基体」とは、本発明のアレイの塊状材料、下層の材料、およびコア材料を意味する。この基体は、核酸、抗体、免疫グロブリン、およびその他の化合物が固定される材料である。

【0067】

50

用語「微細機械加工」および「微細加工」の両方は、微細構造（サブミリメートルの特徴の寸法を有する構造）の形成に有用な多数の技術を意味する。このような技術としては、限定するものではないが、レーザーアブレーション、電着、物理蒸着および化学蒸着、フォトリソグラフィ、ならびに湿式化学エッチングおよび乾式エッチングが挙げられる。射出成形およびLIGA（例えば、X線リソグラフィ、電着、および成形）などの関連技術も含まれる。これらの技術のほとんどは、半導体、マイクロエレクトロニクス、および、微小電気機械システム（MEMS）において使用するために本来開発されているが、本発明にも十分適用可能である。

【0068】

用語「被膜」とは、基体表面に自然にまたは合成によって形成または塗布された層を意味する。例えば、シリコンなどの基体を空気に曝露すると、曝露した面が酸化される。シリコンでできた基体の場合、空気に曝露することによって表面上に酸化ケイ素被膜が形成される。別の場合は、被膜は基体からは誘導されず、機械的、物理的、電氣的、または化学的手段によって表面に被膜を配置することができる。この種の被膜の例は、シリコンまたはポリマーの基体に適用される金属被膜、あるいはシリコン基体に適用される窒化ケイ素被膜である。被膜はあらゆる厚さであってよいが、典型的には被膜は、基体の厚さよりも薄い厚さを有する。

10

【0069】

「中間層」は、第1の被膜と基体との間にある追加の被膜または層である。場合により複数の中間層を合わせて使用することができる。典型的な中間層の主目的は、第1の被膜と基体との間の接着を促進することである。例えば、シリコンまたはガラスの基体に金被膜を接着するためにチタンまたはクロムの中間層が使用される。しかし、中間層の他の実現可能な機能も予期される。例えば、ある中間層は、アレイの検出システムにおいてある役割を果たすことができる（例えば、非伝導性基体と非伝導性被膜との間の半導体または金属層など）。

20

【0070】

「アフィニティータグ」は、有機薄膜の露出した官能基に直接的または間接的にポリペプチドを固定することができる官能性部分を意味する。好ましくは、アフィニティータグは、部位特異的な固定が可能であり、それによってポリペプチドまたは核酸の有機薄膜上への方向性が向上する。場合によっては、アフィニティータグは単純な化学官能基であってよい。他の可能性としては、核酸、アミノ酸、ポリ（アミノ酸）タグ、または全長タンパク質が挙げられる。さらに別の可能性としては炭水化物および核酸が挙げられる。例えば、アフィニティータグは、ポリヌクレオチドであってよく、これが、有機薄膜上の官能基として機能する別のポリヌクレオチド、またはアダプターとして機能する別のポリヌクレオチドとハイブリダイズする。アフィニティータグは合成化学部分であってもよい。各パッチの有機薄膜が脂質二重層または単層を含む場合は、膜アンカーが好適なアフィニティータグとなる。アフィニティータグは、タンパク質と共有結合してもよいし、非共有結合してもよい。例えば、アフィニティータグがポリペプチドと共有結合する場合、化学共役を介して結合することもあるし、融合タンパク質として結合することもある。アフィニティータグは、開裂可能な結合を介してタンパク質と結合することもできる。あるいは、アフィニティータグは、ポリペプチドと直接接触しなくてもよい。その代わりにアフィニティータグが、アダプターによってタンパク質から分離していてもよい。アフィニティータグは、非共有相互作用または共有結合のいずれかを介して、タンパク質を有機薄膜に固定することができる。

30

40

【0071】

本発明の目的では「アダプター」は、アレイのパッチの固定されたタンパク質とアフィニティータグとを連結するあらゆる要素であってよい。アダプターは、かならずしも必要ではないが、アフィニティータグとタンパク質との両方に非共有結合する別個の分子であってもよい。この代わりに、アダプターは、アフィニティータグまたはタンパク質、あるいは両方と共有結合することもできる（例えば、化学共役を介して、または融合タンパク

50

質として)。全長タンパク質などのタンパク質、ポリペプチド、またはペプチドが典型的なアダプターである。他の可能性のあるアダプターとしては炭水化物および核酸が挙げられる。

【0072】

用語「融合タンパク質」は、2つ以上のポリペプチドで構成され、典型的には本来の状態では連結していないが、ペプチド結合を介してそれぞれのアミノ末端およびカルボキシル末端で連結して、1つの連続したポリペプチドを形成しているタンパク質を意味する。2つ以上のポリペプチド成分は、直接連結する場合もあるし、ペプチドリンカー/スペーサーを介して間接的に連結する場合もあるものと理解されたい。

【0073】

用語「通常の生理学的条件」とは、生物または細胞の内部で典型的である条件を意味する。一部の器官または生物では極限条件が得られることが認識されているが、生物内および細胞内の環境は通常pH7付近(すなわちpH6.5~pH7.5)で変動し、主要溶媒として水を含み、0を超え50未満の温度で存在する。種々の塩の濃度は、基準として使用される器官、生物、細胞、または細胞区画に依存することが認識されている。通常の生理学的条件は、骨組織および骨細胞の負荷がかけられた状態または負荷がかかっていない状態の両方をさらに含むことができる。

【0074】

「プロテオミクス」とは、プロテオームまたはプロテオームの一部のいずれかの研究または特徴を意味する。「プロテオーム」は、細胞または細胞集団の細胞内タンパク質、および細胞または細胞集団によって分泌されるタンパク質の全コレクションである。この特性決定は、最も典型的には、その存在の測定、および通常は、細胞によって発現されたタンパク質の量が上げられる。そのタンパク質の機能、構造特性(翻訳後修飾など)、および細胞内の位置も研究される。「機能的プロテオミクス」とは、細胞または細胞集団のタンパク質発現産物の機能的特性、活性レベル、および構造特性の研究を意味する。

【0075】

(1.2略語)

10

20

【表 1 A】

ACP5	酸性ホスファターゼ 5	
Akt-3	タンパク質キナーゼ B(PKB)または RAC-PK	
AIPASE	アルカリホスファターゼ	
AP1	アダプター関連タンパク質 1	
AP1B1	アダプタータンパク質複合体 AP-1、 β 1 サブユニット	
AXIN	アキシン	
b.i.d.	bis in die(1 日 2 回)	10
BGN	骨特異的ビグリカン	
BMP1	骨形成タンパク質 1	
BMP4	骨形成タンパク質 4	
BMU	骨リモデリング単位	
BSA	ウシ血清アルブミン	
BTG2	B 細胞転座遺伝子 2、抗増殖性	
CBFB	核結合因子 β	
CCND1	サイクリン D1	20
CCND3	サイクリン D3	
CCNI	サイクリン I	
CELSR2	カドヘリン EGF LAG 7 回貫通 G 型受容体 2	
CHUK/IKK α	保存ヘリックス-ループ-ヘリックスユビキタスキナーゼ(conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase)、IkB キナーゼ α	
CK1 α	カゼインキナーゼ 1、 α 1	
CKB	クレアチンキナーゼ、脳	
CNK1	KSR 様コネクタエンハンサー(connector enhancer of KSR-like)	30
Col1A1	コラーゲン、1 型、 α 1	
Col3A1	コラーゲン、3 型、 α 1	
Col6A3	コラーゲン、VI 型、 α 3	
Connx43	コネキシン 43	
COX-2	シクロオキシゲナーゼ-2	
CRABP2	細胞レチノイン酸結合タンパク質 II	
CSF1R	コロニー刺激因子 1 受容体	
CSPG2	コンドロイチン硫酸プロテオグリカン	
CTGF	結合組織増殖因子	40
CTSK	カテプシン K	
CX3CR1	ケモカイン(C-X3-C)受容体 1	

【表 1 B】

サイクリン D1	CCND1 を参照	
DELTEX	deltex ホモログ 2(Drosophila)、EphB2 を参照	
DMSO	ジメチルスルホキシド	
DVLI	disheveled,dsh ホモログ(Drosophila)	
EDTA	エチレンジアミン四酢酸	
EGTA	エチレンジアミン-N,N,N',N'-四酢酸	
EPHB2	KSR 様コネクタエンハンサー(ras の Drosophila キナーゼサブレッサー)	10
EPHB6	Eph 受容体 B6	
ERBB3	GRO1 癌遺伝子	
ERK	マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ p44/42(MAPK)としても知られている	
FAP	繊維芽細胞活性化タンパク質, α	
FBLN1	フィブリン(fibulin)1	
FBS	ウシ胎児血清	
FGF-2	線維芽細胞増殖因子 2(塩基性)	20
FGF-7	線維芽細胞増殖因子 7(ケラチノサイト増殖因子)	
FOS	FBJ マウス骨肉腫ウイルス癌遺伝子ホモログ	
FOSL1	Fos 様抗原 1	
Frizzled2	Frizzled(Drosophila)ホモログ 2、FZD2 と呼ばれる	
FZD2	Frizzled(Drosophila)ホモログ 2	
G171V	ヒト LRP5 の 171 番におけるグリシンからバリンへの変異	
GADD45A	増殖抑制および DNA 損傷誘発(growth arrest および DNA-damage inducible), α	
GADD45B	増殖抑制および DNA 損傷誘発 45, β	30
GADD45G	増殖抑制および DNA 損傷誘発 45, γ	
GAS6	増殖抑制特異的 6	
GJA1	ギャップ結合膜チャネルタンパク質 α 1(コネキシン 43 としても知られる)	
GJB3	ギャップ結合膜チャネルタンパク質 β 3	
GSK-3	グリコーゲンシンターゼキナーゼ-3	
GSK-3 α	グリコーゲンシンターゼキナーゼ-3, α アイソフォーム	
GSK-3 β	グリコーゲンシンターゼキナーゼ-3, β アイソフォーム	40
iGSK	GSK 阻害剤	
iGSK-3	GSK-3 阻害剤	
HBM	高骨量	
HERPUD1	ホモシステイン誘発性、小胞体ストレス誘発性、ユビキチン 0 様ドメイ	

【表 1 C】

	ンメンバー1	
HRT	ホルモン補充療法	
i.m.	筋肉内の	
i.v.	静脈内の	
IDB2	DNA 結合阻害剤 2	
IDB3	DNA 結合阻害剤 3	
IGF2	インスリン様増殖因子 2(ソマトメジン A)	10
IGF2R	インスリン様増殖因子 2 受容体	
IGFBP6	インスリン様増殖因子結合タンパク質 6	
IL-1	インターロイキン-1	
IL1R1	インターロイキン-1 受容体 I 型	
IL1RL1	インターロイキン 1 受容体様 1	
IL4RA	インターロイキン 4 受容体, α	
IL-6	インターロイキン-6	
ITGA5	インテグリン α 5(フィブロネクチン受容体 α)	20
ITGB5	インテグリン, β	
ITGBL1	インテグリン, β 様 1	
JNK	c-jun アミノキナーゼ経路	
JUN	v-jun トリ肉腫ウイルス 17 癌遺伝子ホモログ	
JUND1	Jun 癌原遺伝子関連遺伝子 d1	
LBD	LRP5 のリガンド結合ドメイン	
LDLR	低密度リポタンパク質受容体	
LOX	リシルオキシダーゼ	
LRP5	低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質 5	30
LRP6	低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質 6	
LSP1	リンパ球特異的タンパク質 1	
LUM	lumican	
MAPK	マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ(p42,44)(ERK)	
MAPKAPK2	マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ活性化タンパク質キナーゼ 2、 MK2 と呼ばれる	
MCC	結腸直腸癌における変異	
MDSC	間葉由来幹細胞	40
MET	met 癌原遺伝子(肝細胞増殖因子受容体)	
MMP-14	マトリックスメタロプロテイナーゼ 14	
MMP-9	マトリックスメタロプロテイナーゼ 9	
MSX1	ホメオボックス、msh 様 1	

【表 1 D】

MYBL1	v-myb 骨髄芽球症ウイルス癌遺伝子ホモログ(トリ)様 1	
MYC	v-myc トリ骨髄球腫症ウイルス癌遺伝子ホモログ	
MYCS	Myc 様癌遺伝子、s-myc タンパク質	
NCAM1	神経細胞接着分子 1	
NFATC1	活性 T 細胞の核因子、細胞質顆粒 1	
NFKB1	B 細胞 1 の κ 軽鎖遺伝子エンハンサーの核因子、p105	
非 TG	非トランスジェニック	10
NOS3	酸化窒素シンターゼ 3(NOS3)、eNOS と呼ばれる	
NR4A1	核受容体サブファミリー4、グループ A、メンバー1	
OGN	オステオグリシン	
OPG	オステオプロテグリン	
OSMR	オンコスタチン M 受容体	
p.o.	per os(経口的に)	
PCOLCE	プロコラーゲン c-プロテイナーゼエンハンサータンパク質	
PDGFA	Cluster Incl.M29464 : 血小板由来増殖因子 α	20
PDGFRA	血小板由来増殖因子受容体 α ポリペプチド	
PKA	タンパク質キナーゼ A	
PKC	タンパク質キナーゼ C	
PLAT	組織型プラスミノゲンアクチベーター、t-PA	
PRDC-PENDIN	DAC および Cerberus と関連するタンパク質	
G		
PTGIS	プロスタグランジンシンターゼ	
PTGS1	プロスタグランジン-エンドペルオキシドシンターゼ 1、COX-1 と呼ばれる	30
PTGS2	プロスタグランジン-エンドペルオキシドシンターゼ 2(プロスタグランジン G/H シンターゼまたはシクロオキシゲナーゼ 2)、別名 COX-2	
PTH	副甲状腺ホルモン	
q.d.	quaque die(毎日)	
q.h.	quaque hora(例えば、q24、q6h)	
q.o.d.	quaque altera die(1 日おき)	
RAMP3	受容体(カリシトニン)活性修飾タンパク質 3	
RANK	NF-kB 受容体アクチベーター	40
RANKL	NF-kB 受容体アクチベーターのリガンド	
RNAi	RNA 干渉	
RUNX1	runt 関連転写因子 1	
RUNX2/CBFA1	runt 関連転写因子 2	

【表 1 E】

s.c.	皮下の	
S100A10	カルパクチンと類似のカルシウム結合タンパク質	
SDC1	シンデカン 1	
SDF1	間質由来因子 1	
SERM	選択的エストロゲン受容体モジュレーター	
SERPINE1	セリン(またはシステイン)プロテイナーゼ阻害剤、クレイド E(ネキシ ン、プラスミノゲンアクチベーター阻害剤 1 型)、メンバー 1	10
SFRP1	分泌型 frizzled 関連タンパク質 1	
SFRP4	分泌型 frizzled 関連タンパク質 4	
shRNA	短鎖ヘアピン RNA	
siRNA	短鎖干渉 RNA	
SPARC	sparc/オステオネクチン	
SPARCL1	SPARC 様 1(mast9、hevin)	
SPP1	分泌リンタンパク質 1	
SPR	表面プラスモン共鳴	20
STAT1	転写 1 のシグナルトランスデューサーおよびアクチベーター	
STAT3	リケン(RIKEN)cDNA 1110034C02 遺伝子	
TANK	TRAF ファミリーメンバー関連 Nf- κ B アクチベーター	
TG	トランスジェニック	
TGFB1	トランスフォーミング成長因子、 β 1	
TGFB2	トランスフォーミング成長因子、 β 受容体 II	
THBD	トロンボモジュリン	
THBS1	トロンボスポンジン 1	
TIEG	TGFB 誘導性初期遺伝子	30
TIMP1	メタロプロテイナーゼの組織阻害剤	
TIMP2	メタロプロテイナーゼの組織阻害剤 2	
TIMP3	メタロプロテイナーゼの組織阻害剤 3	
TNF	腫瘍壊死因子	
TNFRSF10B	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー 10b	
TNFRSF11B	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー 11b(オステオプロテ ゲリン)	
TNFSF11	腫瘍壊死因子(リガンド)スーパーファミリー、メンバー 11(RANKL 参照)	40
TOB1	ErbB-2.1 のトランスデューサー	
TRAF3	TNF 受容体関連因子 3	
TUNEL	ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ dUTP ニック エンドラベリング	

【表 1 F】

UNK_D83402	プロスタグランジン I2(プロスタサイクリン)シンターゼ
VCAM1	血管細胞接着分子 1
VEH	賦形剤
WIF	Wnt 抑制因子
WISP1	WNT1 誘導経路タンパク質 1
WISP2	WNT1 誘導シグナリング経路タンパク質 2
wk	週
Wnt	ウイングレス型 MMTV 統合部位(wingless-type MMTV integration site)
Wnt 3A	ウイングレス型 MMTV 統合部位ファミリーメンバー3A
Wnt6	ウイングレス型 MMTV 統合部位ファミリーメンバー6
Wnt10B	ウイングレス型 MMTV 統合部位ファミリーメンバー10B

10

【0076】

(2. 骨負荷遺伝子発現プロファイル)

本発明の新しい一態様は、Wnt 経路が骨石灰化ホメオスタシスに含まれること、この経路を調節することによって、さらに石灰化を調節することが可能であることを解明することである。インビボおよびインビトロの両方のアッセイを使用して、骨負荷の遺伝子発現プロファイルを解明した。最も典型的には、遺伝子発現プロファイル(すなわち、どの遺伝子がアップレギュレートおよびダウンレギュレートされるかの同定)、さらに特に、Wntシグナリング経路の活性化と直接的または間接的に関連する多種多様の遺伝子に対する遺伝子識別特性プロファイル(すなわち、互いに対してアップレギュレートおよびダウンレギュレートした遺伝子転写量)を作成した。

20

【0077】

本明細書に開示される遺伝子発現分析(後出の項および実施例を参照されたい)を実施すると、多数の遺伝子、特にCOX-2、eNOS、コネキシン43、Fos、Jun、およびSFRP1(さらに別の遺伝子は後出の表に示している)などが骨付加および骨付加の増加に应答してアップレギュレートすることを発見した。さらに、カテニンが、標準的なWnt経路における必須成分であることが分かった。この経路が活性化されると、カテニンがリン酸化されなくなる。リン酸化されない形態のカテニンが、細胞質中に蓄積し、核内に移行する。核内では、カテニンは、TCFおよびLEFなどの標的転写因子の阻害物質を軽減することができ、それによって転写が活性化される。

30

【0078】

シグナリング経路アゴニスト(すなわち、Wnt経路アゴニスト)としては、限定するものではないが、GSK阻害剤が挙げられる。さらに別のシグナリング経路阻害剤としては、限定するものではないが、Wnt3A、Wnt3Aミメティック、Wnt3Aアゴニスト、PKC阻害剤(例えば、SQ22536)、PKA阻害剤(例えば、H89、カルビオケム)、MEK1/2阻害剤(例えば、カルビオケムのU0126、PD98059)、P38MAPK阻害剤(例えば、SB203580、カルビオケム)、JNK阻害剤(カルビオケムのSP-600125)、MAPKAPK2阻害剤(カルビオケムCat.N0.3850880)、カルシウム動態阻害剤(例えば、TMB-8塩酸塩)、Gタンパク質共役シグナリング阻害剤(例えば、百日咳毒素)、酸化窒素シンターゼ阻害剤(例えば、L-NAME)、およびCOX-2阻害剤(例えば、NS-398、インドメタシン)が挙げられる。

40

【0079】

したがって、上述のアゴニストおよびアンタゴニストの両方を、(1)Wnt経路、(2)骨ホメオスタシスと関連するWnt経路シグナリング、(3)骨ホメオスタシスに関

50

するWnt経路の制御、(4)Wnt経路シグナリングと連動する他のシグナリング経路の寄与、(5)インビボおよびインビトロの両方での骨負荷応答および遺伝子発現プロファイル、ならびに(6)骨ホメオスタシスおよびそれらの調節を研究するためのリサーチツールとして使用することができる。これらの試薬は、例えば、新規な骨同化遺伝子標的の同定に使用することができ、これらは骨ホメオスタシス調節の必要な被験体の治療にも使用することができる。例えば、Wnt経路アゴニストは骨量減少の治療に使用することができ、Wnt経路アンタゴニストは、大理石骨病に見られるような骨石灰化の増加を伴う障害の治療に使用することができる。

【0080】

(2.1 遺伝子発現プロファイリング)

遺伝子発現プロファイリングは、遺伝子のRNAへの転写を分析することによって実施される。これを実施するための好ましい方法は、リアルタイムPCRおよびTaqMan(登録商標)法による方法である。リアルタイムPCRによって、特に刺激直後の時点での、刺激に対する応答における転写プロファイルおよび遺伝子転写識別特性の、迅速で再現性のある決定方法が得られる。したがってこの方法は、骨負荷に対する骨細胞の応答の分析に特に有用である。検出される信号は、反応におけるPCR産物量に正比例する。各サイクルにおける蛍光発光量を記録することによって、PCRの対数期中のPCR反応を関しすることが可能となり、ここで、PCR産物の初期の顕著な増加は、ターゲットテンプレートの初期量と相関がある。

【0081】

したがって、リアルタイムPCRと、TaqMan(登録商標)技術の使用とによって、全てのプライマーセットで同じ温度サイクルパラメータが使用されるのであれば、同じプレート上の複数の標的の分析も可能となる。したがって、骨応力刺激に対する応答においてアップレギュレートおよびダウンレギュレートすることが示されている遺伝子などの複数の遺伝子その分析を評価することができる。リアルタイムPCRの使用方法は、本明細書および実施例に開示している。別の方法も当業者に周知となっている。例えば、RAPID CYCLE REAL-TIME PCR: METHODS AND APPLICATION, S. Meuer et al., eds., Springer Verlag 2001)、ならびにRAPID CYCLE REAL-TIME PCR - METHODS AND APPLICATIONS, W. Dietmaier et al., eds., Springer Verlag 2002)を参照されたい。

【0082】

リアルタイムPCRが、遺伝子発現プロファイリング実施のために好ましい方法であるが、RNAの分析および定量の別の方法を使用することもできる。RNA発現を分析するための別の手段も当分野において周知であり、例えば、eTAG(アクララ・バイオサイエンス(ACLARA Biosciences))、ノーザンブロット分析、S1ヌクレアーゼ分析、RNase保護アッセイ、およびウエスタンブロット(タンパク質量の変化を見る)が挙げられる。これらのアッセイを実施する方法は当分野において周知である。例えば、USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL, Harlow, EdおよびLane, David Cold Spring Harbor Press, 1999; Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989); およびManiatis et al., MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 1982)を参照されたい。

【0083】

遺伝子発現プロファイリングは、骨荷重のインビトロ分析、および骨組織から得られた細胞の転写のインビボ分析のために、培養して増殖させた細胞に対して実施することがで

10

20

30

40

50

きる。インビボおよびインビトロ分析の両方のために骨に刺激を与える方法を、以下に詳細に議論する。簡潔に述べると、遺伝子発現プロファイルおよび識別特性は、未負荷の細胞、負荷を与えた細胞、Wnt経路を調節する物質を与えた細胞、安静時および負荷を与えたHBM細胞、ならびにHBMトランスジェニック(TG)動物または正常動物のいずれかの事前の分類からの細胞から求めた。各細胞集団から得た遺伝子発現プロファイルを編集することによって、物質のスクリーニングをあらかじめ形成することによる1つの遺伝子プロファイルおよび遺伝子識別特性の組と、実際の骨刺激に対する応答でアップレギュレートおよびダウンレギュレートすることが分かった同じ遺伝子の組である最適化された組の遺伝子発現プロファイルとの両方が得られた。

【0084】

骨遺伝子発現プロファイルは、以下のパラメータの組について求めた。

- (1) 負荷のないインビトロ細胞培養、
- (2) 負荷刺激を与えたインビトロ細胞培養、
- (3) Wnt経路活性を調節する化合物を与えた後に負荷刺激を与えたインビトロ細胞培養、
- (4) 負荷を与えたHBM動物から得た細胞、
- (5) 動物に負荷を与えWnt経路を調節する化合物を与えたHBM TG動物から得た細胞、
- (6) 負荷を与えた非TG動物から得た細胞、
- (7) 負荷を与えWnt経路モジュレーターを与えた非TG動物から得た細胞、および
- (8) 負荷を与えていないTG動物または非TG動物のいずれかから得た細胞。

10

20

【0085】

各組の細胞から得たデータに基づいて、遺伝子発現プロファイル(すなわち、アップレギュレートおよびダウンレギュレートする遺伝子の指標)および遺伝子発現識別特性(すなわち、安静時と比較した、遺伝子発現のアップレギュレーションおよびダウンレギュレーションの程度)を得た。このデータから、骨負荷に対する応答で常にアップレギュレートまたはダウンレギュレートする遺伝子を構成する中心となる遺伝子の組を得た。

【0086】

以下の表は、上記の各パラメータについて得られた遺伝子発現プロファイルの分析である。

30

【0087】

【表 2】

表 1
HBM 遺伝子発現プロファイル
HBM 遺伝子型の遺伝子発現に対して観察さ

遺伝子	経路	れた効果	
ACP5	HBM	HBM 細胞でアップレギュレートした	
Col1A1	HBM	顕著な効果なし	
コネキシン 43	Wnt	顕著な効果なし	
CTSK	HBM	HBM 細胞でアップレギュレートした	10
サイクリン	Wnt	顕著な効果なし	
D1			
ENOS	負荷センサー	顕著な効果なし	
Frizzled 2	Wnt	顕著な効果なし	
GADD45A	HBM	HBM 細胞でダウンレギュレートした	
IGF2	HBM	HBM 細胞でダウンレギュレートした	
IGFBP6	HBM	HBM 細胞でアップレギュレートした	
IL-6	負荷センサー	HBM 細胞でダウンレギュレートした	20
IL-8	応力および破骨細胞機能	HBM 細胞でダウンレギュレートした	
MK2	応力および破骨細胞機能	HBM 細胞でダウンレギュレートした	
OPG	応力および破骨細胞機能	顕著な効果なし	
オステオネク チン	HBM	顕著な効果なし	
PTGS2	負荷センサー	顕著な効果なし	
RANKL	応力および破骨細胞機能	顕著な効果なし	
SFRP1	Wnt	HBM 細胞でアップレギュレートした	30
SFRP4	Wnt	HBM 細胞でアップレギュレートした	
TGF β	HBM	HBM 細胞でアップレギュレートした	
TIMP3	HBM	HBM 細胞でアップレギュレートした	
WISP2	Wnt	HBM 細胞でアップレギュレートした	
Wnt10B	Wnt	HBM 細胞でアップレギュレートした	

【 0 0 8 8 】

表 1 における「応力および破骨細胞機能」は、応力に应答する遺伝子、および破骨細胞形成および機能に必要な遺伝子を意味する。表 1 で使用されている「負荷センサー」は、機械的負荷に应答することが文献により知られている遺伝子を意味する。表 1 および本明細書全体で使用されている「HBM 識別特性」は、HBM 変異を発現する細胞系、またはヒト HBM 1 家系の罹患した個人において異なる発現をする遺伝子の組を含むことを意味する。

【 0 0 8 9 】

【表 3 A】

表 2			
インビボにおける遺伝子発現に対する負荷の影響の			
HBM TG 動物および非 TG 動物の比較			
遺伝子	経路	遺伝子発現に対する負荷の影響	
ACP5	HBM	オスでは同等にアップレギュレートし、メスの HBM-TG ではより顕著に誘発される	
Col1A1	HBM	いずれも顕著な変化なし	10
コネキシン 43	Wnt	アップレギュレートした；HBM-TGにおいてより顕著	
CTSK	HBM	両方の動物で同等にアップレギュレートした	
サイクリン D1	Wnt	アップレギュレートした；HBM-TG においてより顕著	
ENOS	負荷センサー	アップレギュレートした；HBM-TG においてより顕著	
Frizzled 2	Wnt	アップレギュレートした；HBM-TG においてより顕著	
GADD45A	HBM	両方の動物でダウンレギュレートした	20
IGF2	HBM	両方の雄の動物でアップレギュレートした	
IGFBP6	HBM	アップレギュレートした；HBM-TGにおいてより顕著	
IL-6	負荷センサー	アップレギュレートした；HBM-TG においてより顕著	
IL-8	応力および破 骨細胞機能	アップレギュレートした；HBM-TG においてより顕著	
LRP5	-	いずれも顕著な変化なし	
MK2	応力および破 骨細胞機能	非 TG 動物のみアップレギュレートした	
OPG	応力および破 骨細胞機能	HBM-TG動物のみアップレギュレートした	30
オステオネ クチン	HBM	アップレギュレートした；HBM-TG においてより顕著	
PTGS	負荷センサー	アップレギュレートした；HBM-TGにおいてより顕著	
RANKL	応力および破 骨細胞機能	いずれも顕著な変化なし	
SFRP1	Wnt	アップレギュレートした；HBM-TG においてより顕著	
SFRP4	Wnt	アップレギュレートした；HBM-TG においてより顕著	40
TGF β	HBM	いずれも顕著な変化なし	
TIMP3	HBM	いずれも顕著な変化なし	

【表 3 B】

<u>遺伝子</u>	<u>経路</u>	<u>遺伝子発現に対する負荷の影響</u>
WISP2	Wnt	アップレギュレートした；HBM-TG においてより顕著
Wnt10B	Wnt	アップレギュレートした；HBM-TG においてより顕著

【 0 0 9 0 】

【表 4 A】

表 3
 インビトロにおける遺伝子発現に対する負荷の影響

遺伝子	遺伝子の種類	重力負荷に対する MC3T3 細	
		胞の応答	
AP1B1	応力で制御される遺伝子	アップレギュレートした	
AXIN	Wnt 経路の成分	アップレギュレートした	
BMP1	iGSK-3 による誘導が見られた	アップレギュレートした	10
CBFB	骨芽細胞機能	アップレギュレートした	
CCND1	Wnt 標的遺伝子	アップレギュレートした	
CCND3	細胞周期	アップレギュレートした	
CELSR2	G 型受容体	アップレギュレートした	
CHUK/IKK α	β -カテニンの核トランスロケーションを促進	アップレギュレートした	
CK1 α	Wnt 経路の成分	アップレギュレートした	
CKB	キナーゼ	アップレギュレートした	
CRABP2	骨芽細胞分化	アップレギュレートした	20
CSF1R	破骨細胞形成	アップレギュレートした	
CTGF	増殖因子	アップレギュレートした	
DVL1	Wnt シグナリング中間体	アップレギュレートした	
EPHB6	Wnt 標的遺伝子	アップレギュレートした	
FOSL1	応力で制御される遺伝子	アップレギュレートした	
GADD45B	細胞周期	アップレギュレートした	
GADD45G	細胞周期	アップレギュレートした	
GJA1	Wnt 標的遺伝子	アップレギュレートした	30
GJB3	Wnt 標的遺伝子	アップレギュレートした	
HERPUD1	Wnt 標的遺伝子	アップレギュレートした	
IGFBP6	IGF結合タンパク質	アップレギュレートした	
IL1R1	IL-1 媒介シグナリング、炎症	アップレギュレートした	
IL1RL1	IL-1 媒介シグナリング、炎症	アップレギュレートした	
IL4RA	炎症	アップレギュレートした	
ITGA5	インテグリンシグナリング	アップレギュレートした	
JUN	応力で制御される遺伝子	アップレギュレートした	40
JUND1	応力で制御される遺伝子	アップレギュレートした	
LDLR	リポタンパク質受容体	アップレギュレートした	

【表 4 B】

<u>重力負荷に対する MC3T3 細</u>		
<u>遺伝子</u>	<u>遺伝子の種類</u>	<u>胞の応答</u>
LOX	リシルオキシダーゼ	アップレギュレートした
MAPKAPK2	応力で制御されるシグナリングのキナーゼ	アップレギュレートした
MSX1	Wnt 標的遺伝子	アップレギュレートした
MYCS	Wnt 標的遺伝子	アップレギュレートした
NCAM1	Wnt 標的遺伝子	アップレギュレートした
NFATC1	炎症	アップレギュレートした
NFKB1	炎症、増殖	アップレギュレートした
PDGFA	増殖因子、骨芽細胞発生	アップレギュレートした
PRDC-PENDING	cereberus 様タンパク質	アップレギュレートした
PTGS1	炎症	アップレギュレートした
PTGS2	Wnt 標的遺伝子	アップレギュレートした
RAMP3	カルシウムシグナリング	アップレギュレートした
RUNX	骨芽細胞機能	アップレギュレートした
RUNX2/CBFA1	骨芽細胞機能	アップレギュレートした
SDC1	Wnt シグナリングに必要なプロテオグリカン	アップレギュレートした
SERPINE1	プロテアーゼ	アップレギュレートした
SPARCL1	骨芽細胞機能	アップレギュレートした
STAT3	増殖および細胞増殖	アップレギュレートした
TANK	炎症、NF-kB シグナリング	アップレギュレートした
TGFB1	TGF β シグナリング遺伝子	アップレギュレートした
THBD	内皮細胞機能	アップレギュレートした
TIEG	TGF β シグナリング遺伝子	アップレギュレートした
TIMP1	マトリックスメタロプロテイナーゼ	アップレギュレートした
TIMP3	マトリックスメタロプロテイナーゼ	アップレギュレートした
TNFRSF11B/OPG	Wnt 標的遺伝子	アップレギュレートした
TRAF3	NF-kB シグナリング	アップレギュレートした
WISP1	Wnt 標的遺伝子	アップレギュレートした

10

20

30

40

【 0 0 9 1 】

上記の遺伝子は、培養した MC3T3 細胞に重力負荷を与えることに対する応答で調節された。

【 0 0 9 2 】

【表 5】

表 4

Wnt/ β -カテニン経路アクチベーターである iGSK-3 の存在下
または非存在下でのフレクサーセル(FlexerCell)を使用した負荷の影響

治療/遺伝子	CCND1	CXN43	SFRP1	Wnt10b	eNOS	COX-2	FOS
iGSK なし/負荷なし	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
iGSK なし+負荷	3.64	3.39	3.05	2.76	2.35	2.48	3.20
iGSK0.05 μ M+負荷	3.80	4.27	3.04	3.70	2.54	2.56	3.66
iGSK0.2 μ M+負荷	4.39	4.42	3.36	3.53	2.65	2.74	3.76
iGSK1 μ M+負荷	5.17	4.76	3.59	3.69	3.06	3.16	4.51**
iGSK5 μ M+負荷	6.93*	5.38	5.41*	4.40*	4.33*	6.50**	6.20**
iGSK20 μ M+負荷	7.13**	7.72**	10.00**	6.95**	5.95**	8.17**	10.77**

10

【0093】

アップレギュレーションおよびダウンレギュレーションが起こるさらに別の遺伝子については、実施例および本明細書に提供される別の表を参照されたい。

20

【0094】

(3. インビボで骨荷重を研究する方法)

(3.1 骨の研究)

HBM 変異の同化の性質の基礎となる機構を理解するため、HBM トランスジェニック (TG) マウスにインビボで機械的荷重を与えて、遺伝子発現の変化を調べ、それらの非トランスジェニック (非TG) コントロール同腹子と比較した。これは、骨負荷刺激を与えた動物から脛骨または頭蓋冠を得ることによって行ったが、他の好適な骨を使用することもでき、限定するものではないが、例えば尺骨、大腿骨、および椎骨などを使用することができる。負荷刺激を与えた後で、HBM TG および非TG の同腹子マウスから RNA を得た。次に、頭蓋冠または脛骨 (またはその他の骨) から RNA を抽出し、これらの動物の間 (すなわち、安静時および負荷刺激後の HBM TG および非TG 動物) で比較を行った。

30

【0095】

HBM マウスは、それらの非TG 同腹子コントロールよりもはるかに大きな Wnt 経路遺伝子応答を示すことが観察された。この観察から、HBM 変異によって、骨が機械的荷重に対してより敏感になるとの結論を得た。負荷刺激インビボに対する応答で得られる遺伝子の識別特性の組の1つは、コネキシン43、オステオネクチン、オステオプロテゲリン、eNOS、COX-2、プロスタサイクリンシンセターゼ (PTGS)、インターロイキン-6 (IL-6)、サイクリンD1、Wnt 10B、SFRP1、およびSFRP4のアップレギュレーションを含む。後に詳細に示し、実施例でも示されるように、別の遺伝子でもアップレギュレーションが起こった。

40

【0096】

骨負荷刺激を誘発する方法としては、実施例において検討される4点負荷システムが挙げられる。負荷を与えるための別のインビボ方法は当分野で周知であり (例えば、3点負荷システム)、当業者に知られているとおりに使用することができる。

【0097】

HBM TG マウスにおいて得られた上記の発現プロファイル、または本明細書において議論される別の遺伝子のあらゆる組み合わせを使用して、特定の物質がWnt経路の活性化を向上させ、およびそれによる骨石灰化を向上させるかどうかを評価するために非TG動物およびHBM TG動物において物質のスクリーニングを行うことができる。石灰

50

化を向上させる物質を研究するためのいくつかのポジティブコントロールとしては、PTH、およびWnt経路の活性化によって石灰化を向上させるGSK-3阻害剤の3-(3-クロロ-4-ヒドロキシフェニルアミノ)-4-(2-ニトロフェニル)-1-H-ピロール-2,5-ジオンが挙げられる。本明細書に記載される他のGSK-3阻害剤もポジティブコントロールとして使用することができる。

【0098】

負荷刺激および/またはWnt経路調節を行った動物から得られる遺伝子発現プロファイルおよび識別特性以外に、負荷および/またはWnt経路調節による動物の骨の病理学的変化を研究することができる。例えば、頭蓋冠の厚さの変化(または他の骨の厚さの変化)、ならびに、骨負荷刺激単独、または骨リモデリングを調節する1種類以上の化合物との併用に対する応答でアップレギュレートまたはダウンレギュレートするとして本明細書のいずれかの表に記載されるあらゆるRNAのタンパク質発現またはタンパク質が挙げられる。

10

【0099】

頭蓋冠骨分析は、例えば、約0.01mg/kg/日~約100mg/kg/日の量で試験物質を動物に投与することによって行うことができる。より好ましくは、この物質は0.1mg/kg/日~約50mg/kg/日の量で与えられる。例えば動物には、約0.5、10、および50mg/kg/日で物質を投与することができる。典型的には、動物は、1群当たり6匹のマウス(1つの研究で合計72匹のマウス)に分けてで実施され、投与後5、15、および30日に試験が行われる。副甲状腺ホルモン(PTH)を、ポジティブコントロールとして使用することができ、GSK-3阻害剤として、3-(3-クロロ-4-ヒドロキシフェニルアミノ)-4-(2-ニトロフェニル)-1Hピロール-2,5-ジオンを使用することができる。これらの試薬の存在下および非存在下での骨負荷刺激の後、頭蓋冠の大きさの差を測定することができる。

20

【0100】

骨の病理学的変化を研究するための他の方法は当業者には明らかである。次に、これらの骨の病理学的変化を、インビボおよびインビトロの両方で得られた遺伝子発現および遺伝子識別特性プロファイルと比較して、データをさらに相関させることができる。前述したように、遺伝子発現プロファイルは、本明細書で議論されるあらゆる方法、または当業者には明らかな方法によって得ることができる。

30

【0101】

前述のあらゆる遺伝子について、骨負荷刺激に対する応答において調節される活性を分析することができるが、評価するのに好ましい遺伝子としては、限定するものではないが、SFRP1、TIMP3、GJA1、CTSK、COL1A1、CCND1、TIMP2、GADD45A、WISP2、FZD2、SFRP4、IGFBP6、LRP5、LRP6、IL6、IGF2、SPARC、MAPKAPK2、TNF、TNFRSF11B、TNFSF11、PTGS2(COX-2)、eNOS、GRO1、およびWnt10Bが挙げられる。骨負荷刺激単独、または骨リモデリングを調節する1種類以上の化合物との併用に対する応答においてアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションが起こるとして本明細書のいずれかの表に記載される遺伝子も参照されたい。

40

【0102】

(4. インビトロで骨荷重を研究する方法)

本発明の一態様は、インビトロでの骨負荷の影響、および骨負荷の利益(すなわち骨石灰化の増加)を増大することができる手段を研究することである。骨負荷の増強の研究は、インビボ(前述の通り)およびインビトロの両方で実施することができる。好ましくは骨負荷の増強は、最初にインビトロの実験を行った後、前述したようにインビボの実験を行う。

【0103】

したがって、本発明の一態様は、負荷刺激をシミュレートする条件下に細胞を置くことを含む。インビボで観察される骨負荷応答を模倣するために細胞培養に対してひずみを与

50

えることができる方法が数種類存在する。このような方法としては、限定するものではないが、流体剪断、静水圧縮、一軸延伸、二軸延伸、重力荷重、および Flexercell (登録商標) を使用して誘導される負荷、または同等のシステムが挙げられる。

【0104】

(4.1 骨負荷刺激)

前述のいずれかの方法によって得られるような骨負荷刺激によって調節される好ましい遺伝子としては、限定するものではないが、SFRP1、コネキシン43、CCND1、Wnt10b、Jun、Fos、PTGS2(COX-2)、およびeNOSが挙げられる。活性(例えば、mRNA転写およびタンパク質の増加)の増加を監視することができる別の遺伝子が、本明細書における多くの表に記載されている。骨負荷に対する応答において一貫してアップレギュレートすることが示されている少なくとも6個の遺伝子(すなわち、Jun、Fos、eNOS、SFRP1、COX-2、およびコネキシン43)も、Wnt経路を活性化する物質の添加によって増強される。Wnt2などの他の遺伝子は、Wnt経路を活性化する試薬(例えば、GSK-3阻害剤およびWnt3A、ならびにそのアゴニスト、ミメティック、および変異体)を添加しても増強されず、骨負荷にのみ応答する。

10

【0105】

(4.1.1 流体剪断刺激)

骨負荷を誘発する方法の1つは、流体剪断による方法である。流体剪断は、攪拌機構によって連続層流剪断を発生されるコーンプレート型粘度計を要する。あるいは、フロールーブ装置は、並流培養チャンパー中にこのような剪断を発生させることができる。後者の方法および装置は、フレクセル・インターナショナル・コーポレーション(Flexcell International Corporation)製造のストリーマー(Streamer)システムに代表される。フロールーブ装置は、再現性があり一定の刺激を発生することでも知られている。唯一の欠点は、終点が典型的には短時間であり、これらの変化がどのようなものであっても、分化した骨芽細胞の機能に影響を与えることである(Basso et al., Bone 30(2): 347-51(2002))。

20

【0106】

(4.1.2 静水圧縮刺激)

骨負荷を誘発する第2の方法は、静水圧縮の使用である。静水圧縮は、連続または断続的な力を発生させる圧縮空気が利用され、特に、細胞が細胞外マトリックスタンパク質/接着タンパク質と相互作用する領域に、力が集中すると考えられている。

30

【0107】

(4.1.3 一軸延伸刺激)

インビトロで骨負荷を誘発する第3の手段は、一軸延伸刺激の使用である。この一軸延伸法は、1方向での延伸力を利用する。この方法は、シリコーンの可撓性層に固定されたポリスチレンフィルムまたは他のフィルムの処理されたストリップ上での組織培養で細胞を増殖させる。さらにシリコーン層は2つの金属棒に取り付けられる。これらの金属棒は、電磁石または他の移動手段を使用して互いに対して操作することができる。この方法では流体剪断はまったく発生しない。流体剪断がないため、この方法はあまり好ましくないが、その理由は、介在する流体は、機械的延伸よりも、骨リモデリングにおいて重要な働きを担う可能性があるからである。したがって、この方法は、再現性があり一定の刺激を発生できるにもかかわらずインビボでの刺激を十分に模倣することができない(Basso et al., Bone 30(2): 347-51(2002))。

40

【0108】

(4.1.4 二軸延伸刺激)

二軸延伸は、実質的には、本明細書において検討されているFlexercell(登録商標)システムである。この方法では、コラーゲンがコーティングされたシラスティック(silastic)膜が利用され、この膜の上で細胞が増殖される。次に、このプレートが特殊なトレー中に取り付けられ、これが真空ポンプに取り付けられる。真空ポンプ

50

は、膜を延伸したり他の変形を生じさせたりすることによって、セルの膜を延伸し緩和させる。さらに、任意の媒体または流体の動きによって、流体剪断がさらに加えられる。

【0109】

(4.1.5 重力負荷刺激)

重力荷重は、インビトロで骨負荷を誘発することができる別の方法である。実質的には、細胞上に力が加えられることによって、細胞が平坦になる。さらなる詳細については、例えば、Hatton et al., J. Bone & Min. Res. 18(1) : 58 - 66 (2003) ; および Fitzgerald et al., Exp. Cell Res. 228 : 168 - 71 (1996) を参照されたい。特に、細胞はプレートまたはカバーガラス上で増殖され、続いて増加するG力に曝露される。

10

【0110】

(4.1.6 Flexercell (登録商標) 刺激)

Wnt経路および骨石灰化の試薬に基づく増強を評価するための好ましい方法の1つは、Flexercell (登録商標) システムを使用する二軸延伸刺激である。簡潔に述べると、骨細胞 (例えば、MC3T3細胞) は3,400 μ に曝露される。約50 μ ~ 約5,000 μ (およびこれらの間にあるあらゆる値) の負荷を、機械的負荷刺激の場合と同様に使用することができる。この範囲内のあらゆる刺激が、生理学的な骨負荷刺激と類似している。そのため5,000 μ を超える刺激は、病態生理学的な負荷となり、好ましくない。これらの細胞は、二軸延伸を行う前にWnt経路モジュレーター (例えばGSK阻害剤) に曝露することもできる。

20

【0111】

負荷単独、GSK-3阻害剤と併せて与えることによってアップレギュレートされる遺伝子としては、限定するものではないが、COX-2、eNOS、コネキシン43、およびSFRP1が挙げられる。Flexercell (登録商標) の研究からインビトロで得られる発現プロファイルは、インビボ荷重遺伝子発現プロファイル (すなわち、HBM TGマウスの脛骨からの細胞に対して実施したRNA分析であって、これらのマウスは4点システムを使用して骨負荷が与えられたRNA分析) と類似している。したがって、本明細書に開示される種々の細胞系を使用するこの機械的負荷アッセイ、または他の機械的負荷手段の使用は、古典的Wnt経路を調節、好ましくは活性化し、HBM表現型と類似している小分子、ペプチド、免疫グロブリンなどの同定に利用することができる。

30

【0112】

細胞に対して機械的応力刺激を誘発するこれらのインビトロ方法は、骨リモデリングと関連し、骨芽細胞および破骨細胞の増殖および破骨細胞吸収に必要な、細胞増殖およびアポトーシスの研究にも使用することができる。例えば、HBM細胞および影響を受けていない骨芽細胞を、バイオフィレックス (bioflex) 6ウェルプレート中に播種し、細胞が約60%コンフルエントになるまで10%のFBSを含有する増殖培地中で2~3日培養することができる。機械的荷重の24時間前に、この培地を、約2~約4%のFBSを含有する1mLの基本培地と交換する。次にこれらの細胞に、約50~約5,000 μ の負荷を約1~約5時間与える。

【0113】

負荷を与えた後、さらにある期間、細胞を培養する。続いて、多数の市販のアッセイまたは当分野において周知のアッセイ、例えば、限定するものではないが、[³H]-チミジンの混入、5-プロモ-2'-デオキシウリジン (BrdU) の混入、3-(4,5ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-トラゾニウム・アルト (trazolum alt) (MTS) アッセイ、TUNELアッセイ (すなわち、ターミナルデオキシヌクレオチジルトランスフェラーゼ dUTPニック末端ラベリング)、またはアネキシンVアッセイなどを使用して、細胞数および増殖を評価することができる。

40

【0114】

別のWnt経路アゴニストとしては、本明細書において検討される別のGSK-3阻害

50

化合物、天然のWnt経路リガンド、合成リガンド、小分子、ならびに周知のアンタゴニストのセレブラス(cerebrus)、SFRP、およびWIF(Wnt抑制因子)が挙げられ、前述のインビトロ骨負荷方法を使用して、骨負荷増強能力を分析することができる。周知のWnt経路アクチベーターとしては、Wnt1およびWnt3A、小分子Wntミメティック、LRP5と相互作用しWntシグナリングを活性化させるペプチドアプタマーが挙げられる。好ましいペプチドアプタマーとしては以下のものが挙げられる：

【0115】

【表6】

アプタマー アプタマー配列(アミノ末端からカルボキシ末端)

262 METDTLLLWVLLLWVPGSTGDGSMDSKIIHLTDDSFDTDVLKADGAI
LVDFWAEWCNPGNSGGGMIWEAWSCYACGTSGPCKMIAPILDEIAD
EYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALS
KGQLKEFLDANLA

10

【0116】

別の実施形態においては、骨の鉱物質除去(例えば、大理石骨病)が必要な個体の治療のためにWntアンタゴニストをスクリーニングしたり使用したりすることができる。Wntアンタゴニストとしては、限定するものではないが、Dkk1アンタゴニストが挙げられる。

20

【0117】

(4.2 細胞培養)

インビトロ荷重実験を実施することができる細胞としては、限定するものではないが、以下のヒト細胞系が挙げられる：U2OS細胞(ATCC)、MG-63細胞(ATCC)、SAOS-2細胞(ATCC)、HOS-TE85細胞(ATCC)、HOB03CE6細胞(Wyeth)、HOB01C1前骨細胞(Wyeth)、およびヒト初代骨芽細胞。さらに、あらゆる哺乳類系の細胞を培養することができる。研究に好ましい動物系としては、ラットおよびマウスの骨細胞が挙げられる。例えば、上記方法のいずれかで使用することができるマウス骨細胞としては、限定するものではないが、実施例において議論されるMC3T3細胞(ATCC)、および初代骨芽細胞、または上記ヒト細胞系と類似するあらゆる細胞系が挙げられる。インビトロで応力を引き起こすための、開示されているいずれかの方法を使用することができるラット細胞としては、限定するものではないが、UMR-106細胞(ATCC)、ROS17/2.8細胞、および初代骨芽細胞、または上記ヒト細胞系と類似するあらゆる細胞系が挙げられる。これらの細胞を培養する方法は当業者には周知である。例えば、IAN FRESHNEY, (CULTURE OF ANIMAL CELLS - A MANUAL OF BASIC TECHNIQUE) (4th ed.), Wiley-Liss, New York, 2000を参照されたい。

30

【0118】

本発明の別の態様においては、細胞は、骨から採取することができ、それらは骨芽細胞、破骨細胞、および骨細胞、ならびに前駆細胞および幹細胞を含むことができる。好ましい骨芽細胞ならびにそれらの前駆細胞および幹細胞としては、成熟骨芽細胞、前骨芽細胞(成熟および未成熟)、および間葉系幹細胞(間葉由来幹細胞、MDSCTとも呼ばれる)が挙げられる。

40

【0119】

本発明の別の態様においては、HBMおよび影響を受けていない個体から得たヒト細胞系を、本明細書において検討される骨負荷方法とあわせて使用することができる。これらの細胞系は、HBMおよび非トランスジェニックマウスに対して実施されるインビトロ荷重実験から同定される遺伝子導入を研究するために使用することができる。

50

【0120】

(4.3 TCF-ルシフェラーゼアッセイ)

TCF-ルシフェラーゼアッセイ系も、Wntシグナリング活性の監視に使用することができる。TCF-ルシフェラーゼアッセイのコンストラクトは、当分野で周知のように調製することができる。例えば、特にLRP5、LRP6、およびHBMなどのWnt経路タンパク質は、分泌のためのペプチドを標的とするコザック配列およびシグナル配列を使用してpcDNA3.1中で発現させることができる。

【0121】

コンストラクトが調製された後で、骨芽細胞およびHEK293細胞などの細胞をウェルプレート中に播種し、コンストラクトDNA、CMV-ガラクトシダーゼプラスミドDNA、およびTCF-ルシフェラーゼレポーターDNAをトランスフェクトする。次にこれらの細胞を溶解させ、-ガラクトシダーゼ活性およびルシフェラーゼ活性を調べ、Wnt経路相互作用タンパク質、または抗体などの他の分子がWntシグナリングに影響を与えるかどうかを決定する。さらなる詳細は、TCF-ルシフェラーゼコンストラクトを使用する方法に関する以下の実施例で示される。

【0122】

別の実施形態においては、Flexercell(登録商標)機械的細胞荷重システム(または、細胞に対して負荷を誘発するあらゆるインビトロ手段)を、TCF-ルシフェラーゼレポーターシステム、または他のレポーターシステムと併用して、Wnt経路に対する機械的荷重の影響を測定することができる。このような実験は、以下のように実施することができる。これらの実験の場合、MC3T3細胞(または本明細書において議論される他の同等の細胞)を前述のように播種し、3日間またはコンフルエントになるまで培養する。次に、培地を、BSAを含有する無血清培地、またはMEMを含有する低血清培地(1%FBS)のいずれかと交換する。続いて、この低血清培地または無血清培地上の細胞をさらに24時間インキュベートする。機械的負荷を与える約1時間前に、1つのプレートは、Wnt経路モジュレーター(例えば、GSK阻害剤、天然Wntリガンド、例えば、限定するものではないが、Wnt1およびWnt3A)を投与することで予備処理し、別のプレートは処理しない。Wntミメティックリガンド、小分子などのいずれかで予備処理した後、前述したように、細胞に約5時間機械的負荷(例えば、3,400 μ)を与える。負荷を与えた直後および負荷を与えてから24時間後に、前述のようにキアゲン(Qiagen)ミニキットを使用して負荷を与えたサンプルおよび負荷を与えていないコントロールサンプルからRNAを抽出する。

【0123】

続いて、処理による遺伝子発現の変化を観察するために各時点で、負荷識別特性セット遺伝子に対してリアルタイムPCR(または当分野において周知であるあらゆる好適なRNAアッセイ)を実施することができる。あるいは、当業者に周知の他の方法、または本明細書で議論の他の方法を使用してRNAを分析することができる。

【0124】

(5.アレイ)

骨リモデリングおよびその調節と関連するWnt経路の遺伝子プロファイルおよび識別特性を利用する方法の1つは、核酸アレイおよびタンパク質アレイを作製する形態である。続いて、これらのアレイをWnt経路およびおよびその骨リモデリングへの関与のさらなる研究に利用することができる。これらのアレイは、Wnt経路を介して骨リモデリングを調節する物質のスクリーニングに利用することもできる。

【0125】

(5.1 核酸アレイ)

核酸アレイは、当業者に周知のように作製される。このようなアレイの作製方法および使用方法は、例えば、P. Baldi et al., DNA MICROARRAYS AND GENE EXPRESSION: FROM EXPERIMENTS TO DATA ANALYSIS AND MODELING (Cambridge Un

10

20

30

40

50

iversity Press 2002); および DNA MICROARRAYS: A MOLECULAR CLONING MANUAL (David Bowtell および Joseph Sambrook, eds, Cold Spring Harbor Laboratory, 2002) に記載されている。

【0126】

好ましい核酸アレイは、表 1 ~ 5 または図 16 中のあらゆる遺伝子の Wnt シグナリング経路のメンバーに対応する核酸を含有する。例えば、このようなアレイは、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、またはそれを超える数（あるいはこれらの間の任意の整数値）の骨モデリングと関連する遺伝子を含有する。このような遺伝子としては、いずれかの表、実施例に記載される、あるいは図 16 に示される経路の一部の、あらゆる調節された遺伝子が挙げられる。これらの核酸は、骨荷重応答と関連する代表的な核酸である。

10

【0127】

別の実施形態においては、アレイは、Wnt 経路の骨リモデリング遺伝子、および例えば血清カルシウム調節、破骨細胞アポトーシス、骨芽細胞増殖などと関連する遺伝子を含まないように作製することができる。

【0128】

【表 7 A】

表 5

高骨量マイクロアレイまたはタンパク質/抗体アレイを開発するための遺伝子のリスト

遺伝子	説明	発現場所	
ACPS5	酸性ホスファターゼ5、酒石酸塩耐性	骨および大腸の癌	
CCND1	サイクリン D1(PRAD1: 副甲状腺腺腫症 1)	HBM 骨	
CNK1	v-erb-b2 赤芽球性白血病ウイルス癌遺伝子 ホモログ 3(トリ)	骨および大腸の癌	10
COL1A1	コラーゲン、1型、 $\alpha 1$	HBM 骨	
COL6A3	コラーゲン、VI型、 $\alpha 3$	HBM 骨	
CTGF	結合組織増殖因子	HBM 骨	
CTSK	カテプシン K(ピクノディスオストーシス)	HBM 骨	
CX3CR1	ケモカイン(C-X3-C)受容体 1	骨の炎症	
DELTEX	deltex ホモログ 2(Drosophila)、EphB2	骨および大腸の癌	
EPHB2	KSR 様コネクタエンハンサー(ras の Drosophila キナーゼサブレッサー)	骨および大腸の癌	20
ERBB3	GRO1 癌遺伝子(メラノーマ増殖刺激性、 α)	骨および大腸の癌	
FAP	繊維芽細胞活性化タンパク質, α	骨および大腸の癌	
FBLN1	フィブリン(fibulin)1	HBM 骨	
FGF-2	線維芽細胞増殖因子 2(塩基性)	骨の炎症	
FGF-7	線維芽細胞増殖因子 7(ケラチノサイト増 殖因子)	骨の炎症	
FOS	fos FBJマウス骨肉腫ウイルス癌遺伝子ホ モログ	骨および大腸の 癌/負荷感受性遺伝子	30
FZD2	frizzled(Drosophila)ホモログ 2	HBM 骨	
GADD45A	増殖抑制および DNA 損傷誘発, α	HBM 骨	
GAS6	増殖抑制特異的 6	HBM 骨	
GJA1	ギャップ結合膜ンパク質 $\alpha 1$ 、43kD(コネキ シン 43)	HBM 骨	
IGF2	インスリン様増殖因子 2(ソマトメジン A)	骨の炎症	
IGF2R	インスリン様増殖因子 2 受容体	骨の炎症	
IGFBP6	インスリン様増殖因子結合タンパク質 6	HBM 骨	40
IL-6	インターロイキン 6(インターフェロン, β 2)	骨の炎症	

【表 7 B】

遺伝子	説明	発現場所	
ITGB5	インテグリン, $\beta 5$	HBM 骨	
ITGBL1	インテグリン, β 様 1(EGF 様繰り返し領域を有する)	HBM 骨	
JUN	jun トリ肉腫ウイルス 17 癌遺伝子ホモログ	骨および大腸の癌/負荷感受性遺伝子	
LOX	リシルオキシダーゼ	HBM 骨	10
LRP5	低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質 5	HBM 骨	
LRP6	低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質 6	HBM 骨	
LSP1	リンパ球特異的タンパク質 1	骨の炎症	
MAPKAPK2	マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ活性化タンパク質キナーゼ 2	破骨細胞活性	
MCC	結腸直腸癌における変異	骨および大腸の癌	20
MET	met 癌原遺伝子(肝細胞増殖因子受容体)	HBM 骨	
MYBL1	v-myb 骨髄芽球症ウイルス癌遺伝子ホモログ(トリ)様 1	HBM 骨	
MYC	v-myc トリ骨髄球腫症ウイルス癌遺伝子ホモログ	骨および大腸の癌	
Enos	酸化窒素シンターゼ 3(内皮細胞)	負荷応答遺伝子	
OSMR	オンコスタチン M 受容体	HBM 骨	
PDGFRA	血小板由来増殖因子受容体、 α ポリペプチド	HBM 骨	30
PTGS2/COX-2	プロスタグランジン-エンドペルオキシドシンターゼ 2(プロスタグランジン G/H シンターゼおよびシクロオキシゲナーゼ)	負荷応答遺伝子	
SFRP1	分泌型 frizzled 関連タンパク質 1	HBM 骨	
SFRP4	分泌型 frizzled 関連タンパク質 4	HBM 骨	
SPARC	sparc/オステオネクチン、cwcv および kazal 様領域プロテオグリカン(テストイカン(testican))	骨の炎症	40
STAT1	転写 1 のシグナルトランスデューサーおよびアクチベーター、91kD	骨の炎症	
TGFBR2	トランスフォーミング成長因子、 β 受容体 II(70~80kD)	骨の炎症	

【表 7 C】

遺伝子	説明	発現場所	
THBS1	トロンボスポンジン 1	HBM 骨	
TIMP2	メタロプロテイナーゼの組織阻害剤 2	HBM 骨	
TIMP3	メタロプロテイナーゼの組織阻害剤 3(ソーズビー基底部ジストロフィー(Sorsby fundus dystrophy)、偽炎症性)	HBM 骨	
TNF	腫瘍壊死因子(TNF スーパーファミリー、メンバー2)	破骨細胞活性	10
TNFRSF10B	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー10b	骨の炎症	
TNFRSF11B/OPG	腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリー、メンバー11b(オステオプロテゲリン)	破骨細胞活性	
TNFSF11/RANKL	腫瘍壊死因子(リガンド)スーパーファミリー、メンバー11	破骨細胞活性	
UNK_D83402	プロスタグランジン I2(プロスタサイクリン)シンターゼ	HBM 骨	20
VCAM1	血管細胞接着分子 1	骨の炎症	
WISP2	WNT1 誘導シグナリング経路タンパク質 2	HBM 骨	
WNT10B	ウイングレス型 MMTV 統合部位ファミリー、メンバー10B	骨および大腸の癌	
WNT6	ウイングレス型 MMTV 統合部位ファミリー、メンバー6	HBM 骨	

30

【 0 1 2 9 】

好ましくは、核酸アレイは、「HBM骨」中での発現が観察される遺伝子に対応する2つ以上の配列を含有する。このようなアレイは、少なくとも2、3、4、5、10、15、20、25、30、またはそれを超える数(およびこれらの間の任意の整数値)の、表中、実施例中、または図16中に記載される骨負荷に対する応答でアップレギュレートまたはダウンレギュレートする配列を含むことができる。同様に、少なくとも2、3、4、5、10、15、20、25、30、またはそれを超える数(およびこれらの間の任意の整数値)の、表5に記載されるタンパク質、または本明細書において検討されるあらゆる経路に關与するあらゆるタンパク質に結合するタンパク質、ペプチド、および/または免疫グロブリンを含む高骨量に特異的なタンパク質/抗体アレイを作製することもできる。

40

【 0 1 3 0 】

5.1.2 DNAマイクロアレイの構成

多くの場合、ハイブリダイゼーションの前に核酸サンプルを増幅することが望ましい。好適な増幅方法としては、限定するものではないが、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)(Innis et al., PCR PROTOCOLS. A GUIDE TO METHODS AND APPLICATION. ACADEMIC PRESS, Inc. San Diego, (1990))、リガーゼ連鎖反応(LCR)Wu et al., Genomics, 4:560(1989); Landegren et al., Science, 241:1077(1988); および Barringer et al., Gene, 89:117(1990)を参照されたい)、転写増幅(Kwoh e

50

t al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173 (1989)、および self-sustained sequence replication (Guatelli) et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:1874 (1990) が挙げられる。

【0131】

好ましい実施形態においては、ハイブリッド形成した核酸は、サンプル核酸に取り付けられた1つ以上の標識を検出することによって検出される。これらの標識は、当分野で周知のあらゆる多数の手段によって組み込むことができる。しかし、好ましくは、サンプル核酸の調製における増幅ステップ中に同時に標識が組み込まれる。したがって、例えば、標識されたプライマーまたは標識されたヌクレオチドを使用するポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって、標識された増幅産物が得られる。好ましい実施形態においては、前述のような転写増幅に、標識されたヌクレオチド (例えば、フルオレセイン標識された UTP および / または CTP) を使用することによって、転写された核酸中に標識が組み込まれる。

10

【0132】

あるいは、元の核酸サンプル (例えば、mRNA、ポリA mRNA、cDNA など) または、増幅終了後の増幅産物に直接標識を加えることもできる。核酸に標識を取り付ける手段は当業者に周知であり、そのような手段としては、例えば、核酸を含有する反応混合物にキナーゼを添加し、続いてサンプル核酸を標識 (例えば蛍光体) と結合させる核酸リンカーを取り付ける (連結) による、ニックトランスレーションまたは末端標識 (例えば、標識したRNAの使用) が挙げられる。

20

【0133】

本発明において使用すると好適である検出可能な標識としては、分光学的、光化学的、生化学的、免疫化学的、電気的、光学的、または化学的な手段によって検出可能なあらゆる組成物が挙げられる。本発明において有用な標識としては、標識されたストレプトアビジン複合体で染色したビオチン、磁気ビーズ (例えば、Dynabeads (商標))、蛍光色素 (例えば、フルオレセイン、テキサスレッド (Texas red)、ローダミン、緑色蛍光タンパク質など)、放射性標識 (例えば、³H、¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C、または³²P)、酵素 (例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP)、アルカリホスファターゼ、および ELISA において一般に使用される他の酵素)、および熱量測定標識、例えばコロイド金、あるいは着色ガラスまたはプラスチック (例えば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど) のビーズが挙げられる。このような標識の使用を教示する特許としては、米国特許第 3,817,837 号明細書、第 3,850,752 号明細書、第 3,939,350 号明細書、第 3,996,345 号明細書、第 4,277,437 号明細書、第 4,275,149 号明細書、および第 4,366,241 号明細書が挙げられる。

30

【0134】

他の遺伝子、例えば、COX-2 などに由来する参照配列は、全長ゲノムから、個別の染色体、エピソーム、遺伝子、遺伝子の成分、例えばエキソンまたは調節配列、さらには数個のヌクレオチドまでの広範囲で変えることができる。約 2、5、10、20、50、100、500、1000、5,000、または 10,000、20,000、または 100,000 の間の数のヌクレオチド (およびこれらの間の任意の整数値) の参照配列が一般的である。場合によっては、配列の特定の領域のみが対象となる。

40

【0135】

本発明の方法は、配列が既知である1つ以上の選択された参照配列 (例えば、eNOS、COX-2、Jun、Fox、コネキシン43、SFRP、または本明細書において議論されるあらゆる他の遺伝子) に対して相補性であるプローブを含むオリゴヌクレオチドアレイを使用する。典型的には、これらのアレイは、固体表面上の高密度アレイ (「オンチップDNA」) 中に固定され、このようなものは、例えば米国特許第 5,143,854 号明細書および国際公開第 90/15070 号パンフレット、国際公開第 92/100

50

92号パンフレットおよび国際公開第95/11995号パンフレットに開示されており、これらそれぞれが参照により本明細書に組み入れられる。

【0136】

チップ上のオリゴヌクレオチドプローブアレイの配列および表示を行い、それによって標的核酸に関して得られるハイブリダイゼーションパターンおよび配列の情報を最大限にするために、種々の方法を使用することができる。代表的な表示および配列の方法が、国際公開第94/12305号パンフレットに記載されており、この記載内容が参照により本明細書に組み入れられる。より詳細に説明する目的で、基本的方法の概要を以下に示す。

【0137】

基本的なタイリング方法によって、標的配列を分析するための固定化されたプローブのアレイが得られ、これによって1つ以上の選択された参照配列への高度な配列の同定が行われる。この方法を、4つのプローブセットに分割されたアレイの場合で説明するが、1つのプローブセット(すなわち、前述のように参照配列に対して相補的なプローブセット)から満足できる結果が得られることは明らかである。

【0138】

第1のプローブセットは、選択された参照配列と完全に相補的である複数のプローブを含む。通常、完全な相補性は、プローブの全長にわたって存在する。しかし、参照配列との相補性が失われた先導配列または後続配列を側部に有する完全な相補性の1つ以上のセグメントを有するプローブを使用することもできる。相補的なセグメント内で、第1のプローブセット中の各プローブは、参照配列中のヌクレオチドに対応する少なくとも1つの呼び掛け位置(interrogation position)を有する。すなわち、プローブと参照配列とが2つの間で相補性が最大限となるようアラインメントする場合、呼び掛け位置が参照配列中の対応するヌクレオチドとアラインメントする。1つのプローブが2つ以上の呼び掛け位置を有する場合、そのそれぞれが、参照配列中のそれぞれのヌクレオチドに対応する。第1のプローブセット中の特定のプローブ中の呼び掛け位置および対応するヌクレオチドの区別は、第1のセット中のプローブを調べることによって単純に行えるものではない。明らかのように、呼び掛け位置および対応するヌクレオチドは、第1のプローブセット中のプローブの構造を、別のプローブセットに属する対応するプローブと比較することによって画定される。

【0139】

基本的に、プローブは、参照配列と相補的なセグメント中の各位置において呼び掛け位置を有することができる。場合によっては、呼び掛け位置は、相補性のセグメントの末端から離れて配置されると、より正確なデータが得られる。例えば、典型的には長さ「x」の相補性のセグメントを有するプローブは、「x-2」個を超える呼び掛け位置を含まない。プローブは典型的には9~21ヌクレオチドであり、通常全てのプローブが相補的であるので、プローブは典型的には1~19個の呼び掛け位置を有する。多くの場合プローブは、プローブの中央またはその付近に1つの呼び掛け位置を含む。

【0140】

説明の目的で、第1のセットの各プローブの場合、3つの別のプローブセットに属する最大3つの対応するプローブが存在する。したがって、参照配列中の対象の各ヌクレオチドに対応する4つのプローブが存在する。4つの対応するプローブのそれぞれが、対象のヌクレオチドとアラインメントする呼び掛け位置を有する。通常、3つの別のプローブセットに属するプローブは、1つの例外を除けば第1のプローブセットに属する対応するプローブと同一である。この例外とは、4つのプローブセットに属する4つの対応するプローブのそれぞれで同じ位置にある少なくとも1つ(多くの場合1つのみ)の呼び掛け位置が、4つのプローブセット中で異なるヌクレオチドで占有されていることである。例えば、参照配列中のアデニン(A)ヌクレオチドの場合、第1のプローブセットに属する対応するプローブは、チミン(T)で占められた呼び掛け位置を有し、別の3つのプローブセットに属する対応するプローブは、アデニン(A)、シトシン(C)、またはグアニン(G)

10

20

30

40

50

G)によって占められた呼び掛け位置をそれぞれ有し、各プローブ中で異なるヌクレオチドを有する。当然ながら、第1のプローブセットに属するプローブが、参照配列に対する相補性が失われた後続配列またはランキング配列を含む場合、これらの配列が他の3つのセットに属する対応するプローブ中に存在する必要はない。同様に、別の3つのセットに属する対応するプローブは、第1のプローブセットに属する対応するプローブ中には存在しない、相補性のセグメントの外側に先導配列または後続配列を含むことができる。場合によっては、別の3つのプローブセットに属するプローブが、第1のプローブセットに属する対応するプローブの相補的な全セグメントの連続配列と同一である(呼び掛け位置を除く)。この場合、この配列は、呼び掛け位置を含み、通常は、相補性のセグメントの末端から一方または両方の末端ヌクレオチドが脱落したことが全長プローブと異なる。すなわち、第1のプローブセットに属するプローブが、長さ「n」の相補性のセグメントを有する場合、他のセットに属する対応するプローブは、通常、少なくとも長さが「n-2」であるセグメントの配列を含む。したがって、この配列は、通常少なくとも3、4、7、9、15、21、または25ヌクレオチドの長さであり(および任意のこれらの間の整数値)であり、最も典型的には、9~21ヌクレオチドの範囲である。呼び掛け位置において変異させた参照配列の変異体の方が、参照配列よりも検出可能に強くハイブリダイズするプローブが得られるように、この配列は十分に長いか、または十分なハイブリダイゼーション条件となるべきである。

10

【0141】

プローブは、オリゴデオキシリボヌクレオチド(オリゴDNA)またはオリゴリボヌクレオチド(オリゴRNA)、あるいは相補的な塩基対形成によって標的核酸配列とハイブリダイズ可能なこれらのポリマーのあらゆる修飾された形態であってよい。相補的な塩基対形成とは、配列特異的な塩基対形成を意味し、これには、例えば、ワトソン-クリック型塩基対形成、およびフーグスティーン型塩基対形成などの他の形態の塩基対形成が含まれる。修飾された形態としては、2'-O-メチルオリゴリボヌクレオチド、および、オリゴデオキシリボヌクレオチドが、リン酸ジエステル結合以外のペプチド結合を介して結合している、いわゆるPNAが挙げられる。プローブは、あらゆる結合によって基板に取り付けることができる(例えば、3'-、5'-、または塩基を介して)。3'の結合がより一般的であるが、この方向は、オリゴヌクレオチドの固相合成に好ましい化学物質に適合することが理由である。

20

30

【0142】

第1のプローブセット中のプローブ数(および結果として、別のプローブセット中のプローブ数)は、参照配列の長さ、参照配列中の対象となるヌクレオチドの数、および呼び掛け位置の数に依存する。一般に、参照配列中の対象となる各ヌクレオチドは、プローブの4つのセットにおいて同じ呼び掛け位置が必要となる。

【0143】

ある参照配列においては、全てのヌクレオチドが対象となる。別の参照配列においては、変異体(例えば、変異または多型)が集中している部分のみが対象となる。別の参照配列においては、特定の変異または多型およびすぐ近傍のヌクレオチドのみが対象となる。通常、第1のプローブセットは、少なくとも1つのヌクレオチド(例えば、点変異を表す)およびすぐ近傍の1つのヌクレオチドとに対応するよう選択された呼び掛け位置を有する。通常、第1のセット中のプローブは、少なくとも3、10、50、100、1000、20,000、100,000、1,000,000、10,000,000(およびその間の任意の整数値)、またはそれを超える連続ヌクレオチドに対応する呼び掛け位置を有する。プローブは通常、参照配列中のヌクレオチドの少なくとも5%、10%、30%、50%、75%、90%、99%、または場合により100%(およびその間の任意の整数値)に対応する呼び掛け位置を有する。多くの場合、第1のプローブセット中のプローブは、参照配列全体にわたっており、参照配列に対して互いに重なり合っている。例えば、ある共通の配置において、第1のプローブセット中の各プローブが同じセットの別のプローブと異なるのは、参照配列に対して相補的な3'塩基の脱落、および参照配列に

40

50

対して相補的な5'塩基の獲得によるものである。

【0144】

チップ上のプローブ数を非常に大きくすることができる(例えば、 $10^5 \sim 10^6$ 個)。しかし、多くの場合、所与の長さのプローブの総数の比較的小さな比率(すなわち、約50%未満、25%未満、10%未満、5%未満、または1%未満)が、特定のタイリング方法、この場合は骨負荷遺伝子発現プロファイルおよび骨負荷遺伝子を増強させる発現プロファイルを反映するタイリング方法、を実施する場合に選択される。例えば、オクトマー(octomer)プローブの完全なセットは65,536個のプローブを含み、例えば、本発明のアレイは典型的には32,768個未満のオクトマープローブを有する。10量体プローブの完全なアレイは1,048,576個のプローブを含み、例えば、本発明のアレイは典型的には約500,000個未満の10量体プローブを有する。多くの場合アレイは、25、50、または100個のプローブの下限を有し、最大で 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} などのプローブ数を有する。アレイは、プローブを支持体に取り付けるためのリンカーなどの、プローブ以外の他の成分を有することができる。

10

【0145】

所与の長さの全ての可能なプローブの集団のみを使用する利点の一部として、以下のことが挙げられる:(i)ハイブリダイゼーションが起こっても起こらなくても、アレイ中の各位置から得られる情報量が多いこと、(ii)非特異的ハイブリダイゼーションが最小限となること、(iii)特に、既知の標準物質のハイブリダイゼーションパターンを参照する場合に、直接的にハイブリダイゼーションの差を配列の差と関連づけられること、および(iv)高解像度フォトリソグラフィを使用して、合成中に各プローブを独立にアドレス指定ができるため、あらゆる配列に合わせてアレイの設計および最適が行えること。例えば、任意のプローブの長さを、他と独立に変えることができる。

20

【0146】

通常、プローブのアレイは、前述のように縦横の列をなして配置されるが、このようなチップ上のプローブの物理的配置は重要ではない。アレイ中の各プローブの空間的位置が既知であれば、プローブからのデータを収集し処理して、チップ上のプローブの物理的配置とは無関係に標的の配列を求めることができる。データを処理する場合、チップ上のプローブの物理的配置がどのようなものであっても、それぞれのプローブから得られるハイブリダイゼーション信号を、後のデータ整理に望ましいあらゆる概念上のアレイにリアサートすることができる。

30

【0147】

ある範囲の長さのプローブを、チップ中に使用することができる。前述したように、プローブは、単に相補的セグメントからなっていないてもよいし、あるいは、フランキングセグメント、後続セグメント、および/または介在セグメントが近接する1つ以上の相補的セグメントを有することもできる。後者の場合では、相補的セグメントの全長が、プローブの長さよりも重要となる。機能的な面言えば、プローブの呼び掛け位置に対応するヌクレオチドにおける一塩基変位を含む参照配列の変異体よりも、参照配列の方に、プローブがより強く検出可能にハイブリダイズするように、第1のプローブセットの相補的セグメントが十分な長さを有するべきである。同様に、参照配列よりも、プローブの呼び掛け位置に対応するヌクレオチドにおける一ヌクレオチド置換を有する参照配列の変異体の方に、プローブがより強く検出可能にハイブリダイズするように、別のプローブセットに属する対応するプローブ中の相補的セグメントが十分な長さを有するべきである。通常、プローブは、少なくとも3ヌクレオチドの長さを有する1つの相補的なセグメントを有し、より一般的には少なくとも5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、または30、あるいはそれを超える数の塩基が参照配列に対して完全な相補性を示す(場合により、プローブセットに依存する呼び掛け位置は除く)。

40

【0148】

50

あるチップにおいては、全てのプローブが同じ長さである。別のチップでは、複数のグループのプローブセットが使用され、この場合、1つのグループ内でプローブは同じ大きさであるが、異なるグループ間では大きさが異なる。例えば、あるチップは、全てのプローブが15量体である前述のような4セットのプローブを含む第1のグループとともに、全てのプローブが20量体である4セットのプローブを含む第2のグループを有する。当然ながら、さらに別のプローブのグループを加えることができる。したがって、あるチップは、例えば、15量体、20量体、26量体、および30量体の大きさを有する4グループのプローブを含む。別のチップは、4つのプローブの同じグループ内で異なる大きさのプローブを有する。これらのチップにおいて、第1のセット中のプローブが、互いに独立に長さが異なってもよい。他のセット中のプローブは通常、第1のセットに属する同じ列にあるプローブと同じ長さである。しかし、場合によっては、4つのレーン中の同じ列の位置で、異なる長さのプローブを含むことができる。長さの異なるプローブは、反応のpH、温度、およびイオン条件におけるオリゴヌクレオチドプローブのハイブリダイゼーション安定性に依存するプローブからのハイブリダイゼーション信号を均一にするために含まれる。

10

【0149】

標的配列と完全に一致するプローブと、標的配列と一塩基が異なるプローブとの間を区別するために、プローブの長さが重要となり得る。このような区別は短いプローブの方が通常は行いやすい。通常はプローブが短いほど、二次構造の形成も起こりにくい。しかし、結合する標的配列の絶対量、したがって信号の絶対量は、プローブが大きいほど大きくなる。これらの競合する問題の間で最適となるプローブ長さは、例えば、標的DNA配列の特定の領域のGC含有率、二次構造、合成効率、およびクロスハイブリダイゼーションに依存して変動しうる。標的の一部の領域においては、ハイブリダイゼーション条件に依存して、短いプローブ（例えば11量体）からは、より長いプローブ（例えば19量体）からは得られない情報が得られる場合があり、この逆の場合もある。最大の配列情報は、前述のようにチップ上の異なる大きさのプローブのグループをいくつか含むことによって実現することができる。しかし、標的配列の多くの領域では、このような方法では、重複情報が得られ、すなわち、異なるグループのプローブから複数回同じ配列が読み取られる。標的配列の特定の領域における読み取り可能な配列を最大化するように大きさが選択された異なる大きさのプローブの1つのグループから、同等の情報を得ることができる。

20

30

【0150】

(5.2 タンパク質アレイ)

2つの主要な種類またはタンパク質アレイは、一次相アレイ（すなわち、抗体、抗体フラグメント、免疫グロブリン、またはペプチドが基体に固定される）および逆相アレイ（すなわち、細胞溶解物が基体に固定され、続いて抗体などを使用してスクリーニングが行われる）である。これらのタンパク質アレイは、Wnt経路を調節する物質、Wnt経路活性を増加させる物質、異なる刺激に対する応答における骨タンパク質発現、異なる刺激に対する応答に骨で発現される別のタンパク質の決定などのための迅速なスクリーニングに使用することができる。

【0151】

(5.2.1 一次相アレイ)

好ましい方法の1つは、本明細書のいずれかの表に記載される遺伝子のタンパク質を認識し結合する抗体、抗体フラグメント、免疫グロブリン、あるいは本明細書のいずれかの表に記載される遺伝子のタンパク質を認識し結合するペプチドを1種類以上（好ましくは2種類以上）含む一次相タンパク質アレイである。したがって、一態様においては、対象となるタンパク質/ポリペプチドに対して免疫原性活性を有する抗体、それらの免疫原性フラグメント、または免疫グロブリンポリペプチド、あるいは対象となるタンパク質/ポリペプチドを認識して結合することができる他のペプチド、あるいはそれらの組み合わせを、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれを超える数で、好適な基体に付着させたアレイが考慮される。次に、好適な条件下で細胞溶解物を一次相アレイと接

40

50

触させ、リガンドが結合する抗体が、当分野において周知の方法で検出される。例えば、MacBeath, Nat. Genet. Suppl. 32: 526-32 (2002)を参照されたい。

【0152】

一次相アレイ（タンパク質検出マイクロアレイとも呼ばれる）は、固体支持体上に高い空間密度で配置された多数の異なるアフィニティー試薬を含むことができる。各試薬は、血清、細胞培養液、または細胞溶解物などの複合混合物から、その標的とするタンパク質またはポリペプチドを捕捉する。捕捉されたタンパク質は、次に、検出および定量が行われる。一次相アレイは、サンドイッチアレイ（すなわち、捕捉される免疫グロブリンが、固体支持体上に固定化されたペプチドであり、結合したタンパク質が、第2の標識された検出抗体を使用して検出される）、または抗原捕捉アレイ（すなわち、タンパク質が、固定化された抗体によって同様に捕捉されるが、捕捉されたタンパク質は、それらがアレイに適用される前に、タンパク質複合混合物の化学標識を行うことによって、通常は直接検出される）の形態であってよい。検討する場合には、MacBeath, (2002)およびそれに記載される参考文献を参照されたい。

10

【0153】

好ましい実施形態においては、各パッチ上で固定化されたタンパク質が、抗体または抗体フラグメントである。アレイの抗体または抗体フラグメントは、場合によっては、1本鎖Fv (scFv)、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメント、Fvフラグメント、dsFvダイアポディ、Fdフラグメント、全長抗原特異的ポリクローナル抗体、または全長モノクローナル抗体であってよい。好ましい実施形態においては、アレイのパッチ上に固定化されたタンパク質が、モノクローナル抗体、Fabフラグメント、またはscFvである。

20

【0154】

これらの抗体または抗体フラグメントは、(1)骨負荷に対する応答でアップレギュレートまたはダウンレギュレートするタンパク質、(2)Wnt経路タンパク質、(3)Wnt経路アゴニストまたはアンタゴニストの添加による応答でアップレギュレートまたはダウンレギュレートするWnt経路タンパク質、(4)HBM TG動物またはHBM細胞系における骨負荷刺激および/またはアゴニスト/アンタゴニスト刺激に対する応答で発現されるタンパク質、あるいは(5)アップレギュレートおよびダウンレギュレートする遺伝子/タンパク質として本明細書における表に記載されるタンパク質のいずれかを認識し結合する。より好ましくは、これらの抗体またはそのフラグメントは、増強したWnt経路活性に対する応答でアップレギュレートまたはダウンレギュレートするタンパク質を認識する抗体またはそのフラグメントである。ダウンレギュレートしたタンパク質に対する抗体は、好ましくは、ダウンレギュレートしたタンパク質の存在を検出することができるか、または、例えば、ホスホリリレーション(phosphorylation)パターンの差を検出し、それによってタンパク質の活性部位を検出することができる(例えばGSK-3のリン酸化パターン)かのいずれかである。

30

【0155】

好ましくは、これらの免疫グロブリンアレイは、本明細書に記載される種々の条件下(例えば、負荷の適用、負荷を増強する物質など)でアップレギュレートまたはダウンレギュレートする、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、および100、またはそれを超える数(これらの間の任意の整数値)のタンパク質を認識する免疫グロブリンを含む。したがって、このようなアレイは、細胞溶解物、細胞培養液、または血清、あるいは細胞分画(例えば、細胞核と細胞質の分画)から検出される各タンパク質を認識する、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、またはそれを超える数の免疫グロブリンを含むことができる。本明細書において検討されるような、抗体またはそのフラグメント、免疫グロブリン、あるいはペプチドまたは他の部分を認識するタンパク質は、本明細書において検討の遺伝子発現プロファイルまたは遺伝子発現識別特性で挙げられているあらゆるタンパク質の認識または結合が

40

50

最適に行われる。これらの抗体は、ポリ-L-リジンまたは他のリンカー物質を使用してアレイ基体上にスポットすることができる。詳細については、Sreekumar et al., Cancer Res. 61:7585-93 (2001)を参照されたい。抗体マイクロアレイは当分野において周知である。例えば、サンドイッチマイクロアレイ方式が使用されているSilzel et al., (Clin. Chem. 44:2036-43 (1998))を参照されたい。

【0156】

抗体およびペプチドのアレイは、典型的にはインクジェットプリンター技術を使用して作製され、プリンターが、モノクローナル抗体を基体上にスポットすることによって、規定量（例えば200 μ M）のスポットが形成される。あるいは、抗体アレイは、96ウェルポリスチレンマイクロタイタープレートを使用して3 \times 3のパターンに形成して、細胞中のタンパク質の産生を監視することができる。アレイをスポットするための別の方法に関しては、例えば、Moody et al., Biotechniques 31:186-194 (2001); Huang et al., Anal. Biochem. 294:55-62 (2001); Wiese et al., Clin. Chem. 47:1451-7 (2001); Jenison et al., Clin. Chem. 47:1894-1900 (2001); Tam et al., J. Immunol. Methods 261:157-165 (2002); および Schweitzer et al., Nature Biotechnol. 20:359-65 (2002)を参照されたい。

10

20

【0157】

(5.2.2 逆相アレイ)

別の側面においては、逆相アレイ（直接型アレイとも呼ばれる）の使用も考慮され、この場合、骨細胞の溶解物を好適なセル表面に付着させ、続いて、検出可能なタグと結合した免疫グロブリンまたは他の物質を使用してタンパク質の存在の有無をスクリーニングする。骨細胞は、細胞培養由来のものであってもよいしあるいはHBM、ヒトLRP5、ヒトLRP6を発現するトランスジェニックマウス、LRP5およびLRP6（両方を単独および併用）の遺伝子の同じ動物のノックアウトおよびノックインの複合体、または非TG同腹仔などのマウスに由来するものであってもよい。他の細胞系は、HBMタンパク質、LRP5、LRP6、または他のWnt経路タンパク質を発現する核酸をトランスフェクトした、一過性にトランスフェクトした細胞系であってよい。逆相溶解物アレイは、スクリーニングすることができる基体上の溶解物の小型化されたドットプロットである。基体1つ当たりのスポット数は、溶解物がスクリーニングされる方法に依存して変動する。さらなる議論については、例えばSreekumar et al., Cancer Res. 61:7585-93 (2001)を参照されたい。

30

【0158】

溶解物が基体に固定された後、抗体、RNA（そのタンパク質がRNAと結合することが知られている場合）、DNA（そのタンパク質がDNAと結合することが知られている場合）、ペプチド（そのタンパク質と相互作用することが知られているもの）、別のタンパク質などの検出可能なリガンドを使用してスクリーニングを行うことができ、これらの各部分には、検出可能な標識を取り付けることができる。

40

【0159】

本発明の別の側面においては、上記種類の細胞から得られた溶解物の組み合わせを、アレイ基体上に配置することができる。例えば、骨負荷刺激および/またはWnt経路モジュレーターが与えられた動物から得た溶解物を、細胞培養から得られた溶解物と混合することができる。細胞培養溶解物は、機械的負荷を与えた細胞のもので、与えていない細胞のものでよい。これは、Wnt経路モジュレーターおよび負荷を与えた細胞培養に由来するものであってもよいし、細胞溶解物のあらゆる組み合わせであってよい。このようなアレイは、負荷に対する応答で発現するタンパク質、および/またはWnt経路を調節しそれによって骨リモデリングも調節する候補となる化合物を迅速にスクリーニングす

50

るために使用することができる。

【0160】

(5.2.3 タンパク質アレイのための装置)

いずれの種類のアレイの場合も、放射性同位体、発色団、蛍光体、または化学発光種などの検出可能な標識を、検出部分(例えば、二次検出抗体、ペプチドなど)に取り付けることができる。次に、この検出部分を、マイクロチップとともに好適な条件下でインキュベートして、一次抗体または抗原と結合させることができる。

【0161】

過剰のプローブタンパク質を洗い流した後で、チップ表面の標識からの信号を分析する。信号が検出されることは、標識されたタンパク質と、タンパク質ライブラリの1つ以上の特有のメンバーとの相互作用を意味する。次に、プローブタンパク質または他のプローブ部分と結合することができるタンパク質の同定は、チップ上のスポットの位置(一次アレイを使用する場合)から行うことができるし、あるいは、逆相アレイを使用する場合は検出可能な標識および関連する抗体によって行うことができる。タンパク質-タンパク質、タンパク質-リガンド、またはタンパク質-核酸の相互作用を検出するために他の方法を使用することもできる。例えば、タンパク質アレイの形成に使用される固体表面が金属である場合は、表面プラズモン共鳴(SPR)を使用して表面における質量変化を検出することができる。金表面が使用され、オリゴヌクレオチド捕捉プローブ上の反応性部分がチオール基(アミノ基ではなく)である場合は、捕捉プローブを取り付けるために金表面を官能化する必要がない。質量分析(特にMALDI-TOF)を使用して、タンパク質ライブラリの特有のメンバーと結合する化学種を分析することもできる。

【0162】

別の実施形態においては、本発明は、基体上に分離した既知の領域で配置した複数のパッチを含むタンパク質をコートした基体(例えば抗体をコートした基体)も提供し(一次アレイを使用する場合)、この場合、各パッチは、種々の既知の配列で固定化したタンパク質を含み、各パッチは、隣接するパッチから約50nm~約500μm離れている。好ましい実施形態においては、タンパク質がコートされた基体は9個以上のパッチを含む。

【0163】

基体上に分離した既知の領域で配置した複数のパッチを含むタンパク質をコートした基体を含み、各パッチは、種々の既知の配列で固定化したタンパク質を含み、各パッチは、隣接するパッチから約50nm~約500μm離れている、バイオセンサー、微小測定装置、および医療機器も考慮される。

【0164】

あるいは、異なる抗体を使用してスクリーニングするために、異なるパッチを溶解物の領域に設計することもでき、各パッチは、スクリーニングされる対象の異なる細胞溶解物(例えば、コントロール、インビボサンプル、インビトロサンプル、骨負荷、既知のWnt経路アゴニストを使用した骨負荷など)のそれぞれの1つであってよい。したがって、1つのパッチが、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれを超える数の異なる実験の組の細胞溶解物を有することができる、アレイ基体1つ当たりに複数のパッチを有することができる。

【0165】

一実施形態においては、基体上に分離した既知の領域で配置され、各パッチは、種々の既知の配列で固定化したタンパク質を含み、各パッチは、隣接するパッチから約50nm~約500μm離れている、複数のパッチ、好ましくは9個以上のパッチを、タンパク質のアレイが含む。好ましい実施形態においては、これらのパッチは、隣接するパッチから約200nm~約500μm離れている。

【0166】

アレイのある変形では、各パッチの直径が、パッチ間の距離に比例する。例えば、各パッチの面積は、約100nm²~約40,000μm²となることができる。好ましくは各パッチが約1μm²~約10,000μm²の面積を有する。

10

20

30

40

50

【0167】

アレイの一実施形態においては、アレイは、全面積約 1 cm^2 以内で 9 個以上のパッチを含む。好ましい実施形態においては、アレイは、全面積約 1 cm^2 以内で 100 個以上のパッチを含む。別の実施形態においては、アレイは、全面積約 1 cm^2 以内で 10^3 個以上のパッチを含む。

【0168】

アレイの一実施形態においては、あるパッチ上に固定化されたタンパク質が、同じアレイの第 2 のパッチ上に固定化されたタンパク質と異なる。例えば、GSK-3 のあるリン酸化体に対する抗体が、GSK-3 の別のリン酸化体に対する抗体の隣にある（一次タンパク質アレイを使用する場合）。

【0169】

本発明のアレイの別の実施形態においては、異なるパッチ上のタンパク質が同じものである。これらは、有用なコントロール領域として機能させることができる。

【0170】

アレイの基体は、有機または無機、生体物質または非生体物質、あるいはこれらの材料のあらゆる組み合わせであってよい。一実施形態においては、基体は、透明または半透明である。基体のパッチがある方の表面の一部は、好ましくは平坦であり、硬質または半硬質である。

【0171】

本発明のアレイの実施形態における基体として使用する場合、多くの種類の材料が好適となる。例えば、本発明のアレイの基体は、ケイ素、シリカ、石英、ガラス、細孔が調節されたガラス、炭素、アルミナ、二酸化チタン、ゲルマニウム、窒化ケイ素、ゼオライト、およびガリウムヒ素からなる群より選択される材料を含むことができる。金、白金、アルミニウム、銅、チタン、およびそれらの合金などの多くの金属も、アレイ基体として選択される。さらに、多くのセラミックスおよびポリマーも基体として使用することができる。基体として使用することができるポリマーとしては、限定するものではないが、ポリスチレン、ポリ(テトラ)フルオルエチレン、(ポリ)ビニリデンジフルオリド、ポリカーボネート、ポリメチルメタクリレート、ポリビニルエチレン、ポリエチレンイミン、ポリ(エーテルエーテル)ケトン、ポリオキシメチレン(POM)、ポリビニルフェノール、ポリラクチド、ポリメタクリルイミド(PMI)、ポリアルケンスルホン(PAS)、

【0172】

本発明のアレイの好ましい実施形態においては、パッチが、基体表面上に単一層をさらに含み、パッチのタンパク質がこの単一層上に固定化される。この単一層は、好ましくは自己集合性単一層である。この単一層は、場合によっては、式 $X-R-Y$ の分子を含むことができ、式中、R はスペーサーであり、X は、R を表面に結合させる官能基であり、Y は、タンパク質を単一層上にタンパク質を結合させるための官能基である。

【0173】

種々の化学部分を、アレイ中の単一層として機能させることができる。しかし、好ましくは、アレイのパッチ上に生体反応性の官能基を高密度で露出させるために 3 つの主な種類の単一層形成が使用される：(i) ヒドロキシル化された表面上のアルキルシロキサン単一層（「シラン」）、(ii) 貴金属（好ましくは Au(111)）上のアルキルチオール/ジアルキルジスルフィド単一層；および (iii) 酸化物なしで不動態化させた基体上のアルキル単一層形成。当業者であれば、主として基体、被膜、およびアフィニティタグの選択に応じて、可能性のある多くの部分を X、R、および/または Y の代わりに使用できることが分かるであろう。単一層の多くの例が、Ulman, AN INT

10

20

30

40

50

RODUCTION TO ULTRATHIN ORGANIC FILMS: FROM LANGMUIR-BLODGETT TO SELF ASSEMBLY (Academic Press, 1991)に記載されている。

【0174】

基体への被膜（存在する場合）の堆積または形成は、生体反応性単一層のパッチを形成する前に行われる。単一層適合性の表面パッチは、場合によっては、フォトリソグラフィ、微小成形（国際公開第96/29629号パンフレット）、湿式化学エッチング、またはこれらのあらゆる組み合わせを使用して製造することができる。次に生体反応性単一層がパッチ上に形成される。あるいは、生体反応性単一層で官能化された表面パッチのアレイは、マイクロスタンピング（例えば、米国特許第5,512,131号明細書および第5,731,152号明細書を参照されたい）またはマイクロ接触プリンティング（ μ CP）（例えば国際公開第96/29629号パンフレットを参照されたい）によって形成することもできる。続いて、生体分子を固定化することによって二次元タンパク質アレイが得られる。インクジェット式化合物供給装置によって、単一層X-R-Y分子またはその成分を、基体または被膜の表面にナノメートルまたはマイクロメートルの規模でパターン形成するための別の方法が得られる（例えば、Lemmo et al., Anal Chem. 69: 543-551 (1997)を参照されたい）。

10

【0175】

パッチ間の拡散境界を、形状パターンとして、または垂直の濡れ挙動を有する表面機能として一体化させることができる。例えば、基体材料の壁またはフォトレジストを使用して、一部のパッチを他の部分のパッチと分離したり、全てのパッチを互いに分離したりすることができる。好ましい実施形態においては、X-R-Yの単一層が存在しない表面によって、パッチが互いに分離される。あるいは、異なる濡れ性を有する非生体反応性単一層を使用して、パッチを互いに分離することもできる。

20

【0176】

本発明の別の好ましい実施形態においては、アレイの各パッチに固定化されたタンパク質がタンパク質捕捉剤である。

本発明のアレイの別の実施形態においては、異なるパッチ上のタンパク質が同じものである。

【0177】

タンパク質アレイの作製方法のさらなる詳細については、例えば、米国特許第6,475,808号明細書、第6,537,749号明細書、第6,495,314号明細書、第6,406,921号明細書、および第6,406,840号明細書を参照されたい。（PROTEINS AND PROTEOMICS: A LABORATORY MANUAL）（Richard J. Simpson, ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press 2002）も参照されたい。

30

【0178】

（7. 骨密度を調節する物質）

古典的Wnt経路を介して骨密度を調節する物質としては、限定するものではないが、小化合物、干渉RNA、アンチセンス核酸、ポリペプチド、アプタマー、免疫グロブリン、およびタンパク質ミメティックが挙げられる。これらの化合物は、骨負荷応答およびその増強をさらに分析するための研究用試薬として使用することができるし、被験体の骨密度を調節する手段として使用することもできる。好ましくは、これらの化合物は、Wnt経路を活性化し、それによって骨粗鬆症に罹患した個人などの、骨石灰化の増強が必要な被験体の骨石灰化を増強するために使用される。

40

【0179】

（7.1 小化合物）

骨負荷を研究するための遺伝子発現プロファイルを発生するためのコントロールとして小化合物を使用することができる。これらの小化合物は、Wnt経路の関与する骨石灰化障害の治療に使用することもできる。これらの小化合物は、カテニン、GSK-3、W

50

nt (例えば、Wnt 3A)、LRP5 (またはLRP6)、および骨負荷に対する応答またはWnt経路で発現されるあらゆるタンパク質の調節に使用することができる。

【0180】

(7.1.1 GSK-3阻害剤)

グリコーゲンシンターゼキナーゼ-3 (GSK-3) は、全ての真核生物に見られる多機能のセリン/スレオニンキナーゼである。GSK-3が最初に同定された時には、酵素のグリコーゲンシンターゼをリン酸化し、それによってこの酵素を不活性化することが示された。GSK-3の活性は、GSK-3がリン酸化される程度によって調節される。リン酸化が減少すると、GSK-3活性が増加する。現在、GSK-3は、糖尿病、アルツハイマー病、双極性障害、および癌の発生と関係していると思われている。GSK-3は、ミトコンドリア細胞死経路の活性化による低酸素誘導性アポトーシスの重要なメディエーターであることも分かっている (Loberg et al., J. Biol. Chem. 277 (44): 41667-73 (2002))。

10

【0181】

GSK-3は、GSK-3のリン酸化に反応するキナーゼであるホスホイノシチド3-キナーゼによって調節され、それによってこのタンパク質が不活性化される。

【0182】

周知のGSK-3阻害剤としてLiClが挙げられる。しかし、LiClは選択的ではなく、GSK-3以外の多くのタンパク質を調節するので、あまり好ましくない。選択的GSK阻害剤およびアゴニストは、GSKタンパク質活性を調節し他のタンパク質は調節しないので好ましい。GSK-3に対して選択的であり他のGSKタンパク質には選択的ではないGSK阻害剤またはアゴニストがより好ましい。特定のGSK-3アイソフォーム (すなわち、GSK-3 またはGSK-3) を区別することができる (これらの間で選択的である) GSK阻害剤またはアゴニストが最も好ましい。選択的GSK-3阻害剤としては、アロイシンA、アミロライド (Na⁺、H⁺交互輸送機構の阻害剤)、およびマレイミド化合物が挙げられる。

20

【0183】

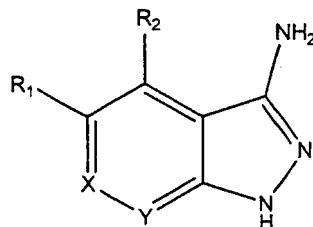
アロイシンAは、CDK1/サイクリンB、CDK2/サイクリンA~E、CDK25/p25、および両方のGSK-3アイソフォームに対して選択性が高い。これはATP結合ポケットと相互作用することによって作用し細胞増殖を阻害することが分かっている (Mettey et al., J. Med. Chem. 46 (2): 222-36 (2003))。

30

【0184】

特に、本発明の化合物は、GSK-3の強力な阻害剤であるとして同定されている一連のピラゾロ[3,4-b]ピリド[az]インを含む。これらのピラゾロ[3,4-b]ピリド[az]インは次式を有する：

【化1】



40

ピリダジン誘導体のGSK-3ホモロジーモデルへの自動リガンドドッキングから、ATP結合部位と相互作用することが分かった。

【0185】

国際公開第00/38675号パンフレット (SmithKline Beecham) (この記載内容全体が本明細書に組み入れられる) に記載されるようなマレイミド誘導体も本明細書での使用が考慮されている。

50

【0186】

国際公開第00/38675号パンフレットに教示されているように、公開特許および特許出願の、欧州特許第470490号明細書(Roche)、国際公開第93/18766号パンフレット(Welcome)、国際公開第93/18765号パンフレット(Welcome)、欧州特許第397060号明細書(Goedecke)、国際公開第98/11105号パンフレット(Astra)、国際公開第98/11103号パンフレット(Astra)、国際公開第98/11102号パンフレット(Astra)、国際公開第98/04552号パンフレット(Roche)、国際公開第98/04551号パンフレット(Roche)、独国特許第4243321号明細書(Goedecke)、独国特許第4005970号明細書(Boehringer)、独国特許第3914764号明細書(Goedecke)、国際公開第96/04906号パンフレット(Welcome)、国際公開第95/07910号パンフレット(Welcome)、独国特許第4217964号明細書(Goedecke)、米国特許第5856517号明細書(Roche)、米国特許第5891901号明細書(Roche)、および国際公開第99/42100号パンフレット(Sagami)(以降、これらの特許および特許出願を「グループ(IA)の刊行物」とも記載する)には、ある種のビスインドールマレイミド、インドールアリアルマレイミド、およびインドロカルバゾール(以降「グループ(IA)の化合物」とも記載する)、ならびにそれらの調製方法が開示されている。

10

【0187】

公開特許および特許出願の欧州特許第328026号明細書(Roche)、欧州特許第384349号明細書(Roche)、欧州特許第540956号明細書(Roche)、および独国特許第4005969号明細書(Boehringer)(以降、これらの特許および特許出願を「グループ(IB)の刊行物」とも記載する)には、ある種のビスインドールマレイミド、インドールアリアルマレイミド、およびインドロカルバゾール(以降「グループ(IB)の化合物」とも記載する)、ならびにそれらの調製方法が開示されている。

20

【0188】

公開特許出願の欧州特許第508792号明細書(Schering)(以降、この特許出願を「グループ(IC)の刊行物」とも記載する)には、ある種のマレイミド誘導体(以降「グループ(IC)の化合物」とも記載する)、ならびにそれらの調製方法が開示されている。

30

【0189】

「グループ(IA)の刊行物」、「グループ(IB)の刊行物」、および「グループ(IC)の刊行物」からなる刊行物のグループを以降「グループ(I)の刊行物」と呼ぶ。

【0190】

「グループ(IA)の化合物」、「グループ(B)の化合物」、および「グループ(IC)の化合物」からなる刊行物のグループを以降「グループ(I)の化合物」と呼ぶ。

【0191】

公開特許および特許出願の、国際公開第95/17182号パンフレット(Lilly)、国際公開第95/35294号パンフレット(Lilly)、欧州特許第624586号明細書(Roche)、欧州特許第657458号明細書(Lilly)、欧州特許第776899号明細書(Lilly)、欧州特許第805158号明細書(Lilly)、米国特許第5491242号明細書(Lilly)、米国特許第5541347号明細書(Lilly)、米国特許第5545636号明細書(Lilly)、米国特許第5552396号明細書(Lilly)、米国特許第5624949号明細書(Lilly)、米国特許第5710145号明細書(Lilly)、米国特許第5721272号明細書(Lilly)、国際公開第97/18809号パンフレット(Lilly)、および国際公開第98/07693号パンフレット(Lilly)(以降、これらの特許および特許出願を「グループ(II)の刊行物」とも記載する)には、真性糖尿病およびその

40

50

合併症と関連する症状の治療に有用であると記載されている選択的プロテインキナーゼC (PKC) 1およびPKC 2阻害剤であるある種の化合物(以降「グループ(I I)の化合物」とも記載する)が開示されている。

【0192】

Hers et al., FEBS Letters 460 (1999) 433 - 436には、ある種のビスインドリルイナレイミド(bisindolylinaleimide)がGSK-3阻害剤として開示されている。

【0193】

「グループ(I)の刊行物」および「グループ(I I)の刊行物」の開示は参照して本明細書に組み入れられる。

10

【0194】

一連のある種のビスインドールマレイミド、インドールアリアルマレイミド、およびインドロカルバゾールは、特に強力で選択的なGSK-3阻害剤である。これらの化合物は、GSK-3の阻害の必要性と関連する症状の治療および/または予防に有用であることが示されている。

【0195】

したがって、一態様においては、本明細書に使用されるマレイミド誘導体は、「グループ(I)の化合物」から選択される化合物である。「グループ(I)の化合物」から選択される好適な化合物は、欧州特許第470490号明細書、国際公開第93/18766号パンフレット、国際公開第93/18765号パンフレット、欧州特許第397060号明細書、国際公開第98/11105号パンフレット、国際公開第98/11103号パンフレット、国際公開第98/11102号パンフレット、国際公開第98/04552号パンフレット、国際公開第98/04551号パンフレット、独国特許第4243321号明細書、独国特許第4005970号明細書、独国特許第3914764号明細書、国際公開第96/04906号パンフレット、国際公開第95/07910号パンフレット、独国特許第4217964号明細書、米国特許第5856517号明細書、米国特許第5891901号明細書、国際公開第99/42100号パンフレット、欧州特許第328026号明細書、欧州特許第384349号明細書、欧州特許第540956号明細書、独国特許第4005969号明細書、または欧州特許第508792号明細書(「グループ(I)の刊行物」)においてそれぞれ定義されている式(I)の化合物である。

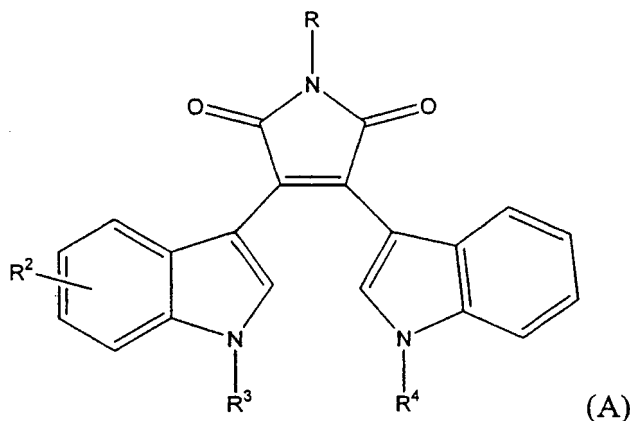
20

30

特に、「グループ(I)の化合物」から選択される化合物としては、「グループ(I)の刊行物」において例として特に開示されている化合物から選択される化合物が挙げられる。

「グループ(I)の化合物」から選択される化合物の例は、「グループ(I A)の刊行物」または「グループ(B)の刊行物」に開示されている化合物から選択される化合物であり、式(A)である：

【化2】



40

50

(上式中

Rは水素であり、

R^2 は、水素、5 - O n - P r、5 - P h、5 - C O₂ M e、または5 - N O₂であり、

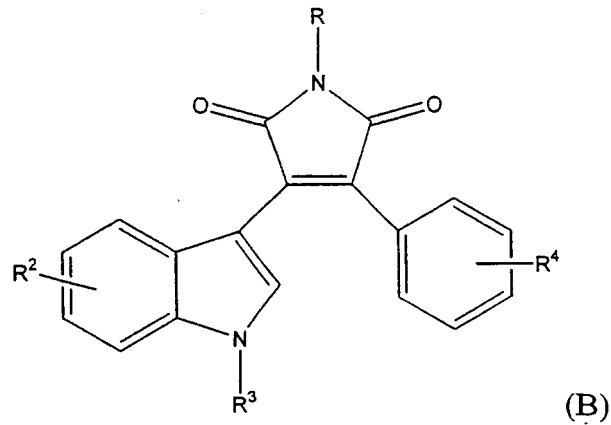
R^3 は、M eまたは(C H₂)₃ O Hであり、

R^4 は、M e、n - P r、- (C H₂)₃ Xであり、Xは、C N、N H₂、C O₂ H、C O N H₂、またはO Hから選択される)。

【0196】

「グループ(I)の化合物」から選択される化合物のさらに別の例は、「グループ(I B)の刊行物」に開示されている化合物から選択される化合物であり、式(B)である：

【化3】



10

20

(上式中、

Rは水素であり、

R^2 は水素であり、

R^3 は、M eまたは基 - (C H₂)₃ Yであり、YはN H₂またはO Hであり、

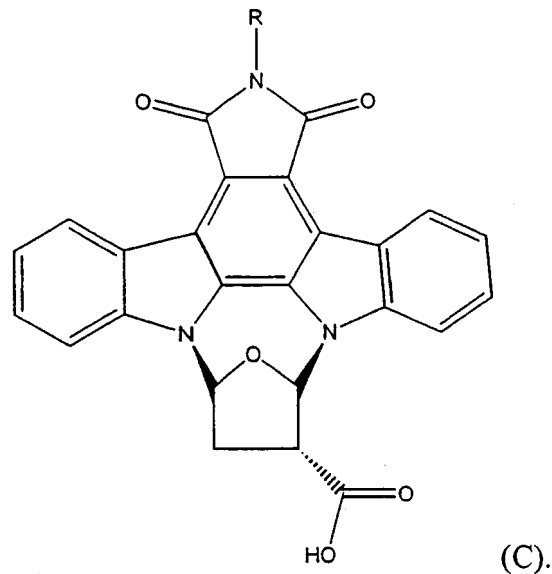
R^4 は、2 - C lまたは2, 4 - ジ - C lである)。

【0197】

「グループ(I)の化合物」から選択される化合物のさらに別の例は、「グループ(I C)の刊行物」に開示されている化合物から選択される化合物であり、9, 10, 11, 12 - テトラヒドロ - 10 - カルボキシ - 9, 12, - エポキシ - 1 H - ジインドロ [1, 2, 3 - f g : 3', 2', 1' - k l] ピロロ [3, 4 - i] ベンゾジアゾシン - 1, 3 (2 H) - ジオン (式 (C)) である。

30

【化4】



10

【0198】

「グループ(II)の化合物」から選択される好適な化合物は、国際公開第95/17182号パンフレット、国際公開第95/35294号パンフレット、欧州特許第624586号明細書、欧州特許第657458号明細書、欧州特許第776899号明細書、欧州特許第805158号明細書、米国特許第5491242号明細書、米国特許第5541347号明細書、米国特許第5545636号明細書、米国特許第5552396号明細書、米国特許第5624949号明細書、米国特許第5710145号明細書、米国特許第5721272号明細書、国際公開第97/18809号パンフレット、または国際公開第98/07693号パンフレット(「グループ(II)の刊行物」)において定義される式(I)の化合物である。

20

【0199】

特に、「グループ(II)の化合物」から選択される化合物としては、「グループ(II)の刊行物」において例として特に開示されている化合物から選択される化合物が挙げられる。

30

【0200】

式(A)の化合物の例としては、以下のリスト(以降「リストA」と呼ぶ)の化合物が挙げられる:

- 3,4-ビス(1-メチル-3-インドリル)ピロール-2,5-ジオン;
- 3-(1-メチル-3-インドリル)-4-(1-プロピル-3-インドリル)ピロール-2,5-ジオン;
- 3-(1-メチル-3-インドリル)-4-(1-[3-シアノプロピル]-3-インドリル)ピロール-2,5-ジオン;
- 3-(1-メチル-3-インドリル)-4-(1-[3-アミノプロピル]-3-インドリル)ピロール-2,5-ジオン;
- 3-(1-メチル-3-インドリル)-4-(1-[3-カルバモイルプロピル]-3-インドリル)ピロール-2,5-ジオン;
- 3-(1-メチル-5-プロピルオキシ-3-インドリル)-4-(1-[3-アミノプロピル]-3-インドリル)ピロール-2,5-ジオン;
- 3-(1-メチル-5-フェニル-3-インドリル)-4-(1-[3-ヒドロキシプロピル]-3-インドリル)ピロール-2,5-ジオン;
- 3-(1-メチル-5-フェニル-3-インドリル)-4-(1-[3-アミノプロピル]-3-インドリル)ピロール-2,5-ジオン;

40

50

3 - (1 - メチル - 5 - メトキシカルボニル - 3 - インドリル) - 4 - (1 - [3 - ヒドロキシプロピル] - 3 - インドリル) ピロール - 2 , 5 - ジオン ;

3 - (1 - メチル - 5 - ニトロ - 3 - インドリル) - 4 - (1 - [3 - ヒドロキシプロピル] - 3 - インドリル) ピロール - 2 , 5 - ジオン ; および

3 - (1 - [3 - ヒドロキシプロピル] - 5 - ニトロ - 3 - インドリル) - 4 - (1 - メチル - 3 - インドリル) ピロール - 2 , 5 - ジオン ;

またはこれらの薬学的に許容される誘導体。

【 0 2 0 1 】

式 (B) の化合物の例としては、以下のリスト (以降「リスト B」と呼ぶ) の化合物が挙げられる :

3 - (1 - メチル - 3 - インドリル) - 4 - (2 - クロロフェニル) ピロール - 2 , 5 - ジオン ;

3 - (1 - メチル - 3 - インドリル) - 4 - (2 , 4 - ジクロロフェニル) ピロール - 2 , 5 - ジオン ;

3 - (1 - [3 - ヒドロキシプロピル] - 3 - インドリル) - 4 - (2 - クロロフェニル) ピロール - 2 , 5 - ジオン ; および

3 - (1 - [3 - アミノプロピル - 3 - インドリル) - 4 - (2 - クロロフェニル) ピロール - 2 , 5 - ジオン ;

またはこれらの薬学的に許容される誘導体。

【 0 2 0 2 】

式 (C) の化合物の例は、

1 0 , 1 1 , 1 2 - テトラヒドロ - 1 0 - カルボキシ - 9 , 1 2 , - エポキシ - 1 H - ジインドロ [1 , 2 , 3 - f g : 3 ' , 2 ' , 1 ' - k l] ピロロ [3 , 4 - i] ベンゾジアゾシン - 1 , 3 (2 H) - ジオン、またはこの薬学的に許容される誘導体である。

【 0 2 0 3 】

好適には、「グループ (I) の化合物」から選択される化合物は、「グループ (I A) の刊行物」または「グループ (I B) の刊行物」に開示される化合物から選択される化合物であり、前述の定義の式 (A) の化合物である。

【 0 2 0 4 】

好適には、「グループ (I) の化合物」から選択される化合物は、「グループ (I C) の刊行物」に開示される化合物から選択される化合物であり、前述の定義の式 (C) の化合物である。

【 0 2 0 5 】

好都合には、「グループ (I) の化合物」から選択される化合物は、「リスト A」から選択される式 (A) の化合物である。

【 0 2 0 6 】

好都合には、「グループ (I) の化合物」から選択される化合物は、1 0 , 1 1 , 1 2 - テトラヒドロ - 1 0 - カルボキシ - 9 , 1 2 , - エポキシ - 1 H - ジインドロ [1 , 2 , 3 - f g : 3 ' , 2 ' , 1 ' - k l] ピロロ [3 , 4 - i] ベンゾジアゾシン - 1 , 3 (2 H) - ジオンまたはこの薬学的に許容される誘導体である。

【 0 2 0 7 】

好ましくは、「グループ (I) の化合物」から選択される化合物は、「グループ (B) の刊行物」に開示される化合物から選択される化合物であり、前述の定義の式 (B) の化合物である。

【 0 2 0 8 】

より好ましくは、「グループ (I) の化合物」から選択される化合物は、「リスト B」から選択される式 (B) の化合物である。

【 0 2 0 9 】

最も好ましくは、「グループ (I) の化合物」から選択される化合物は、3 - (1 - メチル - 3 - インドリル) - 4 - (2 , 4 - ジクロロフェニル) ピロール - 2 , 5 - ジオン

10

20

30

40

50

である。

【0210】

「グループ(I)の化合物」および「グループ(II)の化合物」は、少なくとも1つのキラル原子を含有することができ、および/または複数の結合を含有することができ、したがって1つ以上の立体異性体として存在することができる。

【0211】

本発明は、個別の異性体として、または複数の混合物、例えばラセミ体として、エナンチオマーおよび幾何異性体などの「グループ(I)の化合物」および「グループ(II)の化合物」の全ての異性体を包含している。

【0212】

本発明は、「グループ(I)の刊行物」および「グループ(II)の刊行物」にそれぞれ記載されている「グループ(I)の化合物」および「グループ(II)の化合物」の薬理活性のある誘導体も含んでいる。

10

【0213】

本発明の化合物の好適な薬理活性のある誘導体としては、「グループ(I)の刊行物」および「グループ(II)の刊行物」に記載されている塩および溶媒和物が挙げられる。

【0214】

「グループ(I)の化合物」および「グループ(II)の化合物」の好適な薬学的に許容される誘導体としては、薬学的に許容される塩、および薬学的に許容される溶媒和物が挙げられる。

20

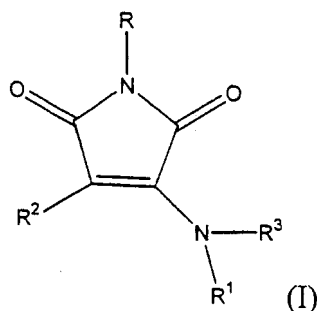
【0215】

国際公開第00/21927号パンフレット(SmithKline Beecham)(この記載内容全体が本明細書に組み入れられる)に記載されるマレイミド誘導体も本明細書での使用が考慮される。

【0216】

国際公開第00/21927号パンフレットには、次式(I)の化合物：

【化5】



30

またはそれらの薬学的に許容される誘導体が開示されている(上式中、

Rは、水素、アルキル、アリール、またはアラルキルであり、

R¹は、水素、アルキル、アラルキル、ヒドロキシアルキル、またはアルコキシアルキルであり、

40

R²は、置換または未置換アリール、または置換または未置換ヘテロシクリルであり、

R³は、水素、置換または未置換のアルキル、シクロアルキル、アルコキシアルキル、置換または未置換のアリール、置換または未置換のヘテロシクリル、またはアラルキルであり、上記アリール部分は置換または未置換である、あるいは

R¹およびR³を、これらが結合する窒素と合わせたものが、単環または縮合環の、場合によっては置換した、飽和、飽和または不飽和の複素環式環を形成する。

【0217】

好適には、Rは水素、C₁~₆アルキル、例えばメチルまたはエチルである、またはRはフェニルまたはベンジルである。

50

【0218】

好ましくは、Rは水素である。

【0219】

好適には、R¹は、水素、C₁~₆アルキル、例えばメチル、エチルである、またはR¹は、ヒドロキシエチルまたはメトキシエチルである。

【0220】

好ましくは、R¹は水素である。

【0221】

R²が置換または未置換アリールである場合、アリール基の例としてはフェニルおよびナフチルが挙げられる。

10

【0222】

R²が置換または未置換ヘテロシクリルである場合、ヘテロシクリル基の例としては、インドリル、ベンゾフラニル、チエニル、およびベンゾチエニルが挙げられる。

【0223】

R²が置換フェニルである場合、好適な置換基としては、ハロ、C₁~₆アルコキシ、ニトロ、パーフルオロC₁~₆アルキル、ベンゾイル、C₁~₆アルコキシカルボニル、C₁~₆アルキルスルホニル、ヒドロキシ、-O(CH₂)_wO- (式中のwは1~4である)、フェノキシ、ベンジルオキシ、C₁~₆アルコキシC₁~₆アルキル、パーフルオロC₁~₆アルコキシ、C₁~₆アルキルS-、パーフルオロC₁~₆アルキルS-、(ジC₁~₆アルキル)N-、アミノ、C₁~₆アルキルカルボニルアミノ、置換または未置換ウレイド、フェニルカルボニルアミノ、ベンジルカルボニルアミノ、スチリルカルボニルアミノ、(ジC₁~₆アルコキシ)(フェニル)C-、C₁~₆アルキル、およびフェニルから独立に選択される最大3つの基が挙げられる。ウレイドの好適な置換基としては、フルオロフェニル、フェニルC₁~₆アルキル-、シクロヘキシル、C₁~₆アルケニル、C₁~₆アルキル、およびC₁~₆アルコキシフェニルが挙げられる。

20

【0224】

R²が置換インドリルである場合、好適な置換基としてはC₁~₆アルキルが挙げられる。

【0225】

R²が置換ベンゾチエニルである場合、好適な置換基としてはC₁~₆アルキルが挙げられる。

30

【0226】

好適には、R²は置換または未置換フェニルである。

【0227】

好都合には、R²は、置換フェニルであって、4-C1、3-C1、2-C1、2,4-ジ-C1、3,4-ジ-C1、3,5-ジ-C1、2,6-ジ-C1、2-F-6-C1、2-F、3-F、4-F、2,3-ジ-F、2,5-ジ-F、2,6-ジ-F、3,4-ジ-F、3,5-ジ-F、2,3,5-トリ-F、3,4,5-トリ-F、2-Br、3-Br、4-Br、2-I、4-I、3-C1-4-OMe、3-NO₂-4-C1、2-OMe-5-Br、2-NO₂、3-NO₂、4-NO₂、2-CF₃、3-CF₃、4-CF₃、3,5-ジ-CF₃、4-PhC(O)-、4-MeO(O)C-、4-MeSO₂-、4-OH、2-OMe、3-OMe、4-OMe、2,4-ジ-OMe、2,5-ジ-OMe、3,4-ジ-OMe、3,4-OCH₂O-、3,4,5-トリ-OMe、3-NO₂-4-OMe、4-OnBu、2-OEt、2-OPh、3-OPh、4-OPh、2-OCH₂Ph、4-OCH₂Ph、4-(MeOCH₂)、2-OCF₃、4-OCF₃、4-SMe、3-SCF₃、4-NMe₂、3-NH₂、3-(NHC(O)Me)、3-[NHC(O)NH(3-F-Ph)]、3-[NHC(O)NH(CH₂)₂Ph]、3-[NHC(O)NHシクロヘキシル]、3-[NHC(O)NHCH₂CH=CH₂]、3-[NHC(O)Ph]、3-[NHC(O)CH₂Ph]、3-[trans-NHC(O)CH=CHPh]、3-[NHC(O)nPr]、3-[NHC(O)

40

50

) N H E t]、3 - [N H C (O) N H (3 - O M e - P h)]、4 - [C (O M e)₂ P h]、2 - M e、3 - M e、4 - M e、4 - i P r、2, 5 - ジ - M e、3, 5 - ジ - M e、4 - P h、2, 3 - [(- C H₂ = C H₂ -)]、または3, 4 - [(- C H₂ = C H₂ -)]で置換されたフェニルである。

【0228】

R³がアルキルである場合、例としてはメチルおよびエチルが挙げられる。

【0229】

R³がシクロアルキルである場合、例としてはシクロヘキシルが挙げられる。

【0230】

R³がアルコキシアリルである場合、例としてはメトキシエチルが挙げられる。

10

【0231】

R³がアラリルである場合、例としてはベンジルおよびフェニルエチルが挙げられる。

【0232】

R³が置換または未置換アリールである場合、例としてはフルオレニル、フェニル、およびジベンゾフリルが挙げられる。

【0233】

R³が置換または未置換ヘテロシクリルである場合、例としてはチエニル、オキサゾリル、ベンゾオキサゾリル、ピリジル、およびピリミジニルが挙げられる。

【0234】

R¹およびR³を、これらと結合する窒素原子と合わせたものが、未置換でも置換されていてもよい縮合複素環式環を形成する場合、例としては、インドリニル、インドリル、オキシインドリル、ベンゾオキサゾリノニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、ベンズイミダゾリル、ベンズアゼピニル、イソインドリン - 2 - イル、および1, 3, 3 - トリメチル - 6 - アザピシクロ [3, 2, 1] オクタ - 6 - イルが挙げられる。

20

【0235】

R¹およびR³を、これらと結合する窒素原子と合わせたものが、未置換でも置換されていてもよい1つの複素環式環を形成する場合、例としては、1 - フェニル - 1, 3, 8 - トリアザスピロ - [4, 5] - デカン - 4 - オン - 8 - イル、ピペラジニル、ピロリジニル、ピペリジニル、モルホリニル、チオモルホリニル、およびピリジニウム環が挙げられる。

30

【0236】

R³が置換フェニルである場合、好適な置換基としては、置換または未置換のC₁~₆アルキル、フェニル、ベンジル、置換または未置換C₁~₆アルキルS -、ハロ、ヒドロキシ、置換または未置換C₁~₆アルコキシ、置換または未置換フェノキシ、インドリル、ナフチル、カルボキシ、C₁~₆アルコキシカルボニル、ベンジルオキシ、ペンタフルオロフェノキシ、ニトロ、N - 置換または未置換カルバモイル、置換または未置換C₁~₆アルキルカルボニル、ベンゾイル、シアノ、パーフルオロC₁~₆アルキルS O₂ -、C₁~₆アルキルN H S O₂ -、オキサゾリル、C₁~₆アルキルカルボニルピペラジニル、置換または未置換フェニルS -、C₁~₆アルキルピペラジニル -、シクロヘキシル、アダマンチル、トリチル、置換または未置換C₁~₆アルケニル、パーフルオロC₁~₆アルキル、パーフルオロC₁~₆アルコキシ、パーフルオロC₁~₆アルキルS -、アミノスルホニル、アルキルアミノスルホニル、ジアルキルアミノスルホニル、アリールアミノスルホニル、モルホリノ、(ジC₁~₆アルキル)アミノ、C₁~₆アルキルC O N H - (ジC₁~₆アルコキシ)フェニル(C H₂)_nN H C (O) C H (フェニル)S - (式中、nは1~6である)、およびC₁~₆アルキルC O N (C₁~₆アルキル) -、チアゾリジンジオニルC₁~₆アルキル、フェニルC H (O H) -、置換または未置換ピペラジニルC₁~₆アルコキシ、置換または未置換ベンゾイルアミノ、あるいは - [C H = C H - C (O) O] -、 - [(C H = C H)₂] -、 - [(C H₂)_xN (C₁~₆アルキルカルボニル)] -、 - (C H₂)_x -、 - S C H

40

50

= N -、 - S C (C₁ ~₆ アルキル) = N -、 ? O C F₂ O -、 ? C H = N - N H -、 - C H = C H - N H -、 - O C (N H C₁ ~₆ アルキル) = N -、 - O C (O) N H -、 - C (O) N C₁ ~₆ アルキル C (O) -、 - [C H = C H - C H = N] -、 - [C H = C (C₁ ~₆ アルキルカルボニル) O] -、 - C (O) N H C (O) -、 - [(C H₂)_x C (O)] -、 - N = N - N H -、 - N = C (C₁ ~₆ アルキル) O -、 - O (C H₂)_x O -、 (C H₂)_x S O₂ (C H₂)_y -、 - N (C₁ ~₆ アルキルカルボニル) (C H₂)_x - (式中、 x および y は独立に 1 ~ 4 である)、ピリミジン - 2 - イルオキシ、フェニルアミノ、N - [ピリミジン - 2 - イル] - N - [C₁ ~₆ アルキル] アミノ、C₁ ~₆ アルキルスルホニルアミノ、および 1, 2, 3 - チアジアゾリルから独立に選択される最大 3 つの基が挙げられる。

10

【 0 2 3 7 】

C₁ ~₆ アルキルの好適な置換基としては、ヒドロキシ、カルボキシ、未置換のまたは N - 置換カルバモイル、N - モルホリニルカルボニル、C₁ ~₆ アルキルアミノカルボニル、フルオロ、シアノ、C₁ ~₆ アルキル、C₁ ~₆ アルコキシカルボニルアミノ、アミノ、C₁ ~₆ アルキルカルボニルアミノ、ベンゾイルアミノ、フェニルアミノカルボニルアミノ、C₁ ~₆ アルコキシカルボニル、ホスホノ、モノ - またはビス C₁ ~₆ アルキルホスホネート、C₁ ~₆ アルキルアミノスルホニル、および C₁ ~₆ アルキルカルボニルアミノ C₁ ~₆ アルキルアミノ C O - が挙げられる。

【 0 2 3 8 】

C₁ ~₆ アルキル S - の好適な置換基としては、カルボキシ、C₁ ~₆ アルコキシカルボニル、C₁ ~₆ アルコキシ C₁ ~₆ アルキルアミノカルボニル、未置換または N - 置換カルバモイル、およびフルオロが挙げられる。

20

【 0 2 3 9 】

C₁ ~₆ アルコキシの好適な置換基としては、C₁ ~₆ アルコキシ、フェニル、カルボキシ、C₁ ~₆ アルコキシカルボニル、未置換または N - 置換カルバモイル、およびフェニルが挙げられる。

【 0 2 4 0 】

カルバモイルの好適な置換基としては、C₁ ~₆ アルキル、および C₁ ~₆ アルコキシ C₁ ~₆ アルキルが挙げられる。

【 0 2 4 1 】

C₁ ~₆ アルキルカルボニルの好適な置換基としては、カルボキシ、および C₁ ~₆ アルコキシカルボニルが挙げられる。

30

【 0 2 4 2 】

フェニル S - の好適な置換基としては、クロロ、ニトロ、カルボキシ、C₁ ~₆ アルキルアミノカルボニル、未置換または N - 置換カルバモイル、および C₁ ~₆ アルコキシカルボニルが挙げられる。

【 0 2 4 3 】

C₁ ~₆ アルケニルの好適な置換基としては、(ジ C₁ ~₆ アルキル) アミノカルボニル、カルボキシ、C₁ ~₆ アルコキシカルボニル、カルバモイル、およびフェニルが挙げられる。

40

【 0 2 4 4 】

ピペラジニル C₁ ~₆ アルコキシの好適な置換基としてはメチルが挙げられる。

【 0 2 4 5 】

フェノキシの好適な置換基としてはクロロが挙げられる。

【 0 2 4 6 】

ベンゾイルアミノの好適な置換基としてはヒドロキシが挙げられる。

【 0 2 4 7 】

R³ が置換ベンゾフラニルである場合、好適な置換基としては C₁ ~₆ アルキルカルボニルが挙げられる。

【 0 2 4 8 】

50

R³が置換チエニルである場合、好適な置換基としてはC₁~₆アルキルカルボニルが挙げられる。

【0249】

R³がオキサゾリルである場合、好適な置換基としてはC₁~₆アルキルが挙げられる。

【0250】

R³が置換ベンゾオキサゾリルである場合、好適な置換基としてはハ口が挙げられる。

【0251】

R³が置換ピリジルである場合、好適な置換基としては、C₁~₆アルキル、C₁~₆アルコキシ、およびハ口から独立に選択される最大3個の置換基が挙げられる。

【0252】

好適には、R³は置換または未置換フェニルである。

【0253】

好都合には、R³は、置換フェニルであって、2-Me、2-Et、2-iPr、2-CH₂OH、2-Ph、2-CH₂Ph、2-SMe、2-F、2-Cl、2-OH、2-OMe、2-OPh、2-Me-5-F、2-Me-3-Cl、2-Me-4-Cl、2-Me-5-Cl、2-Me-3-Br、2,3-ジ-Me、2,4-ジ-Me、2-Me-4-OH、2-Me-4-OMe、2-Me-5-CH₂OH、2,4,6-トリ-Me、2-(2-インドリル)、(1-ナフチル)、2-Me-5-COOH、2-Me-5-COOMe、2-OH-5-COOH、2-[O(CH₂)₂OMe]-5-[(CH₂)₂-COOH]、2-[SCH(Ph)CONH(CH₂)₂(3,4-ジ-OMePh)]、3-Me、3-Et、3-CH₂OH、3-CH₂OH-6-Me、3-CH₂OH-4-OMe、3-(CH₂NMe₂)-4-OMe、3-[CH₂COOH]、3-[CH₂COOMe]、3-[CH₂CONH₂]、3-[CH₂CONHMe]、3-[CH₂-(チアゾリジン-2,4-ジオン-5-イル)]、3-SMe、3-F、3-Cl、3-Br、3-I、3-CF₃、3-OH、3-OMe、3-OCH₂Ph、3-OiPr、3-OPh、3-O-ペンタフルオロフェニル、3-(OCH₂CO₂H)、3-(OCH₂CO₂Me)、3-(OCH₂CO₂Et)、3-NO₂、3-CO₂H、3-CO₂Me、3-CONH₂、3-CONHMe、3-CONHCH₂CH₂OMe、3-COMe、3-COPh、3-(COCH₂CH₂CO₂H)、3-(COCH₂CH₂CO₂Me)、3-CN、3-SO₂CF₃、3-SO₂NH-nBu、3-(5-オキサゾリル)、3-[4-メチルピペラジン-1-イル]-4-OMe、3-[O-(ピリミジン-2-イル)]、3-OH-4-OMe、3,4-ジ-OMe、3,5-ジ-OMe、3,4-ジ-Me、3,5-ジ-Me、3-[trans-CH=CHCONMe₂]-4-Cl、3-F-4-Me、3-Cl-4-Me、3-Br-4-Me、3,5-ジ-F、3,4-ジ-Cl、3,5-ジ-Cl、3,5-ジ-Br、3-Cl-4-Br、3-Cl-4-I、3-Cl-4-OH、3-Br-4-OH、3-F-4-OMe、3-Cl-4-OMe、3-Cl-4-SMe、3-Br-4-Cl、3-Br-4-OCF₃、3-Br-5-CF₃、3,5-ジ-Cl-4-OH、3,5-ジ-Br-4-OH、3,5-ジ-Cl-4-Me、3,5-ジ-Br-4-Me、3-[CH₂CH(Me)CO₂H]、3-CO₂H-4-Cl、3-CO₂Me-4-Cl、3-CO₂H-4-OH、3-CONH₂-4-Me、3-NO₂-4-OH、3-CO₂H-4-SPh、3-CO₂H-4-[S-(2-CO₂H-Ph)]、3-CO₂H-4-[S-(2-CONHMe-Ph)]、3-CO₂Et-4-[S-(2-CO₂Et-Ph)]、3-CO₂H-4-[S-(3-CO₂H-Ph)]、3-CO₂Me-4-[S-(4-Cl-Ph)]、4-[N(Me)(ピリミジン-2-イル)]、4-Me、4-nBu、4-tBu、4-シクロヘキシル、4-アダマンチル、4-CPh₃、4-CH₂CN、4-CH(OH)Me、4-CH(OMe)Me、4-CH₂OH、4-CH₂NHC(O)t-Bu、4-CH₂NH₂、4-CH₂NHCOMe、4-CH₂NHCOPh、4-CH₂NHCONHPh、4-CH₂CO₂H、4-CH₂CO₂Me、4-[CH₂P(O)(OH)₂]、4-[CH₂P(O)(OEt)₂]、4-[CH₂SO₂NHMe]、4-(CH₂)₂OH、4-(CH₂

10

20

30

40

50

$\text{)}_2\text{NH}_2$ 、4 - $(\text{CH}_2)_2\text{NHCOPh}$ 、4 - $(\text{CH}_2)_2\text{NHC(O)Ot - Bu}$ 、4 -
 $[(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{H}]$ 、4 - $[(\text{CH}_2)_2\text{CO}_2\text{Me}]$ 、4 - $[(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{CONH}_2]$ 、4 - $[\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_6\text{NHCOMe}]$ 、4 - $[(\text{CH}_2)_3\text{CO}_2\text{H}]$ 、4 - $[(\text{CH}_2)_3\text{CO}_2\text{Me}]$ 、4 - $[\text{CH}=\text{CH}_2]$ 、4 - $(\text{CH}=\text{CHCO}_2\text{H})$ 、4 - $(\text{CH}=\text{CHCO}_2\text{Et})$ 、4 - $(\text{CH}=\text{CHCONH}_2)$ 、4 - $(\text{CH}=\text{CHPh})$ 、4 - $(\text{CH}=\text{CH}(4\text{-OHPh}))$ 、4 - [1, 2, 3 - チアジアゾール - 4 - イル]、4 - $[\text{OCH}_2 - (1\text{-メチル - ピペラジン - 4 - イル})]$ 、4 - [4 - メチルピペラジン - 1 - イル]、4 - CF_3 、4 - SMe 、4 - $(\text{SCH}_2\text{CO}_2\text{H})$ 、4 - $(\text{SCH}_2\text{CO}_2\text{Me})$ 、4 - $[\text{SCH}_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{OMe}]$ 、4 - SCF_3 、4 - $[\text{S} - (4\text{-NO}_2\text{-Ph})]$ 、4 - $[\text{S} - (2\text{-CO}_2\text{H-Ph})]$ 、4 - $[\text{S} - (3\text{-CO}_2\text{H-Ph})]$ 、4 - SO_2NH_2 、4 - F 、4 - Cl 、4 - Br 、4 - I 、4 - OH 、4 - OMe 、4 - OnBu 、4 - OPh 、4 - $[\text{O} - (4\text{-Cl-Ph})]$ 、4 - OCH_2Ph 、4 - $\text{OCH}_2\text{CO}_2\text{Me}$ 、4 - COPh 、4 - COMe 、4 - CONH_2 、4 - CO_2H 、4 - CN 、4 - NO_2 、4 - モルホリニル、4 - $[\text{CH}_2\text{CO} - \text{モルホリン} - 1 - イル]$ 、4 - $[\text{CH}_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_2\text{OMe}]$ 、4 - $[(\text{CH}_2)_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_6\text{NHC(O)Ot - Bu}]$ 、4 - $[(\text{CH}_2)_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_6\text{NH}_2]$ 、4 - $[(\text{CH}_2)_2\text{CONH}(\text{CH}_2)_6\text{NH} - \text{ビオチニル}]$ 、4 - NMe_2 、4 - NHCOMe 、4 - $\text{N}(\text{Me})\text{COMe}$ 、2, 3 - ジ - F 、4 - $[\text{NHCO}(\text{Ph} - 2\text{-OH})]$ 、4 - (フェニルアミノ)、4 - メチルスルホニルアミノ、2, 4 - ジ - F 、2, 5 - ジ - F 、2 - $\text{OMe} - 3 - \text{F}$ 、3 - CH_2OMe 、3 - $\text{CH}(\text{OH})\text{Ph}$ 、3, 4 - ジ - F 、3 - $\text{CO}_2\text{H} - 4 - \text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ 、3 - $\text{CO}_2\text{H} - 4 - [\text{S} - (2\text{-CO}_2\text{Et})\text{Ph}]$ 、3 - $\text{CO}_2\text{Et} - 4 - [\text{S} - (4\text{-CO}_2\text{H})\text{Ph}]$ 、3 - $\text{CONHMe} - 4 - [\text{S} - (2\text{-CONHMe}) - \text{Ph}]$ 、3 - [4 - (ジクロロアセチル)ピペラジン - 1 - イル] - 4 - OMe 、4 - CH_2CONH_2 、4 - SPh 、4 - $[\text{S} - (4\text{-CO}_2\text{H-Ph})]$ 、および 4 - $\text{OCH}_2\text{CO}_2\text{H}$ で置換されたフェニルが挙げられる。

【0254】

R^1 および R^3 を、これらと結合する窒素原子と合わせたものがインドリニルを形成する場合、好適な置換基としては、 $\text{C}_1\sim 6$ アルキル、パーフルオロ $\text{C}_1\sim 6$ アルキル、 $\text{C}_1\sim 6$ アルキル SO_2NH - ヒドロキシ $\text{C}_1\sim 6$ アルキル、カルボキシ、 $\text{C}_1\sim 6$ アルコキシカルボニル、 $\text{C}_1\sim 6$ アルコキシ、ハロ、t - ブトキシカルボニルピペラジン - 1 - イル、4 - ($\text{C}_1\sim 6$ アルキル)ピペラジニル、ピペラジニル、アミド、およびニトロが挙げられる。

【0255】

R^1 および R^3 を、これらと結合する窒素原子と合わせたものがピペラジニルを形成する場合、好適な置換基としては、アルキルカルボニル、アルキル、またはアリアルが挙げられる。

【0256】

R^1 および R^3 を、これらと結合する窒素原子と合わせたものがテトラヒドロキノリニルを形成する場合、好適な置換基としてはパーフルオロ $\text{C}_1\sim 6$ アルキルが挙げられる。

【0257】

R^1 および R^3 を、これらと結合する窒素原子と合わせたものがピリジニウム環を形成する場合、好適な置換基としてはアミノが挙げられる。

【0258】

R^1 および R^3 を、これらと結合する窒素原子と合わせたものがピロリジニルを形成する場合、好適な置換基としてはヒドロキシが挙げられる。

【0259】

R^1 および R^3 を、これらと結合する窒素原子と合わせたものがピペリジニルを形成する場合、好適な置換基としては、ベンジル、ヒドロキシ $\text{C}_1\sim 6$ アルキル、 $\text{C}_1\sim 6$ アルキル、ヒドロキシ、カルバモイル、および $\text{C}_1\sim 6$ アルコキシカルボニルが挙げられる。

【0260】

R^1 および R^3 を、これらと結合する窒素原子と合わせたものがオキシインドリルを形成

する場合、好適な置換基としてはC₁~₆アルキルが挙げられる。

【0261】

国際公開第00/21927号パンフレットに開示されているように、化合物のサブグループであって、完全に式(I)の範囲内にあり、R、R¹、R²、およびR³が式(I)に関して定義される通りである式(IA)の化合物であり、ただし、式(IA)が以下の化合物(以降、リストAと呼ぶ)を含まない化合物のサブグループが存在する：

- 3 - フェニル - 4 - (4 - メチルピペラジノ) - ピロール - 2, 5 - ジオン；
- 3 - [4 - (ジフェニルメチル) - 1 - ピペラジニル] - 4 - (1H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 1H - ピロール - 2, 5 - ジオン；
- 3 - フェニル - 4 - (4 - フェニルピペラジノ) - ピロール - 2, 5 - ジオン； 10
- 1 - メチル - 3 - フェニル - 4 - (4 - フェニルピペラジノ) - ピロール - 2, 5 - ジオン；
- 1 - エチル - 3 - フェニル - 4 - (4 - クロロフェニルピペラジノ) - ピロール - 2, 5 - ジオン；
- 1 - アリル - 3 - フェニル - 4 - (4 - メチルピペラジノ) - ピロール - 2, 5 - ジオン；
- 3 - インドール - 1 - イル - 4 - (1 - メチル - 1H - インドール - 3 - イル) - ピロール - 2, 5 - ジオン；
- 1 - (1 - メチル - 2, 5 - ジオキソ - 4 - フェニルアミノ - 2, 5 - ジヒドロ - 1H - ピロール - 3 - イル)ピリジニウムクロリド； 20
- 1 - [1 - (4 - メチル - ベンチル) - 2, 5 - ジオキソ - 4 - フェニルアミノ - 2, 5 - ジヒドロ - 1H - ピロール - 3 - イル]ピリジニウムクロリド；
- 1 - (1 - ドデシル - 2, 5 - ジオキソ - 4 - フェニルアミノ - 2, 5 - ジヒドロ - 1H - ピロール - 3 - イル) - ピリジニウムクロリド；
- 3 - [2 - ベンゾ[b]チエン - 2 - イル - 3 - [4 - (ジメチルアミノ) - 2, 5 - ジヒドロ - 2, 5 - ジオキソ - 1H - ピロール - 3 - イル] - 1H - インドール - 1 - イル] - カルバムイミドチオ酸, プロピルエステル；
- 3 - (ジメチルアミノ) - 4 - (1H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 1H - ピロール - 2, 5 - ジオン；
- 3 - (1H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 4 - (フェニルアミノ) - 1H - ピロール - 2, 5 - ジオン； 30
- 3 - (1H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 4 - [[4 - (トリフルオロメチル)フェニル]アミノ] - 1H - ピロール - 2, 5 - ジオン；
- 3 - (1H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 4 - (メチルアミノ) - 1H - ピロール - 2, 5 - ジオン；
- 3 - (1H - イミダゾ[4, 5 - b]ピリジン - 1 - イル) - 4 - (1H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 1H - ピロール - 2, 5 - ジオン；
- 3 - (6 - クロロ - 9H - プリン - 9 - イル) - 4 - (1H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 1H - ピロール - 2, 5 - ジオン；
- 3 - (6 - アミノ - 9H - プリン - 9 - イル) - 4 - (1H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 1H - ピロール - 2, 5 - ジオン； 40
- 3 - (1H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 4 - (1H - ピロロ[2, 3 - b]ピリジン - 1 - イル) - 1H - ピロール - 2, 5 - ジオン；
- 3 - (1H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 4 - (1 - ピペリジニル) - 1H - ピロール - 2, 5 - ジオン；
- 1 - アセチル - 3 - [2, 5 - ジヒドロ - 1 - メチル - 2, 5 - ジオキソ - 4 - [[4 - (トリフルオロメチル)フェニル]アミノ] - 1H - ピロール - 3 - イル] - 1H - インドール；
- 3 - (1H - ベンズイミダゾール - 1 - イル) - 4 - (1H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 1H - ピロール - 2, 5 - ジオン； 50

- 3 - (1 H - ベンゾトリアゾール - 1 - イル) - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- 3 - (1 H - イミダゾール - 1 - イル) - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- 3 - (1 H - インドール - 1 - イル) - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- 3 - (1 H - インダゾール - 1 - イル) - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- 3 - [3 - [(ジメチルアミノ) メチル] - 1 H - インドール - 1 - イル] - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ; 10
- 3 - (1 H - ベンズイミダゾール - 1 - イル) - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- 3 - (1 H - インドール - 1 - イル) - 4 - (1 - メチル - 1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- 3 - アミノ - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- 3 - アミノ - 4 - (5 - メトキシ - 1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- 1 H - インドール - 1 - カルボン酸 , 3 - (4 - アミノ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 - メチル - 2 , 5 - ジオキソ - 1 H - ピロール - 3 - イル) - 1 , 1 - ジメチルエチルエステル ;
- 3 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 4 - [(フェニルメチル) アミノ] - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ; 20
- グリシン , N - [2 , 5 - ジヒドロ - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 2 , 5 - ジオキソ - 1 H - ピロール - 3 - イル] - , エチルエステル ;
- 3 - アミノ - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- 3 - [[3 - [(3 - アミノプロピル) アミノ] プロピル] アミノ] - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- [[3 - [4 - (3 - アミノプロピル) - 1 - ピペラジニル] プロピル] アミノ] - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- 3 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 4 - [[3 - (4 - メチル - 1 - ピペラジニル) プロピル] アミノ] - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ; 30
- 1 - [3 - [(3 - アミノプロピル) アミノ] プロピル] - 3 - [[3 - [(3 - アミノプロピル) アミノ] プロピル] アミノ] - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- 1 - [3 - [4 - (3 - アミノプロピル) - 1 - ピペラジニル] プロピル] - 3 - [[3 - [4 - (3 - アミノプロピル) - 1 - ピペラジニル] プロピル] アミノ] - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- 3 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 - [3 - (4 - メチル - 1 - ピペラジニル) プロピル] - 4 - [[3 - (4 - メチル - 1 - ピペラジニル) プロピル] アミノ] - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ; 40
- 3 , 3 ' - [イミノビス (3 , 1 - プロパンジイルイミノ)] ビス [4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- 3 , 3 ' - [1 , 4 - ピペラジンジイルビス (3 , 1 - プロパンジイルイミノ)] ビス [4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- 3 - [(5 - アミノペンチル) アミノ] - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- 3 - [[5 - [(2 - アミノエチル) アミノ] ペンチ] アミノ] - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- 3 - [(2 - アミノエチル) アミノ] - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ; 50

- 3 - [(6 - アミノヘキシル) アミノ] - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- 3 - [(7 - アミノヘプチル) アミノ] - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- 3 - [[2 - [(2 - アミノエチル) アミノ] エチル] アミノ] - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- ベンゼンプロパンアミド , - アミノ - N - [5 - [[2 , 5 - ジヒドロ - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 2 , 5 - ジオキソ - 1 H - ピロール - 3 - イル] アミノ] ペンチル] - , (S) - ;
- ペンタン酸 , 4 - アミノ - 5 - [[5 - [[2 , 5 - ジヒドロ - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 2 , 5 - ジオキソ - 1 H - ピロール - 3 - イル] アミノ] ペンチル] アミノ] - 5 - オキソ - , (S) - ; 10
- ペンタンアミド , 2 - アミノ - 5 - [(アミノイミノメチル) アミノ] - N - [2 - [[5 - [[2 , 5 - ジヒドロ - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 2 , 5 - ジオキソ - 1 H - ピロール - 3 - イル] アミノ] ペンチル] アミノ] エチル , (S) - ;
- ベンゼンプロパンアミド , - アミノ - N - [2 - [[5 - [[2 , 5 - ジヒドロ - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 2 , 5 - ジオキソ - 1 H - ピロール - 3 - イル] アミノ] ペンチ] アミノ] エチル - , (S) -
- ブタンアミド , 4 - (アミノイミノメチル) アミノ - N - [5 - [[2 , 5 - ジヒドロ - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 2 , 5 - ジオキソ - 1 H - ピロール - 3 - イル] アミノ] ペンチル] - , (S) - ; 20
- 3 - フェニル - 4 - (ジエチルアミノ) - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- 3 - フェニル - 4 - (ベンジルアミノ) - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- 1 - メチル - 3 - フェニル - 4 - (2 - ジエチルアミノエチルアミノ) - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- 1 - アリル - 3 - フェニル - 4 - (2 - ジメチルアミノエチルアミノ) - ピロール - 2 , 5 - ジオン ; および ,
- 1 , 3 - ジフェニル - 4 - ピペリジノ - ピロール - 2 , 5 - ジオン。
- 国際公開第 00 / 21927 号パンフレットに開示されているように、化合物のさらなるサブグループであって、完全に式 (I) の範囲内にあり、R、R¹、R²、および R³ が式 (I) に関して定義される通りである式 (I B) の化合物であり、ただし、式 (I B) が以下の化合物 (以降、リスト B と呼ぶ) を含まない化合物のサブグループが存在する : 30
- 3 - (4 - メチルピペラジン - 1 - イル) - 4 - フェニル - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- 3 - (4 - エチルピペラジン - 1 - イル) - 4 - フェニル - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- 3 - (4 - クロロフェニル) - 4 - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- 3 - [4 - (ジフェニルメチル) - 1 - ピペラジニル] - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- 3 - フェニル - 4 - (4 - メチルピペラジノ) - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- 3 - フェニル - 4 - (4 - フェニルピペラジノ) - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- 1 - メチル - 3 - フェニル - 4 - (4 - フェニルピペラジノ) - ピロール - 2 , 5 - ジオン ; 40
- 1 - エチル - 3 - フェニル - 4 - (4 - クロロフェニルピペラジノ) - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- 1 - アリル - 3 - フェニル - 4 - (4 - メチルピペラジノ) - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- 3 - フェニルアミノ - 4 - フェニル - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- 3 - フェニル - 4 - ピペリジン - 1 - イル - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- 3 - (3 , 5 - ジメチル - 1 - フェニル - 1 H - ピラゾール - 4 - イル) - 4 - モルホリン - 4 - イル - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
- 3 - インドール - 1 - イル - 4 - (1 - メチル - 1 H - インドール - 3 - イル) - ピロー 50

ル - 2 , 5 - ジオン ;

1 - (1 - メチル - 2 , 5 - ジオキソ - 4 - フェニルアミノ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 3 - イル) - ピリジニウムクロリド ;

1 - 1 - (4 - メチル - ペンチル) - 2 , 5 - ジオキソ - 4 - フェニルアミノ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 3 - イル) - ピリジニウムクロリド ;

1 - (1 - ドデシル - 2 , 5 - ジオキソ - 4 - フェニルアミノ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 H - ピロール - 3 - イル) - ピリジニウムクロリド ;

3 - [2 , 5 - ジヒドロ - 4 - (1 H - イミダゾール - 1 - イル) - 1 - メチル - 2 , 5 - ジオキソ - 1 H - ピロール - 3 - イル] - 1 H - インドール - 1 - カルボン酸 , 1 , 1 - ジメチルエチルエステル ;

10

3 - [2 - ベンゾ [b] チエン - 2 - イル - 3 - [4 - (ジメチルアミノ) - 2 , 5 - ジヒドロ - 2 , 5 - ジオキソ - 1 H - ピロール - 3 - イル] - 1 H - インドール - 1 - イル] - カルバミドチオ酸 , プロピルエステル ;

3 - (ジメチルアミノ) - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;

3 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 4 - (フェニルアミノ) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;

3 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 4 - [[4 - (トリフルオロメチル) フェニル] アミノ] - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;

3 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 4 - (メチルアミノ) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;

20

3 - (1 H - イミダゾ [4 , 5 - b] ピリジン - 1 - イル) - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;

3 - (6 - クロロ - 9 H - プリン - 9 - イル) - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;

3 - (6 - アミノ - 9 H - プリン - 9 - イル) - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;

3 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 4 - (1 H - ピロロ [2 , 3 - b] ピリジン - 1 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;

3 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 4 - (1 - ピペリジニル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;

30

1 - アセチル - 3 - [2 , 5 - ジヒドロ - 1 - メチル - 2 , 5 - ジオキソ - 4 - [[4 - (トリフルオロメチル) フェニル] アミノ] - 1 H - ピロール - 3 - イル] - 1 H - インドール ;

3 - (1 H - ベンズイミダゾール - 1 - イル) - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;

3 - (1 H - ベンゾトリアゾール - 1 - イル) - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;

3 - (1 H - イミダゾール - 1 - イル) - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;

40

3 - (1 H - インドール - 1 - イル) - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;

3 - (1 H - インダゾール - 1 - イル) - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;

3 - [3 - [(ジメチルアミノ) メチル] - 1 H - インドール - 1 - イル] - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 1 H - ピロール 2 , 5 - ジオン ;

3 - (1 H - ベンズイミダゾール - 1 - イル) - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;

3 - (1 H - インドール - 1 - イル) - 4 - (1 - メチル - 1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;

50

3 - (3 , 5 - ジメチル - 1 - フェニル - 1 H - ピラゾール - 4 - イル) - 4 - (4 - モルホリニル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
 3 - アミノ - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
 3 - アミノ - 4 - (5 - メトキシ - 1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
 1 H - インドール - 1 - カルボン酸 , 3 - (4 - アミノ - 2 , 5 - ジヒドロ - 1 - メチル - 2 , 5 - ジオキソ - 1 H - ピロール - 3 - イル) - , 1 , 1 - ジメチルエチルエステル ;
 3 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 4 - [(フェニルメチル) アミノ] - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
 グリシン , N - [2 , 5 - ジヒドロ - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 2 , 5 - ジオキソ - 1 H - ピロール - 3 - イル] - , エチルエステル ;
 3 - アミノ - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
 1 - (4 - メチルフェニル) - 3 - [(4 - メチルフェニル) アミノ] - 4 - フェニル - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
 3 - [[3 - [(3 - アミノプロピル) アミノ] プロピル] アミノ] - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
 3 - [[3 - [4 - (3 - アミノプロピル) - 1 - ピペラジニル] プロピル] アミノ] - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
 3 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 4 - [[3 - (4 - メチル - 1 - ピペラジニル) プロピル] アミノ] - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
 1 - [3 - [(3 - アミノプロピル) アミノ] プロピル] - 3 - [[3 - [(3 - アミノプロピル) アミノ] プロピル] アミノ] - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
 1 - [3 - [4 - (3 - アミノプロピル) - 1 - ピペラジニル] プロピル] - 3 - [[3 - [4 - (3 - アミノプロピル) - 1 - ピペラジニル) プロピル] [アミノ]] - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
 3 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 - [3 - (4 - メチル - 1 - ピペラジニル) プロピル] - 4 - [[3 - (4 - メチル - 1 - ピペラジニル) プロピル] アミノ] - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
 3 , 3 ' - [イミノビス (3 , 1 - プロパンジイルイミノ)] ビス [4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
 3 , 3 ' - [1 , 4 - ピペラジンジイルビス (3 , 1 - プロパンジイルイミノ)] ビス [4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
 3 - アミノ - 4 - (3 , 4 - ジメトキシフェニル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
 3 - [(5 - アミノペンチル) アミノ] - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
 3 - [[5 - [(2 - アミノエチル) アミノ] ペンチル] アミノ] - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
 3 - [(2 - アミノエチル) アミノ] - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
 3 - [(6 - アミノヘキシル) アミノ] - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
 3 - [(7 - アミノヘプチル) アミノ] - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
 3 - [[2 - [(2 - アミノエチル) アミノ] エチル] アミノ] - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
 ベンゼンプロパンアミド , - アミノ - N - [5 - [[2 , 5 - ジヒドロ - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 2 , 5 - ジオキソ - 1 H - ピロール - 3 - イル) アミノ] ペン

10

20

30

40

50

- チル] - , (S) - ;
 ペンタン酸 , 4 - アミノ - 5 - [[5 - [[2 , 5 - ジヒドロ - 4 - (1 H - インドール
 - 3 - イル) - 2 , 5 - ジオキソ - 1 H - ピロール - 3 - イル] アミノ] ペンチル] アミ
 ノ] - 5 - オキソ - , (S) - ;
 ペンタンアミド , 2 - アミノ - 5 - [(アミノイミノメチル) アミノ] - N - [2 - [[5 - [[2 , 5 - ジヒドロ - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 2 , 5 - ジオキソ -
 1 H - ピロール - 3 - イル] アミノ] ペンチル] アミノ] エチル] - , (S) - ;
 ベンゼンプロパンアミド , - アミノ - N - [2 - [[5 - [[2 , 5 - ジヒドロ - 4 -
 (1 H - インドール - 3 - イル) - 2 , 5 - ジオキソ - 1 H - ピロール - 3 - イル] アミ
 ノ] ペンチル] アミノ] エチル] - , (S) - ; 10
 ブタンアミド , 4 - [(アミノイミノメチル) アミノ] - N - [5 - [[2 , 5 - ジヒド
 ロ - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 2 , 5 - ジオキソ - 1 H - ピロール - 3 - イ
 ル] アミノ] ペンチル] - , (S) - ;
 3 - (4 - メチルフェニル) - 1 - フェニル - 4 - (フェニルアミノ) - 1 H - ピロール
 - 2 , 5 - ジオン ;
 1 , 3 - ビス (4 - メチルフェニル) - 4 - [(4 - メチルフェニル) アミノ] - 1 H -
 ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
 3 - アミノ - 1 , 4 - ジフェニル - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
 3 - (4 - メチルフェニル) - 4 - (4 - モルホリニル) - 1 - フェニル - 1 H - ピロー
 ル - 2 , 5 - ジオン ; 20
 3 - (4 - メチルフェニル) - 1 - フェニル - 4 - [(フェニルメチル) アミノ] - 1 H
 - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
 3 - アミノ - 4 - (4 - メチルフェニル) - 1 - フェニル - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジ
 オン ;
 3 - (3 , 5 - ジメチル - 1 - フェニル - 1 H - ピラゾール - 4 - イル) - 4 - (4 - モ
 ルホリニル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
 3 - (4 - ニトロフェニル) - 1 - フェニル - 4 - フェニルアミノ - 1 H - ピロール - 2
 , 5 - ジオン ;
 3 - アミノ - 1 - メチル - 4 - p - トリル - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
 3 - (2 - ジエチルアミノ - エチルアミノ) - 4 - フェニル - ピロール - 2 , 5 - ジオン 30
 ;
 3 - [ブチル - (2 - ジエチルアミノ - エチル) - アミノ] - 4 - フェニル - ピロール -
 2 , 5 - ジオン ;
 3 - [ベンジル - (2 - ジメチルアミノ - エチル) - アミノ] - 4 - フェニル - ピロール
 - 2 , 5 - ジオン ;
 3 - [ベンジル - (2 - ジメチルアミノ - エチル) - アミノ] - 1 - メチル - 4 - フェニ
 ル - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
 3 - [ベンジル - (2 - ジメチルアミノ - エチル) - アミノ] - 4 - (4 - クロロ - フェ
 ニル) - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
 3 - [ベンジル - (2 - ジエチルアミノ - エチル) - アミノ] - 4 - フェニル - ピロール 40
 - 2 , 5 - ジオン ;
 3 - [ベンジル - (2 - ジメチルアミノ - エチル) - アミノ] - 4 - (3 - メトキシ - フ
 エニル) - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
 3 - (4 - クロロ - フェニル) - 4 - [2 - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - エ
 チルアミノ] - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
 3 - [2 - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - エチルアミノ] - 4 - フェニル - ピ
 ロール - 2 , 5 - ジオン ;
 3 - フェニル - 4 - (ジエチルアミノ) - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
 3 - フェニル - 4 - (ベンジルアミノ) - ピロール - 2 , 5 - ジオン ;
 1 - メチル - 3 - フェニル - 4 - (2 - ジエチルアミノエチルアミノ) - ピロール - 2 , 50

5 - ジオン ;

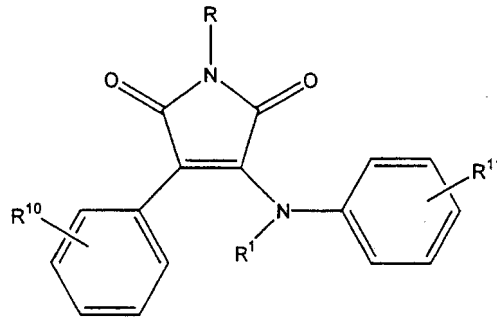
1 - アリル - 3 - フェニル - 4 - (2 - ジメチルアミノエチルアミノ) - ピロール - 2 ,
5 - ジオン ; および

1 , 3 - ジフェニル - 4 - ピペリジノ - ピロール - 2 , 5 - ジオン。

【 0 2 6 2 】

国際公開第 0 0 / 2 1 9 2 7 号パンフレットに開示されているように、完全に式 (I)
の範囲内にある式 (I C) :

【 化 6 】



10

の化合物のサブグループが存在する

(上式中、

20

R および R¹ は、式 (I) に関して定義されている通りであり ;

R¹⁰ は、水素を表すか、あるいは、アルコキシカルボニル、アルコシアルキル、パーフルオロアルキル、パーフルオロアルキル S -、パーフルオロアルキル O -、フェニル (ジ - C₁ ~₆ アルコキシ) C -、ベンゾイル、C₁ ~₆ アルキル S O₂ -、- [(C H = C H)₂] -、フェニル、ニトロ、- O C H₂ O -、ベンジルオキシ、フェノキシ、ハロ、ヒドロキシ、アルキル、アルコキシ、アミノ、モノ - またはジ - アルキルアミノ、あるいはチオアルキルからなるリストから選択される 1 つ以上、好適には最大 3 つの置換基を表し ;

R¹¹ は、水素を表すか、あるいは、置換または未置換 C₁ ~₆ アルキル、フェニル、ベンジル、置換または未置換 C₁ ~₆ アルキル S -、ハロ、ヒドロキシ、置換または未置換 C₁ ~₆ アルコキシ、置換または未置換フェノキシ、インドリル、ナフチル、カルボキシ、C₁ ~₆ アルコキシカルボニル、ベンジルオキシ、フェノキシ、ペンタフルオロフェノキシ、ニトロ、置換または未置換カルバモイル、置換または未置換 C₁ ~₆ アルキルカルボニル、ベンゾイル、シアノ、パーフルオロ C₁ ~₆ アルキル S O₂ -、C₁ ~₆ アルキル N H S O₂ -、オキサゾリル、置換または未置換フェニル S -、C₁ ~₆ アルキルピペラジニル -、C₁ ~₆ アルキルカルボニルピペラジニル -、1 , 2 , 3 - チアジアゾリル、ピリミジン - 2 - イルオキシ、N - [ピリミジン - 2 - イル] - N - メチルアミノ、フェニルアミノ、C₁ ~₆ アルキルスルホニルアミノ、N - モルホリニルカルボニル、シクロヘキシル、アダマンチル、トリチル、置換または未置換 C₁ ~₆ アルケニル、パーフルオロ C₁ ~₆ アルキル、パーフルオロ C₁ ~₆ アルコキシ、パーフルオロ C₁ ~₆ アルキル S -、アミノスルホニル、モルホリノ、(ジ C₁ ~₆ アルキル) アミノ、C₁ ~₆ アルキル C O N H -、(ジ C₁ ~₆ アルコキシ) フェニル (C H₂)_n N H C (O) C H (フェニル) S - (式中、n は 1 ~ 6 である)、および C₁ ~₆ アルキル C O N (C₁ ~₆ アルキル) -、チアゾリジンジオニル C₁ ~₆ アルキル、フェニル C H (O H) -、置換または未置換ピペラジニル C₁ ~₆ アルコキシ、置換または未置換ベンゾイルアミノ ; あるいは - (C H₂)_x -、- S C H = N -、- S C (C₁ ~₆ アルキル) = N -、- O C F₂ O -、- [C H = C H C (O) O] -、- [N = C H - C H C H] -、- C H = N - N H -、- C H = C H - N H -、- O C (N H C₁ ~₆ アルキル) = N -、- O C (O) N H -、- C (O) N M e C (O) -、C (O) N H C (O) -、(C H₂)_x C (O)、- N = N - N H -、- N = C (C₁ ~₆ アルキル) O -、- O (C H₂)_x O、(C H₂)_x S O₂ (C H₂)_y -、および - N (C₁ ~₆ アルキルカルボニル) (C H₂)_x - (式中、x および y は独立に 1 ~ 4 である) からなるリストから選択

30

40

50

される1つ以上、好適には最大3つの置換基を表す)。

【0263】

国際公開第00/21927号パンフレットに開示されているように、R、R¹、R¹⁰、およびR¹¹が式(IC)に関して定義されている通りである、式(IC)の範囲内の式(IC')の化合物のサブグループが存在し、ただし式(IC')は以下のものを含まない:

3-フェニルアミノ-4-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオン;

1-(4-メチルフェニル)-3-[(4-メチルフェニル)アミノ]-4-フェニル-1H-ピロール-2,5-ジオン;

3-(4-メチルフェニル)-1-フェニル-4-(フェニルアミノ)-1H-ピロール-2,5-ジオン; 10

1,3-ビス(4-メチルフェニル)-4-[(4-メチルフェニル)アミノ]-1H-ピロール-2,5-ジオン; および

3-(4-ニトロフェニル)-1-フェニル-4-フェニルアミノ-1H-ピロール-2,5-ジオン。

【0264】

好適には、Rは水素である。

【0265】

好適には、R¹は水素である。

【0266】

好適には、R¹⁰は、水素を表すか、あるいはハロ、ヒドロキシ、アルキル、アルキルチオ、アルコキシ、アミノ、またはメチレンジオキシからなるリストから選択される1つ以上の置換基、特に1つ以上のハロおよびアルキル基を表す。 20

【0267】

好都合には、R¹⁰は、水素を表すか、あるいは、2-Br、2-Cl、2-F、2-OMe、3-Cl、3-F、3-Me、3-NH₂、3-OMe、4-Br、4-Cl、4-I、4-Me、4-OH、4-OMe、4-SMe、2,3-ジ-F、2,5-ジ-F、2,6-ジ-F、3,4-ジ-F、3,5-ジ-F、2,3,5-トリ-F、2,4-ジ-Cl、2,4-ジ-OMe、3,4-(OCH₂O)、および3,5-ジ-Meからなるリストから選択される置換基を表す。 30

【0268】

より好都合には、R¹⁰は、2-Br、2-Cl、2-F、2-OMe、3-Cl、3-F、3-Me、4-Br、4-Cl、4-I、2,3-ジ-F、2,5-ジ-F、2,6-ジ-F、3,4-ジ-F、3,5-ジ-F、2,3,5-トリ-F、2,4-ジ-Cl、および3,5-ジ-Meからなるリストから選択される置換基を表す。

【0269】

好ましくは、R¹⁰は、2-F、2-OMe、3-F、4-Cl、および2,3-ジ-Fからなるリストから選択される置換基を表す。

【0270】

好適には、R¹¹は、水素を表すか、あるいは、2-F、2-Me、3-Br、3-Cl、3-F、3-I、3-OH、3-OMe、3-OPh、3-SMe、3-CO₂H、3-CH₂CO₂H、3-CH₂CO₂Me、3-CH₂CONH₂、3-CH₂CONHMe、3-CH₂OH、4-Cl、4-F、4-Me、4-NHCOMe、4-NHPh、4-NHSO₂Me、4-NMe₂、4-OMe、4-COPh、4-SMe、4-CH₂CN、4-SO₂NH₂、4-(CH₂)₂OH、4-CH(OH)Ph、4-CH₂SO₂NHMe、4-CH₂CO₂H、4-(CH₂)₂CO₂H、4-(CH₂)₂CO₂Me、4-(CH₂)₂CONH₂、4-(CH₂)₃CO₂H、4-(CH₂)₃CONH₂、4-CH=CHCO₂H、4-CH=CHCONH₂、4-OCH₂CO₂H、4-SCH₂CO₂H、4-S-[2-CO₂H-Ph]、4-S-[3-CO₂H-Ph]、4-CH₂(1,3-チアゾリジン-2,4-ジオン-5-イル)、2,3-ジ-F、2,4-ジ-F、3,4-ジ- 40 50

F、3,5-ジ-F、3-Cl-4-Br、3-Cl-4-Me、3-Br-4-Me、3-Cl-4-OH、3-Cl-4-OMe、3,5-ジ-Me、3,5-ジ-OMe、3,4-OC(O)NH-、3,4-OCF₂O-、3,5-ジ-Br-4-OH、3,5-ジ-Cl-4-Me、3,5-ジ-Cl-4-OH、3-CO₂H-4-[S-(2-CO₂H)-Ph]、3-CO₂H-4-[S-(2-CONHMe)-Ph]、3-CO₂H-4-Cl、3-F-4-Me、3-F-4-OMe、3,4-[(CH=N-NH)]-、3,4-[(N=N-NH)]-、3,4-[(NH-N=CH)]-、3,4-[(CH₂)₃]-、3,4-[(O(CH₂)₃O)]-、3,4-[O-C(NHMe)=N]-、3,4-[OCH₂O]-、3,4-[S-C(NHMe)=N]-、および3,4-[S-CH=N]-からなるリストから選択される1つ以上の置換基を表す 10

【0271】

好都合には、R¹¹は、水素を表すか、あるいは、2-F、2-Me、3-Cl、3-F、3-I、3-OMe、3-OPh、3-SMe、3-CH₂CO₂H、3-CH₂CO₂Me、3-CH₂CONH₂、3-CH₂CONHMe、3-CH₂OH、4-Cl、4-F、4-Me、4-NHCOMe、4-NHPh、4-NHSO₂Me、4-NMe₂、4-OMe、4-COPh、4-SMe、4-CH₂CN、4-SO₂NH₂、4-(CH₂)₂OH、4-CH(OH)Ph、4-CH₂SO₂NHMe、4-CH₂CO₂H、4-(CH₂)₂CO₂H、4-(CH₂)₂CO₂Me、4-(CH₂)₂CONH₂、4-(CH₂)₃CO₂H、4-(CH₂)₃CONH₂、4-CH=CHCONH₂、4-OCH₂CO₂H、4-SCH₂CO₂H、4-S-[2-CO₂H-Ph]、4-S-[3-CO₂H-Ph]、4-CH₂(1,3-チアゾリジン-2,4-ジオン-5-イル)、2,3-ジ-F、2,4-ジ-F、3,4-ジ-F、3,5-ジ-F、3-Cl-4-Br、3-Cl-4-Me、3-Br-4-Me、3-Cl-4-OH、3-Cl-4-OMe、3,5-ジ-Me、3,5-ジ-OMe、3,4-[OC(O)NH]、3,4-[OCF₂O]、3,5-ジ-Cl-4-Me、3-CO₂H-4-[S-(2-C(NHMe)-Ph)]、3-F-4-Me、3-F-4-OMe、3,4-[(CH=N-NH)]、3,4-[(N=N-NH)]、3,4-[(NH-N=CH)]、3,4-[(CH₂)₃]、3,4-[O(CH₂)₃O]、3,4-[O-C(NHMe)=N]、3,4-[OCH₂O]、3,4-[S-C(NHMe)=N]、および3,4-[S-CH=N]からなるリストから選択される1つ以上の置換基を表す。 20 30

【0272】

より好都合には、R¹¹は、3-Cl、3-Br、4-OMe、3,5-ジ-F、4-CH₂SO₂NHMe、4-(CH₂)₃CO₂H、および4-S-[3-CO₂H-Ph]からなるリストから選択される置換基を表す。

【0273】

特に挙げられる式(IC)の化合物は、RおよびR¹がそれぞれ水素を表し、R¹⁰およびR¹¹がそれぞれ以下のものを表す化合物である：

【0274】

【表 8】

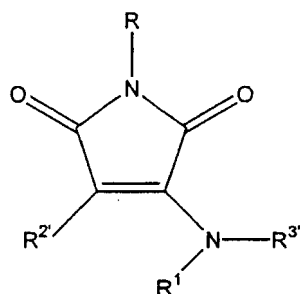
R^{10}	R^{11}
4-Cl	3-Cl
4-Cl	3-Br
2-OMe	4-OMe
4-Cl	4-CH ₂ SO ₂ NHMe
2-OMe	3,5-ジ-F
2-F	3,5-ジ-F
3-F	4-(CH ₂) ₃ CO ₂ H
2,3-ジ-F-Ph	3,5-ジ-F

10

【0275】

国際公開第00/21927号パンフレットに開示されているように、完全に式(I)の範囲内にある式(ID)：

【化7】



20

の化合物またはその第4級化塩のサブグループが存在する

(上式中、RおよびR¹は、式(I)に関して定義されている通りであり、

30

R²は、フェニル、置換フェニル、またはインドリルであり、

R³は、水素、アルキル、シクロアルキル、フェニル、置換フェニル、C₁~₆アルキルフェニル(このフェニル基は場合によっては置換されている)、アルコキシアルキル、置換または未置換ヘテロシクリルである)。

【0276】

一態様においては、式(ID)の化合物を除いた前述の定義の式(I)の化合物が提供される。

【0277】

R、R¹、R²、およびR³が式(ID)に関して定義されている通りであり、式(ID)の範囲内にある式(ID')の化合物のサブグループが存在し、ただし、式(ID')

40

は、以下の化合物(以降、リストD'と呼ぶ)を含まない：

3-[2-ベンゾ[b]チエン-2-イル-3-[4-(ジメチルアミノ)-2,5-ジヒドロ-2,5-ジオキソ-1H-ピロール-3-イル]-1H-インドール-1-イル]-カルバムイミドチオ酸, プロピルエステル；

3-(ジメチルアミノ)-4-(1-インドール-3-イル)-1-メチル-1H-ピロール-2,5-ジオン；

3-(1H-インドール-3-イル)-1-メチル-4-(フェニルアミノ)-1H-ピロール-2,5-ジオン；

3-(1H-インドール-3-イル)-1-メチル-4-[[4-(トリフルオロメチル)フェニル]アミノ]-1H-ピロール-2,5-ジオン；

50

- 3 - (1H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 4 - (メチルアミノ) - 1H - ピロール - 2, 5 - ジオン;
- 3 - (6 - クロロ - 9H - プリン - 9 - イル) - 4 - (1H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 1H - ピロール - 2, 5 - ジオン;
- 3 - (6 - アミノ - 9H - プリン - 9 - イル) - 4 - (1H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 1H - ピロール - 2, 5 - ジオン;
- 1 - アセチル - 3 - [2, 5 - ジヒドロ - 1 - メチル - 2, 5 - ジオキソ - 4 - [[4 - (トリフルオロメチル)フェニル]アミノ]] - 1H - ピロール - 3 - イル]] - 1H - インドール;
- 3 - アミノ - 4 - (1H - インドール - 3 - イル) - 1H - ピロール - 2, 5 - ジオン; 10
- 3 - アミノ - 4 - (5 - メトキシ - 1H - インドール - 3 - イル) - 1H - ピロール - 2, 5 - ジオン;
- 1H - インドール - 1 - カルボン酸, 3 - (4 - アミノ - 2, 5 - ジヒドロ - 1 - メチル - 2, 5 - ジオキソ - 1H - ピロール - 3 - イル) - , 1, 1 - ジメチルエチルエステル;
- 3 - (1H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 4 - [(フェニルメチル)アミノ] - 1H - ピロール - 2, 5 - ジオン;
- グリシン, N - [2, 5 - ジヒドロ - 4 - (1H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 2, 5 - ジオキソ - 1H - ピロール - 3 - イル] - , エチルエステル;
- 3 - アミノ - 4 - (1H - インドール - 3 - イル) - 1 - メチル - 1H - ピロール - 2, 5 - ジオン; 20
- 3 - [[3 - [(3 - アミノプロピル)アミノ]プロピル]アミノ] - 4 - (1H - インドール - 3 - イル) - 1H - ピロール - 2, 5 - ジオン;
- 3 - [[3 - [4 - (3 - アミノプロピル) - 1 - ピペラジニル[プロピル]アミノ]] - 4 - (1H - インドール - 3 - イル) - 1H - ピロール - 2, 5 - ジオン;
- 3 - (1H - インドール - 3 - イル) - 4 - [[3 - (4 - メチル - 1 - ピペラジニル)プロピル]アミノ] - 1H - ピロール - 2, 5 - ジオン;
- 1 - [3 - [(3 - アミノプロピル)アミノ]プロピル] - 3 - [[3 - [(3 - アミノプロピル)アミノ]プロピル]アミノ] - 4 - (1H - インドール - 3 - イル) - 1H - ピロール - 2, 5 - ジオン; 30
- 1 - [3 - [4 - (3 - アミノプロピル) - 1 - ピペラジニル]プロピル] - 3 - [[3 - [4 - (3 - アミノプロピル) - 1 - ピペラジニル]プロピル]アミノ] - 4 - (1H - インドール - 3 - イル) - 1H - ピロール - 2, 5 - ジオン;
- 3 - (1H - インドール - 3 - イル) - 1 - [3 - (4 - メチル - 1 - ピペラジニル)プロピル] - 4 - [[3 - (4 - メチル - 1 - ピペラジニル)プロピル]アミノ] - 1H - ピロール - 2, 5 - ジオン;
- 3, 3' - [イミノピス(3, 1 - プロパンジイルイミノ)]ピス[4 - (1H - インドール - 3 - イル) - 1H - ピロール - 2, 5 - ジオン];
- 3, 3' - [1, 4 - ピペラジンジイルピス(3, 1 - プロパンジイルイミノ)]ピス[4 - (1H - インドール - 3 - イル) - 1H - ピロール - 2, 5 - ジオン; 40
- 3 - アミノ - 4 - (3, 4 - ジメトキシフェニル) - 1H - ピロール - 2, 5 - ジオン;
- 3 - [(5 - アミノペンチル)アミノ] - 4 - (1H - インドール - 3 - イル) - 1H - ピロール - 2, 5 - ジオン;
- 3 - [[5 - [(2 - アミノエチル)アミノ]ペンチル]アミノ] - 4 - (1H - インドール - 3 - イル) - 1H - ピロール - 2, 5 - ジオン;
- 3 - [(2 - アミノエチル)アミノ] - 4 - (1H - インドール - 3 - イル) - 1H - ピロール - 2, 5 - ジオン;
- 3 - [(6 - アミノヘキシル)アミノ] - 4 - (1H - インドール - 3 - イル) - 1H - ピロール - 2, 5 - ジオン;
- 3 - [(7 - アミノヘプチル)アミノ] - 4 - (1H - インドール - 3 - イル) - 1H - 50

- ピロール - 2, 5 - ジオン ;
 3 - [[2 - [(2 - アミノエチル) アミノ] エチル] アミノ] - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2, 5 - ジオン ;
 ベンゼンプロパンアミド , - アミノ - N - [5 - [[2, 5 - ジヒドロ - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 2, 5 - ジオキソ - 1 H - ピロール - 3 - イル] アミノ] ペンチル] - , (S) - ;
 ペンタン酸 , 4 - アミノ - 5 - [[5 - [[2, 5 - ジヒドロ - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 2, 5 - ジオキソ - 1 H - ピロール - 3 - イル] アミノ] ペンチル] アミノ] - 5 - オキソ - , (S) - ;
 ペンタンアミド , 2 - アミノ - 5 - [(アミノイミノメチル) アミノ] - N - [2 - [[5 - [[2, 5 - ジヒドロ - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 2, 5 - ジオキソ - 1 H - ピロール - 3 - イル] アミノ] ペンチル] アミノ] エチル] - , (S) - ;
 ベンゼンプロパンアミド , - アミノ - N - [2 - [[5 - [[2, 5 - ジヒドロ - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 2, 5 - ジオキソ - 1 H - ピロール - 3 - イル] アミノ] ペンチル] アミノ] エチル] - , (S) - ;
 ブタンアミド , 4 - [(アミノイミノメチル) アミノ] - N - [5 - [[2, 5 - ジヒドロ - 4 - (1 H - インドール - 3 - イル) - 2, 5 - ジオキソ - 1 H - ピロール - 3 - イル] アミノ] ペンチル] - , (S) - ;
 3 - アミノ - 1, 4 - ジフェニル - 1 H - ピロール - 2, 5 - ジオン ;
 3 - (4 - メチルフェニル) - 1 - フェニル - 4 - [(フェニルメチル) アミノ] - 1 H - ピロール - 2, 5 - ジオン ;
 3 - アミノ - 4 - (4 - メチルフェニル) - 1 - フェニル - 1 H - ピロール - 2, 5 - ジオン ;
 3 - アミノ - 1 - メチル - 4 - p - トリル - 1 H - ピロール - 2, 5 - ジオン ;
 3 - (2 - ジエチルアミノ - エチルアミノ) - 4 - フェニル - ピロール - 2, 5 - ジオン ;
 3 - [ブチル - (2 - ジエチルアミノ - エチル) - アミノ] - 4 - フェニル - ピロール - 2, 5 - ジオン ;
 3 - [ベンジル - (2 - ジメチルアミノ - エチル) - アミノ] - 4 - フェニル - ピロール - 2, 5 - ジオン ;
 3 - [ベンジル - (2 - ジメチルアミノ - エチル) - アミノ] - 1 - メチル - 4 - フェニル - ピロール - 2, 5 - ジオン ;
 3 - [ベンジル - (2 - ジメチルアミノ - エチル) - アミノ] - 4 - (4 - クロロ - フェニル) - ピロール - 2, 5 - ジオン ;
 3 - [ベンジル - (2 - ジエチルアミノ - エチル) - アミノ] - 4 - フェニル - ピロール - 2, 5 - ジオン ;
 3 - [ベンジル - (2 - ジメチルアミノ - エチル) - アミノ] - 4 - (3 - メトキシ - フェニル) - ピロール - 2, 5 - ジオン ;
 3 - (4 - クロロ - フェニル) - 4 - [2 - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - エチルアミノ] - ピロール - 2, 5 - ジオン ;
 3 - [2 - (4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル) - エチルアミノ] - 4 - フェニル - ピロール - 2, 5 - ジオン ;
 3 - フェニル - 4 - (ジエチルアミノ) - ピロール - 2, 5 - ジオン ;
 3 - フェニル - 4 - (ベンジルアミノ) - ピロール - 2, 5 - ジオン ;
 1 - メチル - 3 - フェニル - (2 - ジエチルアミノエチルアミノ) - ピロール - 2, 5 - ジオン ; および
 1 - アリル - 3 - フェニル - 4 - (2 - ジメチルアミノエチルアミノ) - ピロール - 2, 5 - ジオン) 。
【 0 2 7 8 】
 好適には R^{2'} は、インドリル、フェニル、あるいは、ハロ、ハロアルキル、アルコキシ

10

20

30

40

50

、ニトロ、アルキル、およびアルコキシからなるリストから選択される1つ以上、好適には最大3つの置換基で置換されたフェニルである。

【0279】

$R^{2'}$ の例としては、フェニル、インドール-3-イル、2-メトキシフェニル、3-フルオロフェニル、3-ニトロフェニル、4-クロロフェニル、4-ヨードフェニル、4-(トリフルオロメチル)フェニル、および2,3-ジフルオロフェニルが挙げられる。

【0280】

好適には $R^{3'}$ は、水素、 $C_1 \sim 6$ アルキル、シクロヘキシル、フェニル、フルオレニル、 $C_1 \sim 2$ アルキルフェニル、 $C_1 \sim 6$ アルコキシ $C_1 \sim 2$ アルキル、あるいは、5または6個の環原子を有し、各環中に最大3個のヘテロ原子を有する置換または未置換の単環または単環または縮合環のヘテロシクリル基、例えばオキサゾリル、ベンゾフランニル、ジベンゾフランニル、ピリジニル、キノリニル、およびピリミジニルを表す。

10

【0281】

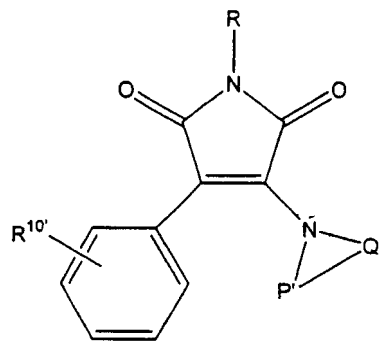
$R^{3'}$ の例としては、水素、エチル、シクロヘキシル、フェニル、フルオレン-2-イル、ベンジル、フェニル $(CH_2)_2$ -、 $MeO(CH_2)_2$ -、4-メチルオキサゾール-2-イル、2-アセチルベンゾフラン-5-イル、ジベンゾフラン-2-イル、ジベンゾフラン-3-イル、2-メチルピリジン-3-イル、2,6-ジメチルピリジン-3-イル、2-クロロピリジン-5-イル、キノリン-3-イル、ピリミジン-2-イルが挙げられる。

【0282】

国際公開第00/21927号パンフレットに開示されているように、完全に式(I)の範囲内にある式(IE)：

20

【化8】



30

の化合物のサブグループが存在する

(上式中、Rは、式(I)に関して定義されている通りであり；

$R^{10'}$ は、水素を表すか、あるいは、アルコキシ、ハロ、およびニトロからなるリストから選択される1つ以上、好適には最大3つの置換基を表し；

$P' - Q'$ は、 $(CH_2)_a O (CH_2)_b -$ 、 $(CH_2)_a S (CH_2)_b -$ 、 $-(CH_2)_c -$ 、 $-(CH_2)_d CH(G)(CH_2)_e -$ 、 $-(CH_2)_a N(ZZ)(CH_2)_b -$ を表し、 a 、 b 、 d 、および e は独立に1~4であり、 c は1~6であり、 ZZ は、水素、アルキル、アリール、またはアルキルカルボニルであり、 G は、アルキル、アミド、ヒドロキシアルキル、アラルキル、またはヒドロキシである)。

40

【0283】

R 、 $R^{10'}$ 、および $P' - Q'$ が式(IE)に関連して定義される通りである、式(IE)の範囲内にある式(IE')の化合物のサブグループが存在し、ただし、式(IE')は以下のものを含まない；

3-フェニル-4-ピペリジン-1-イル-ピロール-2,5-ジオン；

3-(4-メチルピペラジン-1-イル)-4-フェニル-ピロール-2,5-ジオン；

3-(4-エチルピペラジン-1-イル)-4-フェニル-ピロール-2,5-ジオン；

3-(4-クロロフェニル)-4-(4-メチル-ピペラジン-1-イル)-ピロール-

50

- 2, 5 - ジオン ;
 3 - (4 - メチルフェニル) - 4 - (4 - モルホリニル) - 1 - フェニル - 1 H - ピロール - 2, 5 - ジオン ;
 3 - フェニル - 4 - (4 - メチルピペラジノ) - ピロール - 2, 5 - ジオン ;
 3 - フェニル - 4 - (4 - フェニルピペラジノ) - ピロール - 2, 5 - ジオン ;
 1 - メチル - 3 - フェニル - 4 - (4 - フェニルピペラジノ) - ピロール - 2, 5 - ジオン ;
 1 - エチル - 3 - フェニル - 4 - (4 - クロロフェニルピペラジノ) - ピロール - 2, 5 - ジオン ;
 1 - アリル - 3 - フェニル - 4 - (4 - メチルピペラジノ) - ピロール - 2, 5 - ジオン ; および
 1, 3 - ジフェニル - 4 - ピペリジノ - ピロール - 2, 5 - ジオン。

【0284】

好適には、 $R^{10'}$ は、メトキシ、クロロ、またはニトロである。

【0285】

$R^{10'}$ の例としては、4 - メトキシ、4 - クロロ、2, 4 - ジクロロ、および 3 - ニトロが挙げられる。

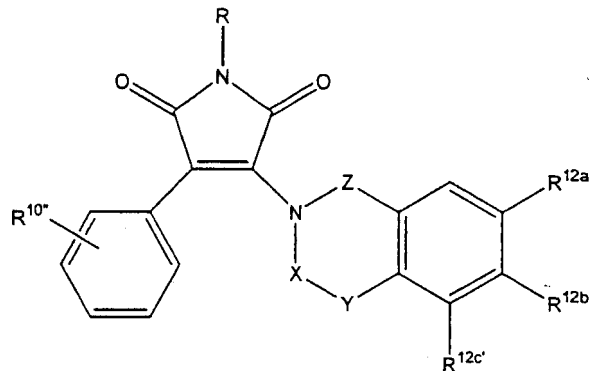
【0286】

- P' - Q' - の例としては、- (CH₂)₄ -、- (CH₂)₂O(CH₂)₂ -、- (CH₂)₃CH(Me)CH₂ -、- (CH₂)₃CH(CONH₂,)CH₂ -、- (CH₂)₃CH(CH₂OH)CH₂ -、- (CH₂)₂CH(CH₂Ph)(CH₂)₂ -、- (CH₂)₂CH(OH)(CH₂)₂ -、- (CH₂)₅ -、および - (CH₂)S(CH₂)₂ - が挙げられる。

【0287】

国際公開第 00 / 21927 号パンフレットに開示されているように、式 (I) の範囲内にある式 (I F) :

【化 9】



の化合物のサブグループが存在する

(上式中、R は、式 (I) に関して定義されている通りであり ;

$R^{10'}$ は、パーフルオロアルキル、ハロ、ニトロ、アルコキシ、アリアルカルボニル、アルキルからなるリストから選択される 1 つ以上、好適には最大 3 つの置換基であり ;

Z は、結合またはアルキレン鎖であり ;

- X - Y - は、- CH = N -、- (CH₂)_t -、- (CH₂)_uCH(U) -、- (U)CH(CH₂)_u -、- CH = CH -、- (CH₂)_vC(アルキル)₂ -、- C(O)C(アルキル)₂ -、- C(O)O - であり、t、u、および v は独立に 1 ~ 4 であり、U は、アルキル、カルボキシ、アルコキシカルボニル、ヒドロキシアルキル、およびアミドであり ;

$R^{12a'}$ 、 $R^{12b'}$ 、および $R^{12c'}$ はそれぞれ独立に、水素、ニトロ、アルコキシ、4 - エチルピペラジノ - 1 - イル、4 - BOC - ピペラジノ - 1 - イル、4 - メチル - ピペラジ

ン - 1 - イル、4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル、ハロ、アルキル、ピペラジン - 1 - イル、パーフルオロアルキル、およびアルキルスルホニルアミノである)。好適には、Z は、結合または $C_1 \sim 2$ アルキレン鎖である。

【0288】

Z の例としては、結合、メチレン、またはエチレンが挙げられる。

【0289】

X - Y - の例は、 $-CH=N-$ 、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-CH(Me)CH_2-$ 、 $-CH=CH-$ 、 $-CH(CO_2H)CH_2-$ 、 $-CH(CO_2Me)CH_2-$ 、 $-(CH_2)_3-$ 、 $-CH(CH_2OH)CH_2-$ 、 $-CH_2CH(CH_2OH)-$ 、 $-CH_2CH(Me)-$ 、 $-CH_2C(Me)_2-$ 、 $-CH(CONH_2)CH_2-$ 、 $-C(O)C(Me)_2-$ 、および $-C(O)O-$ である。

10

【0290】

$R^{12a'}$ 、 $R^{12b'}$ 、および $R^{12c'}$ の例としては、水素、ニトロ、フルオロ、メトキシ、4 - エチルピペラジン - 1 - イル、4 - BOC - ピペラジン - 1 - イル、4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル、4 - メチル - ピペラジン - 1 - イル、クロロ、プロモ、トリフルオロメチル、およびメタンサルホニルアミノが挙げられる。

【0291】

好ましくは、Z は結合である。

【0292】

好ましくは、 $-X-Y-$ は、 $-(CH_2)_2-$ または $-CH(CH_2OH)CH_2-$ 、 $-CH(Me)CH_2-$ 、 $-CH_2CH(Me)-$ 、または $-CH_2C(Me)_2-$ である。

20

【0293】

好ましくは、 $R^{12b'}$ はフッ素である。

【0294】

好ましくは、 $R^{12a'}$ はフッ素である。

【0295】

最も好ましくは、 R^{10} は、2 - Br、2 - Cl、2 - F、2 - OMe、3 - Cl、3 - F、3 - Me、4 - Br、4 - Cl、4 - I、2, 3 - ジ - F、2, 5 - ジ - F、2, 6 - ジ - F、3, 4 - ジ - F、3, 5 - ジ - F、2, 3, 5 - トリ - F、2, 4 - ジ - Cl、3, 5 - ジ - Me であり；

30

Z は結合であり；

$-X-Y-$ は、 $-(CH_2)_2-$ 、 $-CH(CH_2OH)CH_2-$ 、 $-CH(Me)CH_2-$ 、 $-CH_2CH(Me)-$ 、または $-CH_2C(Me)_2-$ であり；

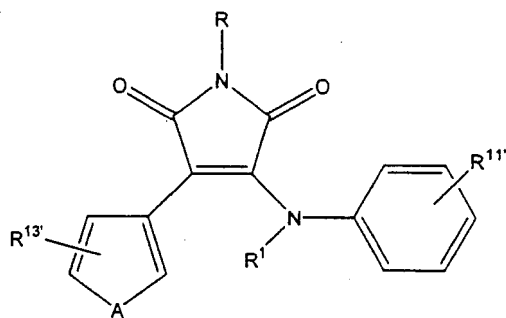
$R^{12b'}$ はフッ素であり；

$R^{12a'}$ はフッ素である。

【0296】

国際公開第 00 / 21927 号パンフレットに開示されているように、完全に式 (I) の範囲内にある式 (IG)：

【化 10】



40

の化合物のサブグループが存在する

50

(上式中、RおよびR¹は、式(I)に関して定義されている通りであり、
Aは、N(アルキル)、酸素、または硫黄である)。

【0297】

Aの例は、N(メチル)、酸素、および硫黄である。

【0298】

好ましくは、Aは硫黄である。

【0299】

R^{11''}は、水素、ハロ、アルキル、アルキルチオ、-S-CH=N-、フェノキシ、-(CH₂)_w-、ヒドロキシ、カルボキシ、-O(CH₂)_xO-、ヒドロキシアルキル、およびアルキルアミノスルホニルアルキルからなる群より選択される1つ以上、好適には最大3つの置換基であり、上式中、wおよびxは独立に1~4である。 10

【0300】

R^{11''}の例は、水素、プロモ、メチル、メチルチオ、クロロ、-S-CH=N-、フェノキシ、-(CH₂)₃-、ヒドロキシ、カルボキシ、-O(CH₂)O-、フルオロ、ヒドロキシメチル、およびMeNH₂SO₂CH₂-である。

【0301】

好ましくは、R^{11''}は、3-Br、4-Me、4-SMe、3-Br-4-Me、3-Cl、3,4-[S-CH=N]-、3-OPh、3,4-[(CH₂)₃]-、3-SMe、水素、3,5-ジBr-4-OH、3,5-ジCl-4-OH、3-CO₂H-4-Cl、3,4-[-OCH₂O]-、3-Cl-4-OH、3,5-ジF、3-CH₂OH、3-OH、または4-CH₂SO₂NHMeである。 20

R^{13'}は、-(CH=CH)₂-および水素からなる群より選択される1つ以上、好適には最大2つの置換基である。

【0302】

R^{13'}の例としては、4,5-[(CH=CH)₂]-および水素が挙げられる。

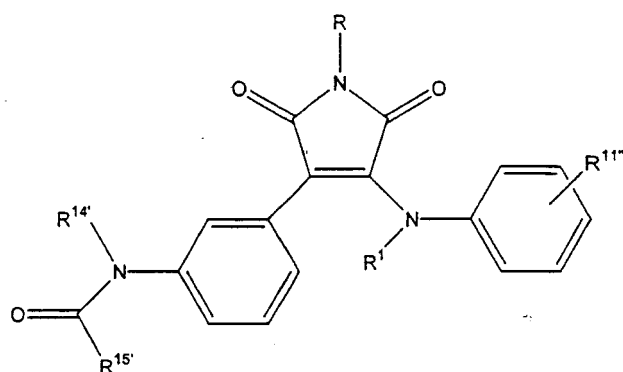
【0303】

好ましくは、R^{13'}は水素である。

【0304】

国際公開第00/21927号パンフレット、に開示されているように、完全に式(1)の範囲内にある式(IH)： 30

【化11】



40

の化合物のサブグループが存在する

(上式中、RおよびR¹は、式(I)に関して定義されている通りであり、

R^{11''}は-[(CH₂)_{aa}]であり、aaは1~4であり、

R^{14'}は水素であり、

R^{15'}は、アルキル、未置換または置換フェニルアミノ、未置換または置換フェニルアルキルアミノ、シクロヘキシルアミノ、アルケニルアミノ、フェニル、ベンジル、ステリル、またはアルキルアミノである)。

50

【0305】

R^{11''}の例としては3,4-[(CH₂)₃]が挙げられる。

【0306】

好適には、R^{15'}は、C₁~₆アルキル、(ハロフェニル)アミノ、フェニルアルキルアミノ、シクロヘキシルアミノ、プロペニルアミノ、フェニル、ベンジル、スチリル、プロピル、エチルアミノ、または(メトキシフェニル)アミノである。

【0307】

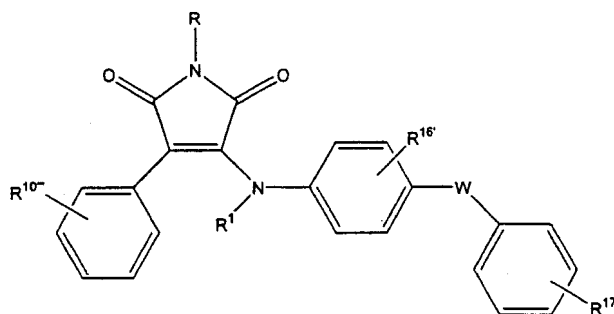
R^{15'}の例としては、メチル、(3-フルオロフェニル)アミノ、フェニルエチルアミノ、シクロヘキシルアミノ、プロペニルアミノ、フェニル、ベンジル、trans-スチリル、n-プロピル、エチルアミノ、および(3-メトキシフェニル)アミノが挙げられる。

10

【0308】

国際公開第00/21927号パンフレットに開示されているように、完全に式(I)の範囲内にある式(IJ)：

【化12】



20

の化合物のサブグループが存在する

(上式中、RおよびR¹は、式(I)に関して定義されている通りであり、

R^{10''}は、アルコキシまたはハロから独立に選択される1つ以上、好適には最大3つの置換基を表し、

R^{16'}は、水素、カルボキシ、アルコキシカルボニル、またはアルキルアミノカルボニルから独立に選択される1つ以上、好適には最大3つの置換基を表し、

30

R^{17'}は、カルボキシ、アルコキシカルボニル、ハロ、アルキルアミノカルボニル、ニトロ、または水素から独立に選択される1つ以上、好適には最大3つの置換基を表し、

Wは硫黄、酸素、置換または未置換のNHである)。

【0309】

好適には、Wは硫黄または酸素である。好都合には、Wは硫黄である。

【0310】

好適には、R^{10''}はC₁~₆アルコキシ、クロロ、またはフルオロである。

【0311】

R^{10''}の例は、メトキシ、4-クロロ、2-クロロ、および2,3-ジフルオロである。

40

【0312】

好都合には、R^{10''}は2,3-ジフルオロである。

【0313】

好適には、R^{16'}は、水素、カルボキシ、C₁~₆アルコキシカルボニル、またはC₁~₆アルキルアミノカルボニルである。

【0314】

R^{16'}の例は、カルボキシ、水素、エトキシカルボニル、メトキシカルボニル、およびメチルアミノカルボニルである。

【0315】

50

好都合には、 $R^{16'}$ は水素である。

【0316】

好適には、 $R^{17'}$ は、カルボキシ、 $C_1 \sim 6$ アルコキシカルボニル、ハロ、 $C_1 \sim 6$ アルキルアミノカルボニル、ニトロ、または水素である。

【0317】

$R^{17'}$ の例は、2 - カルボキシ、3 - カルボキシ、4 - カルボキシ、4 - クロロ、2 - メチルアミノカルボニル、4 - ニトロ、水素、および2 - エトキシカルボニルである。

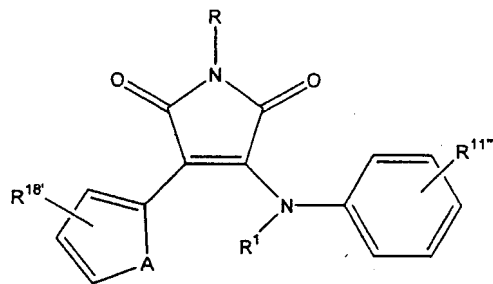
【0318】

好都合には、 $R^{17'}$ は3 - カルボキシである。

【0319】

国際公開第00/21927号パンフレットに開示されているように、完全に式(I)の範囲内にある式(IK)：

【化13】



の化合物のサブグループが存在する

(上式中、 R および R^1 は、式(I)に関して定義されている通りであり、

$R^{11'm}$ は、ハロおよびヒドロキシから独立に選択される1つ以上、好適には最大3つの置換基を表し、

$R^{18'}$ は、水素、アルキル、および $-(CH=CH)_2-$ から独立に選択される1つ以上、好適には最大3つの置換基を表し、

A は硫黄である)。

【0320】

好適には、 $R^{11'm}$ はクロロまたはヒドロキシである。

【0321】

$R^{11'm}$ の例は、3 - クロロおよび3, 5 - ジクロロ - 4 - ヒドロキシである。

【0322】

好適には、 $R^{18'}$ は、水素、 $C_1 \sim 6$ アルキル、または $-(CH=CH)_2-$ である。

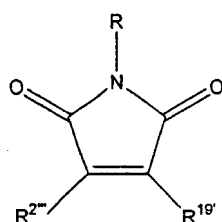
【0323】

$R^{18'}$ の例としては、水素、メチル、および3 - メチル - 4, 5 - $[(CH=CH)_2]$ - が挙げられる。

【0324】

国際公開第00/21927号パンフレットに開示されているように、完全に式(I)の範囲内にある式(IL)：

【化14】



10

20

30

40

50

の化合物またはその第4級化塩のサブグループが存在する

(上式中、Rは、式(I)に関して定義されている通りであり、

$R^{2'}$ は、未置換または置換ヘテロシクリル、または未置換または置換アリールであり

R^{19} は、未置換または置換ヘテロシクリルである)。

【0325】

R、 $R^{2'}$ 、および R^{19} が式(IL)に関連して定義される通りである、式(IL)の範囲内にある式(IL')の化合物のサブグループが存在し、ただし、式(IL')は以下の化合物(以降、リストLと呼ぶ)を含まない:

3-インドール-1-イル-4-(1-メチル-1H-インドール-3-イル)-ピロール-2,5-ジオン; 10

1-(1-メチル-2,5-ジオキソ-4-フェニルアミノ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-3-イル)-ピリジニウムクロリド;

1-1-(4-メチル-ペンチル)-2,5-ジオキソ-4-フェニルアミノ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-3-イル)-ピリジニウムクロリド;

1-(1-ドデシル-2,5-ジオキソ-4-フェニルアミノ-2,5-ジヒドロ-1H-ピロール-3-イル)-ピリジニウムクロリド;

3-[2,5-ジヒドロ-4-(1H-イミダゾール-1-イル)-1-メチル-2,5-ジオキソ-1H-ピロール-3-イル]-1H-インドール-1-カルボン酸, 1,1-ジメチルエチルエステル; 20

3-(1H-イミダゾ[4,5-b]ピリジン-1-イル)-4-(1H-インドール-3-イル)-1-メチル-1H-ピロール-2,5-ジオン;

3-(1H-インドール-3-イル)-1-メチル-4-(1H-ピロロ[2,3-b]ピリジン-1-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン;

3-(1H-インドール-3-イル)-1-メチル-4-(1-ピペリジニル)-1H-ピロール-2,5-ジオン;

3-[4-(ジフェニルメチル)-1-ピペラジニル]-4-(1H-インドール-3-イル)-1-メチル-1H-ピロール-2,5-ジオン;

3-(1H-ベンズイミダゾール-1-イル)-4-(1H-インドール-3-イル)-1-メチル-1H-ピロール-2,5-ジオン; 30

3-(1H-ベンゾトリアゾール-1-イル)-4-(1H-インドール-3-イル)-1-メチル-1H-ピロール-2,5-ジオン;

3-(1H-イミダゾール-1-イル)-4-(1H-インドール-3-イル)-1-メチル-1H-ピロール-2,5-ジオン;

3-(1H-インドール-1-イル)-4-(1H-インドール-3-イル)-1-メチル-1H-ピロール-2,5-ジオン;

3-(1H-インダゾール-1-イル)-4-(1H-インドール-3-イル)-1-メチル-1H-ピロール-2,5-ジオン;

3-[3-[(ジメチルアミノ)メチル]-1H-インドール-1-イル]-4-(1H-インドール-3-イル)-1-メチル-1H-ピロール-2,5-ジオン; 40

3-(1H-ベンズイミダゾール-1-イル)-4-(1H-インドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン;

3-(1H-インドール-1-イル)-4-(1-メチル-1H-インドール-3-イル)-1H-ピロール-2,5-ジオン; および

3-(3,5-ジメチル-1-フェニル-1H-ピラゾール-4-イル)-4-(4-モルホリニル)-1H-ピロール-2,5-ジオン。

【0326】

好適には、 $R^{2'}$ は、チエニル、フェニル、または1つ以上のハロゲン基で置換されたフェニルである。

【0327】

$R^{2'}$ の例としては、フェニル、3 - チエニル、2 - チエニル、4 - クロロフェニル、および 2, 4 - ジクロロフェニルが挙げられる。

【0328】

好都合には、 $R^{2'}$ は、フェニル、3 - チエニル、4 - クロロフェニル、または 2, 4 - ジクロロフェニルである。

【0329】

好適には、 $R^{19'}$ は、インドリニル、ピリジニウムハライド、アザピシクロオクタニル、またはトリアザスピロデカノニルである。

【0330】

$R^{19'}$ の例としては、インドリン - 1 - イル、3 - アミノ - 1 - ピリジニウムクロリド、2 - メチルインドリン - 1 - イル、1, 3, 3 - トリメチル - 6 - アザピシクロ [3, 2, 1] オクタン - 6 - イル、および 1 - フェニル - 1, 3, 8 - トリアザスピロ - [4, 5] - デカン - 4 - オン - 8 - イルが挙げられる。

【0331】

好都合には、 $R^{19'}$ は、インドリン - 1 - イル、または 2 - メチルインドリン - 1 - イルである。

【0332】

式 (I) のある化合物は少なくとも 1 つのキラル炭素を含有することができ、そのため 1 つ以上の立体異性体で存在することができる。本発明は、個別の異性体として、またはラセミ体などの異性体混合物としてのいずれかで、式 (I) の化合物の全ての異性体を含んでいる。

【0333】

本発明の特に好ましい化合物としては、3 - (2, 4 - ジクロロフェニル) - 4 - (1 - メチル - 1 H - インドール - 3 - イル) - 1 H - ピロール - 2, 5 - ジオン、および 3 - (3 - クロロ - 4 - ヒドロキシフェニルアミノ) - 4 - (2 - ニトロフェニル) - 1 H - ピロール - 2, 5 - ジオンが挙げられる。これらのマレイミドはそれぞれインビトロで GSK - 3 を 9 nM および 31 nM の K_i で阻害する (Coghlan et al., Chem. & Biol. 7 (10) : 793 - 803 (2000))。どちらの化合物も、GSK - 3 の アイソフォームを同様の強度で阻害した。

【0334】

GSK - 3 の別のマレイミド阻害剤 (すなわち、3 - アニリノ - 4 - アリールマレイミド) が、自動アレイ方法を使用して同定されている (Smith et al., Bioorg. Med. Chem. Lett. 11 (5) : 635 - 9 (2001))。

【0335】

プロテインキナーゼ C (PKC) 阻害剤であるマレイミド化合物の使用も本発明において考慮されている。このようなマレイミドとしては、RO - 31 - 8220、ビスインドリルマレイミド、インドロカルボゾール (indolocarbazole) K - 252a、ペリレンキノン、カルフォスチン C、カルフォスチン C、Go 6976、Go 6983、およびイソキノリンスルホンアミド H7 が挙げられる。これらのマレイミドの活性については、Debais et al., J. Cell. Biochem. 81 (1) : 68 - 81 (2001)、および Yang et al., Mol. Pharm. 61 (5) : 1163 - 73 (2002) を参照されたい。PKC アイソフォームに対して強い特異性を有する RO - 31 - 8220 などの PKC 選択的である物質が好ましい Schwaller et al., Br. J. Cancer 76 (12) : 1554 - 7 (1997)。

【0336】

SB - 216763 および SB - 415286 は GSK - 3 を阻害する 2 種類のマレイミドである。これらのマレイミドは、GSK - 3 をインビトロで阻害し、それぞれ K_i が 9 nM および 31 nM である Coghlan et al., Chem. & Biol. 7 (10) : 793 - 803 (2000)。どちらの化合物も、GSK - 3 の アイ

ソフォームを同様の強さで阻害した。

【0337】

マレイミドの別のグループは、ビスインドリルマレイミドIおよびIXであり、これらはGSK-3の強力な阻害剤であることが示されているHers et al., F E B S L e t t . 4 6 0 (3) : 4 3 3 - 6 (1 9 9 9))。GSK-3の別のマレイミド阻害剤(すなわち、3-アニリノ-4-アリアルマレイミド)が自動アレイ方法を使用して同定されているSmith et al., B i o o r g . M e d . C h e m . L e t t . 1 1 (5) : 6 3 5 - 9 (2 0 0 1))。

【0338】

GSK-3を調節することができる別のグループの化合物は、Akt-3(タンパク質キナーゼBまたはRAC-PKとも呼ばれる)調節化合物である。例えば、Akt-3阻害剤のRO 31-8220、スタウロスポリンMeasure et al., E u r . J . B i o c h e m . 2 6 5 (1) : 3 5 3 - 6 0 (1 9 9 9))、およびトポテカンNakashio et al., C a n c e r R e s . 6 0 : 5 3 0 3 - 0 9 (2 0 0 0))を、GSK-3の調節に使用することができる。RO 31-8220はPKC阻害剤であり、スタウロスポリンは広域スペクトルのキナーゼ阻害剤であるが、どちらもAkt-3活性を抑制する。

【0339】

あるグループのプロテインキナーゼC阻害剤も有効となり得る。好ましい阻害剤は、RO 31-7549、RO 31-8220、カルフォスチンC、およびイルモホシンなどの選択的阻害剤であるAmon et al., A g e n t s & A c t i o n s 3 9 (1 - 2) : 1 3 - 9 (1 9 9 3))。

【0340】

さらに別のGSK-3阻害剤およびモジュレーターは、当業者に周知である以下のアッセイを使用して調べることができる。次にこれらのアッセイを使用して同定された物質を、骨石灰化の増強を評価するための本明細書において開示されるインビボおよびインビトロアッセイを使用してさらに評価することができる。

【0341】

GSK-3調節化合物の評価のためのアッセイの1つでは、GSK-3ペプチドを使用する。このアッセイに使用されるGSK-3特異的ペプチドは、グリコーゲンシンターゼのリン酸化部位から誘導されたものであり、その配列は、Y R R A A V P P S P S L S R H S S P H Q (S) E D E E Eである。セリン(S)はあらかじめリン酸化されている。

【0342】

グリコーゲンシンターゼペプチドおよび[³³P]ATPを調製するために使用されるバッファーは、25mMのMOPS、0.2mMのEDTA、10mMの酢酸マグネシウム、0.01%のツイーン(Tween)-20、および7.5mMのメルカプトエタノールからなりpH7である。これらの化合物をジメチルスルホキシド(DMSO)中に溶解させて最終濃度を100mMにする。DMSO中で種々の濃度を調製し、基質(すなわち、GSK-3ペプチド)溶液(最終濃度20μMまで)を、ウサギまたはヒトのGSK-3およびGSK-3(最終濃度0.5U/mL酵素)とともに混合する。[³³P]ATP(500cpm/pmol)を11回少量ずつATP混合物(最終濃度10μM)に加えて反応を開始する。室温で30分後、10μLのH₃PO₄/0.01%ツイーン-20(2.5%)を添加することによって反応を終了させる。ある体積(10μL)のこの混合物をP-30ホスホセルロース紙上にスポットする。この紙を、各洗浄に2分かけてH₃PO₄(0.5%)で4回洗浄し、風乾して、合成グリコーゲンシンターゼペプチド中に放射性ホスフェートを混入し、これをP-30ホスホセルロース紙と結合させ、シンチレーションカウンターを使用して計数する。

【0343】

GSK-3阻害性化合物をスクリーニングするための別の方法は、ビオチン化ペプチドをリン酸化するキナーゼの能力に基づいており、このビオチン化ペプチドは、グリコーゲ

ンシンターゼのリン酸化部位から誘導され、その配列は、B i o t - K Y R R A A V P P S P S L S R H S S P H Q (S) E D E E E であり、式中の「B i o t」はビオチン部分を意味する。セリン (S) はあらかじめリン酸化されたセリンであり、インビボにおけるグリコーゲンシンターゼと同様である。リン酸化されたビオチン化ペプチドを次に、ストレプトアビジンをコートした S P A ビーズ (アマシャム・テクノロジー (A m e r s h a m T e c h n o l o g y)) 上に捕捉させて、これによって、ビーズ中に含まれるシンチラントを介して³³Pからの信号を増幅させることができる。

【0344】

0.01%のツイーン-20、7.5mMの2-メルカプトエタノール、10mMの酢酸マグネシウム、および10μMの[⁻³³P]-ATPを含有するpH7の25mMのMOPSバッファー中10nMの最終濃度でこのキナーゼを分析する。室温で60分間インキュベートした後、ストレプトアビジンをコートしたS P A ビーズを含有する50mMのEDTA溶液を添加することによって反応を停止させると、384マイクロタイタープレート中のアッセイウェル1つ当たり0.5mgのビーズを最終的に含有する。他のプレートを適宜使用することもできる。

【0345】

100%DMSO中の本発明の化合物の10mMストック溶液を、スクリーニング方法の第1のステップとして調製する。第2のステップは、用量反応プレートの作製を含み、ここでこれらの化合物がプレート全体で希釈され、キナーゼアッセイにおける最終低濃度および高濃度が0.008μMおよび10μMとされる。第3のステップは、アッセイプレートの作製を含む。これは、4つの96用量反応プレートからの化合物を384アッセイプレートに移すことによって実施することができる。第4のステップでは、前述のアッセイを実施して、マイクロベータ (m i c r o b e t a) 液体シンチレーションおよびルミネセンスカウンタを使用して得られたプレートの計数を行う。最終ステップは、データ収集および解析であり、ここで各化合物のIC50値が求められる。

【0346】

好ましくは、本発明の最も強力な化合物は、約1~10nMの間の範囲のIC50値を示す。

【0347】

さらに別のアッセイにおいては、プロテインキナーゼC (P K C) ペプチドを使用する。このP K C ペプチドは、ウシミエリン塩基性タンパク質 (残基4~14) のフラグメントであってよい。この配列はP K C の特異的基質である。ミエリン塩基性タンパク質および[⁻³³P]-ATPの調製に使用したバッファーは、10mMのトリス (T r i s) 、0.9mMのEGTA、200μMの塩化カルシウム、10mMの塩化マグネシウム、および最終濃度40μg/mLのL-a-ホスファチジル-L-セリン、および1μg/mLの1,3ジオレインからなりpH7.50であった。

【0348】

候補化合物またはその他の試薬をジメチルスルホキシド (D M S O) 中に溶解させて、最終濃度を100mMにする。DMSO中で種々の濃度にして、前述のように基質 (すなわち、ミエリン塩基性タンパク質) 溶液 (最終濃度0.1mg/mLまで) を、関連のヒト組換えP K C アイソフォーム (最終濃度88mU/mL) とともに混合する。[⁻³³P]-ATP (500cpm/pmol) を少量ずつATPの混合物 (最終濃度10μM) 中に加えて反応を開始する。室温で20分放置した後、15μLの反応物をP-30ホスホセルロース紙上にスポットした。この紙を、各洗浄に2分かけて0.5% H₃PO₄で4回洗浄し、風乾して、ミエリン塩基性タンパク質中に放射性ホスフェートを混入し、これをP-30ホスホセルロース紙と結合させ、マイクロベータシンチレーションカウンタを使用して計数する。これらのアッセイは、骨リモデリングに関与するとして本明細書において検討されるあらゆる他のタンパク質を調製する化合物の同定に使用するために修正することができる。

【0349】

(7.1.2 PKA阻害剤)

GSK-3阻害剤に関して前述したように、PKA阻害剤も類似の用途を有する。好ましいPKA阻害剤としては、限定するものではないが、H89(カルビオケム)が挙げられる。別のPKA阻害剤としては、限定するものではないが、タンパク質キナーゼA阻害剤5-24、阻害剤6-22アミド、および阻害剤14-22アミド(カルビオケム)が挙げられる。

【0350】

(7.1.3 PKC阻害剤)

GSK-3阻害剤に関して前述したように、PKC阻害剤も同様の用途を有する。意図されるPKC阻害剤としては、限定するものではないが、PKC阻害剤20-28ミリストイル化物、EGF-Rフラグメント651-658ミリストイル化物、Ro 31-8425、Ro 32-0432などが挙げられる(カルビオケム)。

【0351】

(7.1.4 MEK1/2阻害剤)

GSK-3阻害剤に関して前述したように、MEK1/2阻害剤も同様の用途を有する。MEK1/2阻害剤としては、限定するものではないが、U0126(カルビオケム)およびPD98059(カルビオケム)が挙げられる。

【0352】

(7.1.5 MAPK阻害剤)

GSK-3阻害剤に関して前述したように、MAPK阻害剤も同様の用途を有する。意図されるP38 MAPK阻害剤としては、限定するものではないが、SB203580(Ishizuka et al., J. Immunol. 167(4):2298-304(2001)、カルビオケムより入手可能である)、SB202190(Karashii et al., Biochim. Biophys. Acta 1502(2):207-23(2000))、PD169316(Paine et al., J. Biol. Chem. 275(15):11284-290(2000))、fr-167653(Matsuoka et al., Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 283:L103-12(2002))、[trans-1-(4-ヒドロキシシクロヘキシル)-4-(4-フルオロフェニル)-5-(2-メトキシピリジミジン-4-イル)イミダゾール](Underwood et al., Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol. 279(5):L895-902(2000))、および2-(4-クロロフェニル)-4-フルオロフェニル)-5-ピリジン-4-イル-1,2-ジヒドロピラゾール-3-オン(カルビオケム)が挙げられる。

【0353】

(7.1.6 JNK阻害剤)

GSK-3阻害剤に関して前述したように、c-Junアミノキナーゼ(JNK)経路阻害剤も同様の用途を有する。使用が意図されるJNK阻害剤としては、限定するものではないが、SP-600125(カルビオケム)、K252aファミリーCEP-1347/KT-7515のインドロカルバゾール(Saporito et al., Prog. Med. Chem. 40:23-62(2002))；およびMaroney et al., J. Neurochem. 73(5):1901-12))、およびJNKと結合するJNK-相互作用タンパク質-1(JIP-1)ペプチド(Barr et al., J. Biol. Chem. 277(13):10987-97(2002))が挙げられる。

【0354】

(7.1.7 カルシウム動態阻害剤)

GSK-3阻害剤に関して前述したように、カルシウム動態阻害剤も、骨石灰化およびWnt経路の調製およびそれらの研究において同様の用途を有する。好ましいカルシウム動態阻害剤の1つは、カルビオケム製造の[8-(ジエチルアミノ)オクチル-3,4,

10

20

30

40

50

5 - トリメトキシ安息香酸 HCl (TMB - 8) である。

【0355】

(7.1.8 MAPKAPK2 阻害剤)

マイトジェン活性化タンパク質キナーゼ活性化タンパク質キナーゼ - 2 (MAPKAPK2) 阻害剤も、GSK-3 阻害剤に関して前述したものと同一目的に使用することができる。MAPKAPK2 は、前述のように MAPK の下流の基質である。したがって、MAPK の阻害剤は MAPKAPK2 も阻害する。MAPKAPK2 阻害剤としては、限定するものではないが、Hsp25 キナーゼ阻害剤 (カルビオケム、カタログ番号 385880) および SB203580 (Ishizuka et al., J. Immunol. 167 (4): 2298-304 (2001)) が挙げられる。

10

【0356】

(7.1.9 G タンパク質共役型シグナリング阻害剤)

百日咳毒素 (シグマ (Sigma)) などの G タンパク質共役型シグナリング阻害剤も、GSK-3 阻害剤に関して本明細書で前述したようなアッセイに使用することができる。他の G タンパク質共役型シグナリング阻害剤を使用することもできる。

【0357】

(7.1.10 酸化窒素シンターゼ阻害剤)

酸化窒素シンターゼ (NOS) 阻害剤も、GSK-3 阻害剤に関して本明細書で前述した使用と類似する方法での使用が意図されている。意図される NOS 阻害剤としては、限定するものではないが、N(G)-ニトロ-L-アルギニン (L-NNA) (Clark et al., Resuscitation 57 (1): 101-8 (2003))、および L-NAME (シグマ) が挙げられる。

20

【0358】

(7.1.11 COX-2 阻害剤)

COX-2 阻害剤も、GSK-3 阻害剤に関して本明細書で前述したものと類似の使用が意図される。COX-2 阻害剤としては、限定するものではないが、インドメタシン (シグマ)、VIOXX (ロフェコキシブ、メルク・アンド・カンパニー (Merck & Co.))、CELEBREX (セレコキシブ、G.D. サール・アンド・カンパニー (G.D. Searle & Co.))、2-アミノスルホニルフェニル-3-フェニル-インドール 5a (Huet al., Bioorg. Med. Chem. 11 (7): 1153-60 (2003))、および SC-560 (Pinheiro et al., Inflamm. Res. 51 (12): 603-10 (2002)) が挙げられる。

30

【0359】

(7.2. 核酸およびポリペプチド)

Wnt 経路、あるいは、骨負荷単独または他の物質の併用に対する応答でアップレギュレートまたはダウンレギュレートするとして挙げられているあらゆるタンパク質 / 遺伝子を調節する (好ましくは活性化する) 核酸も本明細書において考慮される。好ましくはこれらの核酸は、骨リモデリングを増強して骨密度を高める。本発明において考慮される核酸としては、遺伝子のセンス鎖またはアンチセンス鎖、あるいは遺伝子の転写物のいずれかに結合するアンチセンス化合物が挙げられる。RNA 干渉を促進する低分子阻害性 RNA (siRNAs) も意図される核酸に含まれる。アンチセンス分子および siRNA 分子の好適な標的としては、GSK および カテニン、LRP5、LRP5、axin、および Wnt 経路の他のあらゆるメンバーが挙げられる。

40

【0360】

Wnt 経路を調節するポリペプチドも考慮される。このようなポリペプチドとしては、免疫グロブリン、ペプチドアプタマー、遮断化合物などが挙げられ、これらについて以下に詳細に説明する。

【0361】

(7.2.1. RNA 干渉)

50

骨石灰化と関連するWnt経路中のタンパク質は、RNA干渉(RNAi)を利用して、分析するか、または治療目的で調節することもできる。これは、転写後の遺伝子サイレンシングに関する技術であり、標的遺伝子の活性が対応する二本鎖RNA(dsRNA)によって特異的に無効化される。RNAiは、多くの態様において植物のPTGSと類似しており、トリパノソーマ、ヒドラ、プラナリア、線虫、およびショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)などの多くの無脊椎動物で見いだされている。RNA干渉は、転移因子の動員および抗ウイルス状態の形成の調節と関連し得る。哺乳類系のRNA干渉は、国際公開第00/63364号パンフレットに開示されており、この記載内容全体が参照により本明細書に組み入れられる。基本的に、標的(例えば、GSK-3またはカテニン、あるいは、骨負荷単独または他の物質との併用に対する応答でアップレギュレートおよびダウンレギュレートする遺伝子と記載されている本明細書のいずれかの表の遺伝子のRNAと相同)と相同のdsRNAが細胞中に導入されると、遺伝子活性の配列特異的な低下が観察される。低分子干渉RNA(siRNA)および低分子ヘアピンRNA(shRNA)の、このような使用も考慮される。例えば、Yuet al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99:6047-6052 (2002); Paddison et al., Genes & Dev., 16:948-58 (2002); Brummelkamp et al., Science 296:550-53 (2002); Tuschl, (2002) Nature Biotechnology 20:446-8 (2002); およびこれらに記載されている参考文献を参照されたい。これらの部分は、骨リモデリングのさらなる特性決定のためのリサーチツール、および被験体中の骨リモデリングを調節する試薬として使用することができる。

【0362】

RNAi技術を使用して研究するために、Wnt経路中の特に対象となる遺伝子の1つはカテニンである。カテニンは、古典的Wnt経路の重要成分の1つである。この経路が活性化されると、カテニンがリン酸化されなくなり、そのため細胞質中に蓄積されて、核内に移動する。核内に入ると、カテニンはTCFおよびLEFなどの標的転写因子の阻害剤を除去し、それによって転写を活性化させる。

【0363】

これらの実験は、図15に示される経路中のあらゆる遺伝子を使用することができ、いずれかの表に記載されるアップレギュレートおよびダウンレギュレートする遺伝子を使用することもできる。例えば、カテニンRNAiをMC3T3細胞(または他の好適な骨細胞系)にトランスフェクトすることができる。次に、前述のようにしてこれらの細胞に負荷を5時間与える。続いて、リアルタイムPCR(またはRNAを分析するための他の手段)をこれらの遺伝子に対して実施することができる。コネキシン43、オステオネクチン、OPG、eNOS、COX-2、PTGS、IL-6、サイクリンD1、Frizzled 2、Wnt 10B、SFRP1、およびSFRP4などの遺伝子、あるいは骨負荷および/またはWnt経路調節に対する応答で調節されると本明細書に記載されるあらゆる遺伝子について、遺伝子発現が評価される。

【0364】

どの負荷応答遺伝子がLRP5発現に依存するかを特異的に同定するために、MC3T3細胞にLRP5 RNAiをトランスフェクトすることができる。カテニンRNAiを使用する実験と同様に、LRP5 RNAiの存在下および非存在下で負荷を与えた細胞の間の遺伝子発現の応答も評価される。LRP5発現が阻害されることが確認され、LRP5 RNAi処理サンプルとの差異が認められない場合、LRP6(LRP5に近いファミリーメンバー)がLRP5機能を補うことも可能である。これに対処し、LRP6の寄与が観察されるかどうかを評価するために、MC3T3細胞に、LRP6 RNAi単独、ならびにLRP6およびLRP5の複合のRNAiをトランスフェクトすることができる。したがって、この場合、RNAiは、LRP5およびLRP6の互いの相対的な活性および骨リモデリングをさらに特性決定するために使用される。

【0365】

より具体的には、RNA干渉実験を以下のように実施することができる。MC3T3細胞などの骨細胞を、パイオフレックス6ウェルプレート中で、増殖培地を使用して、80%コンフルエントになるまで3日間培養する。次に培地を除去して、細胞を2mLのOptiMEM(インビトロジェン)で洗浄する。10 μ Lのリポフェクタミン2000(ウェル当たり)を250 μ LのOptiMEM中にあらかじめ希釈することによって、DNA/リポフェクタミン(Lipofectamine)2000混合物を調製する。次に、この混合物を、250 μ LのOptiMEM中の4 μ gの二本鎖RNAiと混合する。OptiMEMを細胞から除去して、混合したDNA/リポフェクタミン混合物(合計500 μ L)をこの細胞に加え、37 $^{\circ}$ Cで4時間インキュベートする。次に培地を、増殖培地または0.25%BSAを含有する無血清培地のいずれかと交換し、24時間インキュベートする。次に、本明細書において前述したように、細胞に50~5,000 μ (例えば、3,400 μ)の機械的負荷を与える。

10

【0366】

次に、RNAを回収する。RNAは、機械的負荷を与えた直後に回収することができ、その後の任意の時点(例えば、負荷の24時間後)で回収することもできる。次に、リアルタイムPCRなどの本明細書に記載されるいずれかの方法を使用して、このRNAを分析する。

【0367】

(7.2.2 アンチセンス化合物)

本発明の別の態様においては、Wnt経路調節(好ましくはWnt経路の活性化およびそれによる骨石灰化)に関係するタンパク質は、診断、研究、および治療の目的のためにアンチセンス化合物を使用して変化させることができる。

20

【0368】

例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドの調製は以下のように行うことができる。骨芽細胞様マウス細胞系のMC3T3においてアンチセンス技術を使用する研究が行われている。これらの細胞は、骨分化配列に沿った発達を引き起こすことができる。初期増殖期間は、分化マーカーの最小限の発現、およびコラーゲン様細胞外マトリックスの初期合成を特徴とする。コラーゲンマトリックス合成には、後の分化マーカーの誘導が必要である。マトリックス合成が開始すると、骨芽細胞マーカー遺伝子が明確な時系列で活性化し、早期にアルカリホスファターゼが誘導され、分化過程の後期に骨シアロタンパク質およびオステオカルシンが現れる。遺伝子発現のこの時系列は、成熟および石灰化過程のモニタリングに有用である。成熟が開始してから数日後に開始するマトリックス石灰化では、細胞層と培養プレートとの界面付近のマトリックスの深部でコラーゲン原繊維の上および内部に無機物が堆積する。培養した骨芽細胞によって形成されたこのコラーゲン原繊維の無機物は、インビボでの線維性骨中に見られるものと類似しており、そのため、試薬の研究によく利用される。

30

【0369】

製造元の明細書(米国特許第5,849,902号明細書)によると、分化の第1週に、MC3T3細胞(または他の好適な骨細胞系)にアンチセンスオリゴヌクレオチドがトランスフェクトされる。典型的には、アンチセンスオリゴヌクレオチドはMC3T3などの骨細胞にトランスフェクトされる。次に、製造元の説明書、または当分野において既知の他の手順によって、細胞からRNAが単離される。ノーザン分析、リアルタイムPCR、または別のRNAアッセイが行われて、アンチセンスポリヌクレオチドの効果が分析される。さらに、転写プロファイリングを行って、Wntシグナリングに関与するタンパク質をコードする遺伝子に対するアンチセンス化合物のWnt経路への影響を研究することができる。

40

【0370】

(7.3 ポリペプチド)

Wnt経路を調節し、好ましくはアップレギュレートする(それによって骨石灰化を増

50

強する) 核酸以外に、ポリペプチド、および生物活性を有するそのフラグメント、ならびにアプタマーも考慮される。好適なタンパク質および生物活性を有するフラグメントとしては、ポリペプチドおよびアプタマー(図16に記載の経路のタンパク質を調節する、例えば、GSK-3およびカテニンが挙げられる。活性調節することができるあらゆる種類の免疫グロブリン(例えば、抗体)(例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ファージ抗体(Cat技術)、およびそれらのフラグメント)も考慮される。

【0371】

前述のインビトロ荷重実験は、負荷応答遺伝子、およびそのコードするタンパク質(すなわち、骨負荷遺伝子プロファイル)から他の既知の合成Wnt経路アゴニスト(例えば、他のGSK-3阻害剤様化合物)、天然Wnt経路リガンド、および合成リガンドへの遺伝子応答を調べるために使用することもできる。

10

【0372】

Wnt経路の活性化レベルは、MC3T3細胞(または他の好適な骨細胞系)中で、限定するものではないが、Wnt 1およびWnt 3A、小分子Wntミメティック、およびLRP5と相互作用しWntシグナリングを活性化させるペプチドアプタマー(例えば、アプタマー262)などの既知のWnt経路アクチベーターを使用して評価することができる。このようなアッセイは、Wntアンタゴニストの研究に使用することもできる。

【0373】

Wntアンタゴニストとしては、限定するものではないが、Dkk1および小分子Dkk1アンタゴニストが挙げられる。同様に、Wntアンタゴニストに対する遺伝子活性および調節は、例えばTCF-ルシフェラーゼレポーターコンストラクトを使用して評価することができる。TCF-ルシフェラーゼレポーターは、Wnt経路活性に対する機械的荷重自体の影響を調べるために使用することができる。

20

【0374】

例えば、MC3T3細胞は、前述のように播種して、コンフルエントになるまで3日間培養することができる。BSAを含有する無血清培地またはMEMを含有する低血清培地(1%FBS)のいずれかと培地を交換し、続いて24時間インキュベートする。荷重を与える1時間前、1セットのプレートは、ある用量範囲のWntアゴニスト(例えば、GSK-3阻害剤またはDkk1アンタゴニスト)で予備処理し、同様のコントロールのセットは予備処理を行わない。Wnt 1、Wnt 3A、およびDkk1に関する実験の場合、これらの特異的cDNAコンストラクト(またはコントロールセクター(control vector))を一過性にトランスフェクトした293細胞からの馴化培地を、これらのタンパク質の供給源として使用することができる。Wnt 1、Wnt 3A、およびDkk1の馴化培地を調製するために、100mmの培養皿当たり10μgのプラスミドDNAを使用し、製造元の説明通りにリポフェクタミン2000(インビトロジェン)を使用して293細胞にトランスフェクトすることができる。293細胞のトランスフェクションから48時間後、馴化培地を回収し(合計10mL)、遠心分離して細胞片を除去し、等分して、後のMC3T3細胞FlexerCell実験のために-70で凍結させる。したがって、Wntミメティックリガンド、小分子、または他のWnt経路モジュレーター(例えば、Wnt3A)のいずれかを使用してMC3T3細胞の予備処理を行った後、前述のようにMC3T3骨細胞に機械的荷重を与える。Qiagen Rneasyミニキットまたは他の手段を使用して、荷重直後および荷重を与えた後のある時点で、荷重を与えたサンプルおよび与えていないコントロールサンプルからRNAを回収する。所望の時点で、リアルタイムPCRを負荷識別特性セット遺伝子に対して行い、処理による遺伝子発現の変化を観察する。

30

40

【0375】

Wnt経路の活性の測定を伴う実験の場合、TCF-ルシフェラーゼレポーターシステムなどによる一過性トランスフェクションを行うことができる。より具体的には、製造元の説明通りにトランスファスト(TransFast)トランスフェクション試薬(プロ

50

メガ、ウィスコンシン州マディソン)を使用して1ウェル当たり約2.5 µgの16 × TCF(TK)-ルシフェラーゼおよび0.5 µgのTK-Renilla-ルシフェラーゼを使用して、80%コンフルエントの骨細胞にトランスフェクトされる。あらかじめ希釈したDNA(1 mLの基本MEM中)を、8 µLのトランスファスト試薬と混合し、30分間インキュベートする。この時点で、細胞から増殖培地を除去し、1 mLの基本MEMを各ウェルに加え、30分間インキュベートする。30分間のインキュベーションの後、細胞から培地を吸引し、次にトランスファスト/DNA混合物をこれらの細胞に加え、37°Cで1時間インキュベートする。あるグループのサンプルは、0.25%BSAを含有する無血清培地を加える(2 mL)。別のグループには、2 mLの増殖培地を加える。次に培養物を終夜インキュベートして、培地を除去し、1 mLのBSAを含有する無血清MEMと交換する。これらの細胞に機械的負荷を与え、24時間、または他の好適な時間の間インキュベートし、次にルシフェラーゼ測定を行う。ルシフェラーゼ活性は、300~500 µLのパッシブ・リシス(passive lysis)バッファー(プロメガ、ウィスコンシン州マディソン)を加えて細胞を溶解させた後、デュアルルシフェラーゼレポーターアッセイシステム(プロメガ)を使用して測定される。

10

【0376】

(7.4 免疫グロブリン)

別の態様においては、免疫グロブリンが単独で使用されるか、または治療、診断、スクリーニング、併用療法などと併用される。タンパク質アレイの形態で使用される場合、免疫グロブリンまたはその結合フラグメント(例えばFab)を使用して、骨負荷/応力、骨負荷/応力の増大などに応答するタンパク質のスクリーニングのための好適な基体に結合させることができる。好適な免疫グロブリンは、機械的負荷に応答する、または機械的負荷を増強するとして本明細書で挙げられているタンパク質またはタンパク質フラグメントと結合するあらゆる免疫グロブリンである。モノクローナル抗体などの抗体の製造元としては、アブカム(Abcam)、ベチル・ラボラトリーズ・インコーポレイテッド(Bethyl Laboratories Inc.)、バイオソース・インターナショナル・インコーポレイテッド(BioSource International Inc.)、ボストン・バイオロジカルズ・インコーポレイテッド(Boston Biologicals Inc.)、カルビオケム・ノババイオケム・コーポレーション(Calbiochem-Novabiochem Corp.)、ICNバイオメディカルズ・インコーポレイテッド(ICN Biomedicals Inc.)、モビテック(MoBiTec)、オックスフォード・バイオメディカル・リサーチ(Oxford Biomedical Research)、プロメガ・コーポレーション(Promega Corp.)、リサーチ・ダイアグノーシス・インコーポレイテッド(Research Diagnostics Inc.)、ロックランド・イムノケミカルズ・インコーポレイテッド(Rockland Immunochemicals Inc.)、サンタ・クルーズバイテクノロジー(Santa Cruz Biotechnology)、シグマ・アルドリッチ(Sigma-Aldrich)、シグマ・RBI(Sigma-RBI)、ストラタジーン(Stratagene)、ユナイテッド・ステイツ・バイオロジカル(United States Biological、アップステート(Upsstate)、およびザイムド・ラボラトリーズ・インコーポレイテッド(Zymed Laboratories Inc)が挙げられる。他の製造元も抗体を製造していることが知られており、使用することができる。

20

30

40

【0377】

(8.併用療法)

必要とする被験体に骨石灰化を最適化するために使用される複数の治療法を併用することも考慮される。これは、本明細書に開示される物質の使用、ホルモン補充療法(HRT)、選択的エストロゲン-受容体モジュレーター(SERM)、カルシトニン、ビスホスホネート、ラロキシフェン、カルシトニン、およびビタミンD、または以下に記載されるあらゆる試薬など既存の治療法とを併用することを含む。Wnt経路および骨プロファイ

50

ル遺伝子のモジュレーターも、以下のいずれかの物質単独（例えば、G S K - 3 阻害剤およびビスホスホネート）または組み合わせ（例えば、アレンドロネート、H R T、およびG S K - 3 阻害剤）との使用が考慮される。これらの追加の物質の量は、患者によって変化するが、1種類の物質として薬物が使用される場合に典型的に投与される量よりも少なくなると思われる。

【0378】

(8.1 ホルモン補充療法)

ホルモン補充療法（H R T）は通常、無傷の子宮を有する閉経後の女性におけるエストロゲンおよびプロゲステロン、ならびに子宮摘出を行った女性におけるエストロゲンのみからなる。典型的なエストロゲンおよびそれらの置換用量としては、経口抱合ウマエストロゲン（0.625 mg / 日）、経口エチニルエストラジオール（0.2 mg / 日）、および経皮エストラジオール（0.05 mg / 日、通常は1週間に1パッチを2回の形態）が挙げられる。経口製剤がより一般的に使用されるが、喫煙者の場合には、経口エストロゲンの肝代謝が増加するため、経皮エストロゲン置換がより効果的となり得る。プロゲステロンは、周期的（メドロキシプロゲステロンとして、10 mg / 日を、毎月10～12日）または連続（2.5 mg / 日）で投与することができる。必要な用量は、エストロゲンが不足する女性の場合増加する（例えば、20 mg / 日の酢酸メドロキシプロゲステロンまたは5 mg / 日のノルエチンドロン）。補充されるホルモン量は、調節する骨石灰化と関連するタンパク質を調節する試薬と併用する場合には、少なくなる場合がある。使用できる承認薬製剤については、後出の表6を参照されたい。

10

20

【0379】

ホルモン補充療法、ならびにビタミンDおよびカルシウムの補給は、骨量減少の男性被験体にも利用される。性機能低下性の男性の場合、テストステロン補給による骨量増加が示されている。したがって、一態様においては、これらの物質と、骨石灰化を調節する本明細書に開示の試薬との組み合わせが、必要とする男性被験体に同時投与される。

【0380】

(8.2 選択的エストロゲン受容体モジュレーター)

選択的エストロゲン受容体モジュレーター（S E R M）としては、限定するものではないが、ラロキシフェン（E v i s t a（登録商標））、タモキシフェン、トリミフェン（t o r i m i f e n e）、酢酸パゼドキシフェン（1 H - インドール - 5 - オール、1 - [[4 - [2 - (ヘキサヒドロ - 1 H - アゼピン - 1 - イル) エトキシ] フェニル] メチル] - 2 - (4 - ヒドロキシフェニル) 3 - 3 - メチル - モノアセテートまたは1 - [p - [2 - (ヘキサヒドロ - 1 H - アゼピン - 1 - イル) エトキシ] ベンジル] - 2 - (p - ヒクロキシフェニル) - 3 - メチルインドール - 5 - オールモノアセテート）、チボロン、および薬学的に許容されるそれらの塩が挙げられる。ラロキシフェン（非ステロイド系ベンゾチフェン（b e n z o t h i p h e n e））は、最も一般的に投与されるS E R Mであり、F D Aで承認されている他の表示を有する他の物質も存在する。ラロキシフェンは典型的には60 mg / 日の用量で投与される。

30

【0381】

(8.3 カルシトニン)

カルシトニンは、再吸収阻害性を有するペプチドである。その生物活性を有する形態は、32アミノ酸を含み、残基1と7との間にN末端ジスルフィド架橋を有する。サケのカルシトニンは、F D Aで認可された形態のカルシトニンであり、骨粗鬆症の予防ではなく治療のためのエストロゲンの代替物として承認されている。サケのカルシトニンは最も強力であり、皮肉なことにヒトカルシトニンは利用可能なカルシトニンの中で最も効力が弱い。

40

【0382】

サケカルシトニンは、200 U / 日で経鼻投与され、1日当たり1回投与される。しかし、パジェット病の場合、サケカルシトニンが、約50～約100 I Uの容量で、1週間当たり3～7回s . c . またはi . m . で投与される。ヒトカルシトニンは、1日当たり

50

約100IU(0.5mg)で使用することができる。経鼻の用量はより多くなり、例えば約400IUとなる。骨粗鬆症の場合、サケカルシトニンは、注射では100IU、または経鼻投与では200IUの割合で投与される。カルシトニンの投与に関するさらなる情報は、M. Zaidi et al., カルシトニンの分子のおよび臨床的薬理学 (Molecular and Clinical Pharmacology of Calcitonin), 骨生物学の基礎 (Principles of Bone Biology) 1423-40 (第2版, ジョン・P・ビレジキアン (John P. Bilezikian) ら編著, 2002) を参照されたい。他の形態のカルシトニンも、多剤併用療法における使用が考慮される。

【0383】

10

(8.4 ビスホスホネート)

ビスホスホネートは、骨リモデリングの強力な阻害剤であるが、理由は不明であるが、これらの物質が骨量減少を防止することが示されている。ビスホスホネートとしては、限定するものではないが、アレンドロネート、クロドロネート、EB-1053、エチドロネート、イバンドロネート、インカドロネート、ミノドロネート、ネリドロネート (neridronate)、オルパドロネート (olpadronate)、パミドロネート、リセドロネート、チルドロネート、およびゾレドロネートが挙げられる。ビスホスホネートは、2つのC-P結合を特徴とする化合物。2つのC-P結合が1つの炭素原子上にある場合 (すなわち、P-C-P)、それらはピロホスフェート (すなわち、P-O-P) の類似体である。

20

【0384】

アレンドロネートは、骨粗鬆症の治療のために現在承認されている最も広範に研究されているビスホスホネートである。これは ビスホスホネートまたはピロホスフェートの誘導体であり、骨格に対する再吸収阻害作用を有する。アレンドロネートは典型的には、骨粗鬆症の予防の場合約5mg/日、骨粗鬆症の治療の場合10mg/日、パジェット病の治療の場合40mg/日の量で投与される (以下の表6参照)。アレンドロネートは、一般的にHRTとも同時投与される (B. Dawson-Hughes, 閉経後骨粗鬆症の治療の薬物治療 (Pharmacologic Treatment of Postmenopausal Osteoporosis), 代謝性骨疾患および無機物代謝障害のプライマーに関する入門書 (Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism) 283-288 (第4版, リッピンコット・ウィリアムズ・アンド・ウィルキンス (Lippincott Williams & Wilkins), 1999))。ビスホスホネートに関するさらなる情報については、H. フライシュ (Fleisch) et al., ビスホスホネート: 作用機序 (Bisphosphonates: Mechanisms of Action), 骨生物学の基礎 1361-85 (第2版, ジョン・P・ビレジキアンら編著, 2002) および現在使用可能なビスホスホネートおよび用量を示している以下の表6を参照されたい。

30

【0385】

(8.5 ビタミンDおよびビタミンD類似体)

40

現在、ビタミンD活性化の主経路を代表する化合物のみが、薬物として使用するために合成されている。このようなものとしては、25-ヒドロキシビタミンD₃または25-OH-D₃ (カルシジオール) と呼ばれるビタミンD₃、および1,25-(OH)₂D₃ (カルシトリオール) が挙げられる。1つの例外が24(R), 25-(OH)₂D₃ (セカルシフェロール (Secalciferol)) である。したがって、ビタミンDの天然のプロドラッグおよび代謝産物を投与することができる。ビタミンDの投与は年齢に依存する。例えば、ビタミンDの典型的な経口投与は50歳までの200IU、70歳までの400IU、および70歳を超える場合の600~800IUである。ビタミンDおよびその類似体に関するさらなる情報については、G. ジョーンズ (Jones), ビタミンDおよび類似体 (Vitamin D and Analogs), 骨生物学の基

50

礎 1407-22 (第2版, ジョン・P・ビレジキアンら編著, 2002) を参照されたい。さらに別のビタミンD製剤については、以下の表6を参照されたい。

【0386】

(8.6 カルシウム補給)

Wnt 経路モジュレーターは、上記のいずれかの方法および/またはカルシウムサプリメントと併用することもできる。カルシウム補給は、炭酸カルシウム、クエン酸カルシウム、ピオン酸カルシウム、グルコン酸カルシウム、乳酸カルシウム、リン酸カルシウム、およびリン酸三カルシウムの形態で行うことができる。一般的な用量としては、限定するものではないが、表6に記載の用量、またはより少ない用量が挙げられる。

【0387】

(8.7 他の薬物)

さらに別のある薬物は、骨量減少の防止または骨石灰化の増強に有用となり得ることが示されている。チボロンなどのプロゲステンを、骨粗鬆症および他の骨量減少障害の治療に使用することができる。さらに別のもは抗エストロゲンのタモキシフェンである。タモキシフェンは、典型的には、乳癌の危険性のある女性に約20~約30mg/日で投与される。これらの薬物の骨石灰化障害の治療への使用は現在承認されていない。

【0388】

オメプラゾール、アミロライド、およびN-エチルマレイミドなどの他の試薬も、骨吸収の抑制に有効であることが示されている。アミロライドとN-エチルマレイミドとの組み合わせは、これらの試薬がそれぞれ単独で投与されるよりも、これらの試薬が併用される方がより強く抑制された。マツダ (Matsuda, J. Osaka City Medical Ctr. 41(2): 653-61 (1992))。

【0389】

10

20

【表 9 A】

表 6

薬物	骨および無機物障害の 治療への使用	用量(成人)
ホルモンおよびアナログ		
カリシトニン ヒト(シバカルシン (Cibacalcin))	パジェット病	0.25~0.5mg i.m または s.c.; q24h
サケ(カルシマー (Calcimar)、ミアカルシン (Miacalcin))	パジェット病、骨粗鬆 症、高カルシウム血症	50~100IU、i.m. または s.c.; q.o.d. または q.d.(パジェット病または 骨粗鬆症の場合); 4~6IU/kg i.m. または s.c.; q.i.d.(高カルシウ ム血症の場合)
カルシトニン鼻腔用スプ レー	骨粗鬆症	200IU 経鼻 q.d.
エストロゲン		
エスチニルエストラジオ ール	閉経後骨粗鬆症	0.02~0.05mg ; q.d.3/4wk
17βエストラジオール (エストレー (Estrace))		0.5mg q.d.
経皮パッチ (エストラダーム (Estraderm))		0.05~0.1mg 2×/wk
抱合ウマエストロゲン (プレマリン(Premarin))		0.625~1.25mg q.d.3/4wk
エステル化エストロゲン (エストラタブ (Estratab))		0.3~1.25mg q.d.
エストロピペート (Estropipate) (Ortho-Est.625)		0.75mg q.d.

10

20

30

40

【表 9 B】

薬物	骨および無機物障害の 治療への使用	用量(成人)	
抱合ウマエストロゲンお よび酢酸メドロキシプロゲ ステロン(MPA) (プレムフェーズ (Premphase)) プレンプロ(Prempro)		1~14日に0.625mgのエストロ ゲン q.d.、および15~28日に 0.625mgのエストロゲンと5mg のMPA q.d. 0.625mgのエストロゲンおよび 2.5または5mgのMPA q.d.	10
選択的エストロゲン受容体 モジュレーター(SERM) ラロキシフェン(エビス タ(Evista)(登録商標))	閉経後骨粗鬆症(予防)	60mg q.d.	
グルココルチコイド プレドニゾン (デルタゾン (Deltasone))	サルコイドーシスによ る高カルシウム血症、ビ タミンD中毒、ならびに 多発性骨髄腫および関 連のリンパ球増殖性障 害などのある種の悪性 疾患	10~60mg ; q.d.	20
副甲状腺ホルモン ヒト1-34 (パラトール(Parathor))	偽性副甲状腺機能低下 症の診断	200U ; 10分を超える注入	30
テストステロン テストステロンシピオネ ート エナント酸テストステロ ン 経皮パッチ テストダーム (Testoderm) テストダーム TTS アンドロダーム (Androderm)	男性性腺機能低下症	200~300mg i.m.q2~3wk 200~300mg i.m.q2~3 wk 4~6mg 陰嚢用パッチ q24hr 5mg 身体用パッチ 2つの2.5mg パッチ q24hr	40
ビタミンD製剤 コレカルシフェロールま	栄養性ビタミンD欠乏	400~1000U; 栄養補助食品とし	

【表 9 C】

薬物	骨および無機物障害の 治療への使用	用量(成人)	
たは D ₃ エルゴカルシフェロール または D ₂ (カルシフェロール (Calciferol))	症、骨粗鬆症、吸収不良、 副甲状腺機能低下症、治 療抵抗性くる病	て 25,000~100,000 U ; 3X/wk から q.d.	10
カルシフェロールまたは 25(OH)D ₃ (カルデロール Calderol)	吸収不良 ; 腎性骨形成 異常	20~50 μg ; 3×/wk から q.d.	
カルシトリオールまたは 1,25(OH) ₂ D ₃ (ロカルトロール (Rocaltrol))または (カルシジェックス (Calcijex))	腎性骨形成異常、副甲状 腺機能低下症、治療抵抗 性くる病.	0.25~1.0 μg ; q.d.から b.i.d.	20
ジヒドロタキステロール (DHT)	腎性骨形成異常、副甲状 腺機能低下症	0.2~1.0mg ; q.d.	
ビスホスホネート エチドロネート	パジェット病、異所性骨 化、悪性高カルシウム血 症	p.o.、5mg/kg、q.d.を 6/12 か月(パ ジェット病の場合); 人工股関節 全置換術の 1 か月前から 3 か月 後まで 20mg/kg、q.d. ; 脊髄損傷 の 3 か月後まで 10/20mg/kg、 q.d.(異所性骨化の場合)。 i.v.、7.5mg/kg、q.d.を3日、250 ~500mL生理食塩水中で与える (悪性高カルシウム血症の場合) ; 5mg q.d.(骨粗鬆症予防の場合)	30
アレンドロネート (フォサマックス (Fosamax))	骨粗鬆症の予防および 治療、パジェット病	5mg q.d.(骨粗鬆症予防の場合) ; 10mg q.d.(骨粗鬆症治療の場合) ; 40mg q.d.(パジェット病の場 合)	40

【表 9 D】

薬物	骨および無機物障害の 治療への使用	用量(成人)
パミドロネート (アレディア(Aredia))	悪性高カルシウム血症、 パジェット病	60~90mgを24hで1回のi.v.注入 で与える(悪性高カルシウム血 症の場合); i30mgまたは60mgの 用量で4hrの注入も有効である。 4hで30mgの用量を3日連続、合 計90mg(パジェット病の場合)
リセドロネート (アクトナル(Actonal))	パジェット病	30mg q.d.を2か月
チルドロネート (スケリド(Skelid))	パジェット病	400mg q.d.を3か月
無機物		
重炭酸ナトリウム	骨疾患の原因となる慢 性代謝性アシドーシス	各患者に滴定する必要
カルシウム製剤	低カルシウム血症(治療 すべき症状の場合は i.v.)、骨粗鬆症、くる病、 骨軟化症、慢性腎不全、 副甲状腺機能低下症、吸 収不良、腸シュウ酸塩尿	
炭酸カルシウム (40%Ca)		p.o.400~2000mg 分割量の元素 Ca ; q.d.
クエン酸カルシウム (21%Ca)		
塩化カルシウム (36%Ca)		
ピオン酸カルシウム (6.5%Ca)		
グルコン酸カルシウム (9%Ca)		i.v.、2~20mLの10%グルコン 酸カルシウムを数時間かける
乳酸カルシウム (13%Ca)		
第二リン酸カルシウム (23%Ca)		
リン酸三カルシウ		

10

20

30

40

【表 9 E】

薬物	骨および無機物障害の 治療への使用	用量(成人)
(39%Ca)		
マグネシウム製剤		
酸化マグネシウム (Mag-Ox、Uro-Mag)、 p.o.(84.5、241.3 の Mg)	低マグネシウム血症	240~480mg の元素 Mg ; q.d.
ホスフェート製剤		
ニュートラ - ホス (Neutra-Phos)p.o.(250mg の P、278mg の K、164mg の Na)	低リン酸血症、ビタミン D 抵抗性くる病、高カル シウム血症、高カルシウ ム尿症	p.o.、分割量で 1~3g ; q.d.
ニュートラ - ホス -K,p.o.(250mg の P、556mg の K)		
フリート・ホスファ-ソー ダ(Fleet Phospha-Soda)、 p.o.(5mL 中 815mg の P、 760mg の Na)		
イン-ホス(In-Phos),i.v. (40mL 中 1g の P)		i.v.、6~8 時間かけて 1.5g
ハイパー - ホス -K(Hyper-Phos-K),i.v.(15m L 中 1g の P)		
利尿薬		
サイアザイド		
ヒドロクロロチアジ ド,p.o.(25、50、100mg)	高カルシウム尿症、腎結 石	25~50mg ; q.d.または b.i.d.
クロルタリドン,p.o.(25、 50mg)		
ループ利尿薬		
フロセミド,p.o.(20、40、 80mg)、i.v.(10mg/mL)	高カルシウム血症 ; 症候 性的場合 i.v.で使用	p.o.、20~80mg、必要に応じて g6h i.v.、数分間で 20~80mg、必要 に応じて繰り返す
その他		

10

20

30

40

【表 9 F】

薬物	骨および無機物障害の 治療への使用	用量(成人)
ミトラマイシン (mitramycine)またはプリ カマイシン	高カルシウム血症また は悪性疾患	1LのD5W中または生理食塩水 中25 μ g/kg、4~6時間かける
ミトラチン (mithracin),i.v.(2.5mg/バイ アル)		

10

【0390】

上記試薬は、Wnt経路を調節および好ましくは活性化する（さらにそれによって骨リモデリングを増強する）化合物および組成物とあらゆる組み合わせで併用することができる。Wnt経路を調節する化合物の1つが投与される場合、ほとんどの場合、既存の治療化合物は、その既存の治療化合物が単独で投与される場合に推奨されるよりも少ない用量で投与される。

20

【0391】

(9. 医薬製剤)

本発明の医薬製剤は、小化合物または免疫グロブリンを単独または併用のいずれかで含む。併用は、小化合物および小化合物、ならびに既存の治療と併用される組成物の両方が意図される。

【0392】

(9.1 小化合物製剤)

医薬品として使用される場合、本発明の化合物は通常、医薬組成物の形態で投与される。本発明の医薬製剤としては、本明細書に記載されるように、小化合物の組み合わせ、および小化合物とポリペプチド（例えば、免疫グロブリン）または核酸との組み合わせが挙げられる。

30

【0393】

これらの化合物、および併用療法は、経口、非経口、経皮、局所、直腸、および経鼻などの種々の経路によって投与することができる。これらの化合物および併用療法は、注射および経口の両方の組成物として有効である。このような組成物は、医薬分野において周知の方法によって調製され、少なくとも1種類の有効化合物を含む。

【0394】

本発明は、有効成分として、上記の1種類以上の化合物とともに薬学的に許容される担体を含む医薬組成物も含む。本発明の組成物を製造する場合、通常、有効成分が、賦形剤と混合される、賦形剤によって希釈される、あるいは、カプセル、サッシェ、紙、または他の容器の形態であってよい担体中に封入される。使用される賦形剤は典型的には、ヒト被験体または他の哺乳類への投与に好適な賦形剤である。賦形剤が希釈剤として機能する場合、それは、有効成分の賦形剤、担体、または媒体として作用する固体、半固体、または液体の材料であってよい。したがって、本発明の組成物は、錠剤、丸剤、粉末、ロゼンジ、サッシェ、カシエ剤、エリキシル剤、懸濁剤、乳剤、液剤、シロップ、エアロゾル（固体として、または液体媒体中で）、例えば最大10重量%の有効化合物を含む軟膏、ソフトおよびハードゼラチンカプセル、坐剤、滅菌注射液、および滅菌包装された粉末の形態であってよい。

40

【0395】

製剤を調製する場合、他の成分と混合する前に、適切な粒径となるように有効化合物を

50

粉碎する必要がある場合がある。有効化合物が実質的に不溶性である場合、通常は200メッシュ未満の粒径まで粉碎される。有効化合物が実質的に水溶性である場合は、通常、製剤中に実質的に均一に分散するように粉碎することによって粒径が調整され、例えば約40メッシュに調整される。

【0396】

好適な賦形剤の一部の例としては、ラクトース、デキストロース、スクロース、ソルビトール、マンニトール、デンプン、アラビアゴム、リン酸カルシウム、アルギネート、トラガントゴム、ゼラチン、ケイ酸カルシウム、微結晶性セルロース、ポリビニルピロリドン、セルロース、滅菌水、シロップ、およびメチルセルロースが挙げられる。本発明の製剤はさらに、滑沢剤、例えばタルク、ステアリン酸マグネシウム、および鉱油；湿潤剤；乳化剤および懸濁化剤；保存剤、例えばメチルベンゾエートおよびプロピルヒドロキシベンゾエート；甘味剤；ならびに着香料を含むことができる。本発明の組成物は、当技術分野において周知の手順を使用して、患者に投与した後で、有効成分の迅速な放出、持続する放出、または遅延する放出が起こるように処方することができる。

10

【0397】

医薬組成物およびその単位剤形中の本発明による化合物である有効成分の量は、特定の用途、特定の化合物の効力、および所望の濃度に依存して、広範囲で変動させたり調整したりすることができる。

【0398】

本発明の組成物は、各用量が約5～約100mg、より一般的には約10～約30mgの有効成分を含有する単位剤形中に配合される。用語「単位剤形」とは、ヒト被験体および他の哺乳類の単位用量として好適な物理的に分離した単位を意味し、各単位は、所望の治療効果が得られる用に計算された所定量の有効材料と、好適な医薬品賦形剤とを含有する。好ましくは、前述の本発明の化合物が、医薬組成物の約20重量%以下、より好ましくは約15重量%以下で使用され、残部は薬学的に不活性な担体である。

20

【0399】

本発明の有効化合物は、広い用量域で効果的であり、一般に薬学的有効量または治療有効量で投与される。しかし、治療すべき症状、細菌感染の重篤度、選択した投与経路、投与される実際の化合物、個々の患者の年齢、体重、および応答、患者の症状の重篤度などの関連の状況を考慮して、実際に投与される化合物の量が医師によって決定されることを理解されたい。

30

【0400】

温血動物の細菌感染の治療または根絶のための治療用途では、治療を行う動物中の有効成分の抗菌に有効な濃度、すなわち量または血中濃度が得られ維持される用量で、本発明の化合物またはそれらの医薬組成物が、経口的、局所的、経皮的、および/または非経口的に投与される。一般に、有効成分の投薬のこのような抗菌または治療の有効量(すなわち有効用量)は、約0.1～約100、より好ましくは約1.0～約50mg/kg体重/日の範囲である。

【0401】

錠剤などの固体組成物を調製する場合、主要有効成分を医薬品賦形剤と混合して、本発明の化合物の均一混合物を含有する固体予備処方組成物を形成する。これらの予備処方組成物が均一であると言及する場合、有効成分が組成物全体に一樣に分散していることを意味し、そのため、この組成物は、錠剤、丸剤、およびカプセルなどの同等に有効な単位剤形に容易に再分割することができる。次に、この固体予備処方は、例えば0.1～約500mgの本発明の有効成分を含有する上記種類の単位剤形に再分割される。

40

【0402】

本発明の錠剤または丸剤は、コーティングまたは他の配合を行うことで、長期間作用する利点を得られる剤形を得ることができる。例えば、錠剤または丸剤は、内部投薬成分および外部投薬成分を含むことができ、後者は前者を包み込む形態となる。これらの2つの成分は、腸溶性層によって分離することができ、この層は、胃での崩壊に抵抗し、内部成

50

分が無傷のまま十二指腸まで通過するか、放出を遅延させるか機能を果たす。このような腸溶性層または被膜としては、種々の材料を使用することができ、このような材料としては、多数のポリマー酸、ならびにポリマー酸と、セラック、セチルアルコール、および酢酸セルロースなどの材料との混合物が挙げられる。

【0403】

経口投与または注射のために本発明の新規組成物を混入することができる液体形態としては、水溶液、好適には風味付けされたシロップ、水性または油性懸濁液、およびトウモロコシ油、綿実油、ゴマ油、ヤシ油、またはラッカセイ油の食用油を使用して香味付けされたエマルジョン、およびエリキシル、ならびに類似の医薬品賦形剤が挙げられる。

【0404】

吸入または吹送のための組成物としては、薬学的に許容される水性溶媒または有機溶媒、あるいはそれらの混合物中の溶液および懸濁液、ならびに粉末が挙げられる。これらの液体または固体の組成物は、前述の好適な薬学的に許容される賦形剤を含むことができる。好ましくは、これらの組成物は、口または鼻の呼吸経路または全身作用によって投与される。好ましくは薬学的に許容される溶媒中の組成物を、不活性ガスを使用することによって噴霧することができる。噴霧された溶液は、噴霧装置から直接吸入することができるし、噴霧装置をフェースマスクテント、または間欠的陽圧呼吸装置に取り付けることもできる。溶液、懸濁液、または粉末の組成物は、適切な方法で製剤を送達する装置から、好ましくは経口的または経鼻的に投与することができる。

10

【0405】

以下の処方例は、本発明の代表的な医薬組成物を示している。

20

【0406】

(処方例1)

以下の成分を含有するハードゼラチンカプセルを調製する。

【0407】

【表10】

成分	量(mg/カプセル)
有効成分	30.0
デンプン	305.0
ステアリン酸マグネシウム	5.0

30

【0408】

上記成分を混合し、340mgの量でハードゼラチンカプセル中に充填する。

【0409】

(処方例2)

以下の成分を使用して錠剤処方を調製する。

【0410】

【表11】

成分	量(mg/錠剤)
有効成分	25.0
微結晶性セルロース	200.0
コロイド状二酸化ケイ素	10.0
ステアリン酸	5.0

40

【0411】

これらの成分を混合し、圧縮して各240mgの錠剤を形成する。

50

【0412】

(処方例3)

以下の成分を含有する乾燥粉末吸入製剤を調製する。

【0413】

【表12】

<u>成分</u>	<u>重量%</u>
有効成分	5
ラクトース	95

10

【0414】

有効成分をラクトースと混合し、その混合物を乾燥粉末吸入装置に投入する。

【0415】

(処方例4)

それぞれ30mgの有効成分を含有する錠剤を以下のように調製する。

【0416】

【表13】

<u>成分</u>	<u>量(mg/錠剤)</u>
有効成分	30.0mg
デンプン	45.0mg
微結晶性セルロース	35.0mg
ポリビニルピロリドン	
(滅菌水中の10%溶液として)	4.0mg
カルボキシメチルスターチナトリウム	4.5mg
ステアリン酸マグネシウム	0.5mg
タルク	<u>1.0mg</u>
合計	120mg

20

30

【0417】

有効成分、デンプン、およびセルロースを20番メッシュ(No. 20 mesh)USシープ(US sieve)に通し、十分に混合する。ポリビニルピロリドンを得られた粉末と混合し、次にこれを16メッシュUSシープに通す。形成された顆粒を50~60で乾燥させ、16メッシュUSシープに通す。30番メッシュUSシープにあらかじめ通しておいたカルボキシメチルスターチナトリウム、ステアリン酸マグネシウム、およびタルクを、次にこの顆粒に加え、混合した後、これを錠剤機上で圧縮して、それぞれ120mgの重さの錠剤を得る。

40

【0418】

(処方例5)

40mgの薬剤をそれぞれ含有するカプセルを以下のように作製する：

【0419】

【表 1 4】

成分	量(mg/カプセル)
有効成分	40.0mg
デンプン	109.0mg
ステアリン酸マグネシウム	1.0mg
合計	150.0mg

【0 4 2 0】

有効成分、デンプン、およびステアリン酸マグネシウムを混合し、20番メッシュUSシープに通し、150mgの量でハードゼラチンカプセル中に充填する。

10

【0 4 2 1】

(処方例6)

それぞれ25mgの有効成分を含有する坐剤を以下のように作製する。

【0 4 2 2】

【表 1 5】

成分	量	
有効成分	25mg	20
飽和脂肪酸グリセリド	2,000mg まで	

【0 4 2 3】

有効成分を60番メッシュUSシープに通し、必要最小限の熱であらかじめ溶融させた飽和脂肪酸グリセリド中に懸濁させる。次に、この混合物を公称容量2.0gの坐剤用型中に注ぎ込み、冷却する。

【0 4 2 4】

(処方例7)

5.0mLの用量当たり50mgの薬剤をそれぞれ含有する懸濁液を以下のように作製 30

【0 4 2 5】

する：

【表 1 6】

成分	量	
有効成分	50.0mg	
キサントガム	4.0mg	
カルボキシメチルセルロースナトリウム(11%)		40
微結晶性セルロース(89%)	50.0mg	
スクロース	1.75g	
安息香酸ナトリウム	10.0mg	
香料および着色料	必要量	
精製水	5.0mL まで	

【0 4 2 6】

有効成分、スクロース、およびキサントガムを混合し、10番メッシュUSシープに通し、続いて、あらかじめ作製しておいた微結晶性セルロースおよびカルボキシメチルセ 50

ルロースナトリウムの水溶液と混合する。安息香酸ナトリウム、香料、および着色料を水の一部で希釈して、攪拌しながら加える。次に十分垂水を加えて必要な体積にする。

【0427】

(処方例8)

【表17】

<u>成分</u>	<u>量(mg/カプセル)</u>	
有効成分	15.0mg	
デンプン	407.0mg	
ステアリン酸マグネシウム	<u>3.0mg</u>	10
合計	425.0mg	

【0428】

有効成分、デンプン、およびステアリン酸マグネシウムを混合し、20番メッシュUSシープに通し、425.0mgの量でハードゼラチンカプセル中に充填する。

【0429】

(処方例9)

以下のように皮下用製剤を調製することができる。

【0430】

20

【表18】

<u>成分</u>	<u>量</u>
有効成分	5.0mg
トウモロコシ油	1.0mL

【0431】

(処方例10)

以下のように局所製剤を調製することができる。

【0432】

30

【表19】

<u>成分</u>	<u>量</u>
有効成分	1~10g
乳化蠟	30g
流動パラフィン	20g
白色ワセリン	100gまで

【0433】

40

白色ワセリンを溶融するまで加熱する。流動パラフィンおよび乳化蠟を加え、溶解するまで攪拌する。有効成分を加え、分散するまで攪拌を続ける。次にこの混合物を固体になるまで冷却する。

【0434】

(処方例11)

以下のように静脈内の製剤を調製することができる。

【0435】

【表 20】

成分	量
有効成分	250mg
等張食塩水	1000mL

【0436】

本発明の方法で使用される別の好ましい製剤は、経皮的送達機構（「パッチ」）を使用する。このような経皮パッチは、制御された量で本発明の化合物を連続または不連続に注入するために使用することができる。医薬物質を送達するための経皮パッチの構成および使用は当技術分野において周知である。例えば、米国特許第5,023,252号明細書（本明細書に組み入れられる）を参照されたい。これらのパッチは、医薬物質の連続的、拍動的、または要求通りの送達を行うように構成することができる。

10

【0437】

本発明に使用するための他の好適な製剤は、レミントン製薬科学（Remington's Pharmaceutical Sciences）、メース・パブリッシング・カンパニー（Mace Publishing Company）、ペンシルバニア州フィラデルフィア（Philadelphia, PA）、第17版（1985）に見ることができる。

20

【0438】

前述したように、本明細書に記載される化合物は、前述の種々のドラッグデリバリーシステムへの使用に好適である。さらに、投与される化合物のインビボ血清半減期を増加させるために、本発明の化合物を、カプセルに入れたり、リポソームの内腔に導入したり、コロイドとして調製したりすることができ、化合物の血清半減期を増加させる他の従来を使用したりすることができる。リポソームを調製するための種々の方法を利用することができ、例えば、スゾカ（Szoka）らの米国特許第4,235,871号明細書、第4,501,728号明細書、および第4,837,028号明細書に記載される方法を利用することができ、これらそれぞれが本明細書に組み入れられる。

30

【0439】

前述したように、患者に投与される化合物は、前述の医薬組成物の形態である。これらの組成物は、従来滅菌技術によって滅菌することができるし、滅菌濾過することもできる。結果として得られる水溶液は、そのままの使用するために包装することができるし、凍結乾燥して、凍結乾燥した製剤を投与前に滅菌水性担体と混合することもできる。本発明の化合物製剤のpHは、典型的には3～11の間であり、より好ましくは5～9であり、最も好ましくは7～8である。前述のある種の賦形剤、担体、または安定剤を使用することで、医薬の塩が形成されることも理解されたい。

【0440】

一般に、本発明の化合物は、類似の有用性を有する物質の容認されているあらゆる投与形態によって、治療有効量で投与される。このような化合物の毒性および治療効力は、標準的製薬手順によって、細胞培養または実験動物において決定することができ、例えば、LD₅₀（集団の50%が致死する量）およびED₅₀（集団の50%において治療的に有効となる量）を求めることができる。毒性と治療効果との間の用量比は、治療指数であり、これはLD₅₀/ED₅₀の比として表現することができる。大きな治療指数を示す化合物が好ましい。

40

【0441】

細胞培養アッセイおよび動物の研究から得られるデータは、ヒトに使用するための用量域を求めるために使用することができる。このような化合物の用量は、好ましくは、ED₅₀を含み毒性がわずかまたは全くない血中濃度の範囲内にある。用量は、使用される剤形および使用される投与経路に依存してこの範囲内で変動させることができる。本発明の方

50

法において使用されるあらゆる化合物は、その治療有効用量を、最初に細胞培養アッセイから評価することができる。細胞培養で求めた IC_{50} (症状を最大半分まで抑制する試験化合物の濃度) を含む循環血漿濃度範囲を実現するための、動物モデルの用量を求めることができる。このような情報を、ヒトに有用な用量をより正確に求めるために使用することができる。血漿レベルは、例えば高速液体クロマトグラフィーによって測定することができる。

【0442】

(9.2 免疫グロブリン製剤)

本発明の一側面、骨石灰化に關与するタンパク質、例えば本明細書に記載されるいずれかのタンパク質を認識しこれと結合する免疫グロブリンの使用を意図している。好ましくは、免疫グロブリンが、骨石灰化を増強するように骨芽細胞 - 破骨細胞ホメオスタシスを調節する。ある疾患では、骨石灰化を減少させる化合物および組成物が好ましい。

10

【0443】

好ましい免疫グロブリンは、抗体またはそのフラグメントである。好ましい抗体はモノクローナル抗体であるが、ポリクローナル抗体を使用する実施形態も考慮される。好ましいモノクローナル抗体としては、ヒトモノクローナル抗体、ヒト化モノクローナル抗体、および霊長類化 (primate) (商標) モノクローナル抗体が挙げられる。

【0444】

語句「薬学的にまたは薬理的に許容される」とは、必要に応じて動物またはヒトに投与される場合に、有害反応、アレルギー反応、およびその他の不都合な反応が起こらない分子および組成物を意味する。獣医学的使用も本明細書において同様に含まれ、「薬学的に許容される」製剤には、臨床および/または獣医学での使用のための製剤が含まれる。例えば、組成物は骨の破壊および骨折を防止する目的で骨石灰化を増加させるため、家禽などのある種の農業動物に投与することができる。

20

【0445】

本明細書において使用される場合、「薬学的に許容される担体」には、あらゆる全ての溶媒、分散媒体、被膜、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などが含まれる。薬学的活性物質のためのこのような媒体および物質の使用は当技術分野において周知である。いずれかの従来媒体または物質が有効成分と不適合性である場合を除けば、その治療組成物における使用が考慮される。ヒトに投与する場合、製剤は、FDA 生物製剤事務局 (FDA Office of Biologics) の規格によって必要とされる無菌性、発熱性、一般的安全性、および純度の規格を満たすべきである。補助的有効成分を本発明の組成物中に混入することもできる。

30

【0446】

「単位用量」製剤は、特定のタイミングで送達されるよう適合させた投与成分の用量または部分用量 (subdose) を含有する製剤である。例えば、代表的な「単位用量」製剤は、一日量または単位、または一日の部分用量、または1週間の用量または単位、または1週間の部分用量などを含有する製剤である。

【0447】

例えば、ヒト化抗体は、骨石灰化疾患を治療するための医薬組成物中の有効成分として使用することができる。この医薬組成物は、静脈内投与、筋肉内投与、または投与可能な他の形態のために処方されると考えられる。この組成物は、希釈剤、充填剤、崩壊剤、甘味料、滑沢剤、および香料などの医薬製剤中に通常使用される非有効成分を含むことができる。この医薬組成物は、静脈内ポラスまたは持続点滴のいずれかによる静脈内投与のため、あるいは埋め込みカプセルから放出させるために処方される。静脈内投与のための典型的な製剤は、生理食塩水を希釈剤として使用する。

40

【0448】

骨石灰化を調節する免疫グロブリンのフラグメントの使用も考慮される。好ましいフラグメントは、モノクローナル抗体のフラグメント、または組換え技術によって合成されたフラグメントである。これらの抗体フラグメントの製剤は、当技術分野において周知であ

50

ると考えられる。

【0449】

患者のための免疫グロブリン組成物の用量は、使用される特異抗体、体重、年齢、性別、健康状態、食事、組成物の投与時間および処方、投与経路、ならびに治療されるべき疾患に依存する。典型的な用量は、 0.1 mg/kg/day ~ 100 mg/kg/day である。より典型的には、用量は 1 mg/kg/day ~ 50 mg/kg/day である。

【0450】

(9.2.1 診断用免疫グロブリン)

本発明の抗体は、診断分析に使用することもできる。本発明の診断分析のための好ましい方式の1つは、細胞表面上に骨石灰化と関与するいずれかのタンパク質を発現するサンプル中の細胞の定量である。特定の表面マーカーを有する細胞の計数方法は当技術分野において周知である。例えば、蛍光細胞分析分離法 (FACS) を使用することができる。本発明の診断分析のための別の方式は、サンプル中の対象の骨石灰化タンパク質量の定量である。このような当技術分野において周知のアッセイを実施するための多くの方式が存在し、例えば抗原固定化またはサンドイッチ方式の酵素結合免疫吸着アッセイなどが存在する。

10

【0451】

(9.2.2 注射製剤)

骨石灰化と関与するタンパク質を認識しこれと結合する抗体、免疫グロブリン、または免疫複合体は、非経口投与用に処方されることが最も多く、例えば、静脈内 (i.v.)、筋肉内 (i.m.)、皮下 (s.c.) の注射、経皮、または他のこのような経路、例えば蠕動投与、および部位への直接点滴注入 (すなわち、長骨の部位への投与) のために処方される。このような免疫グロブリンを有効成分として含有する水性組成物の製剤は、本明細書の開示を考慮すれば当業者には周知である。典型的には、このような組成物は、溶液または懸濁液のいずれかとしての注射液として調製することができるし、注射前に液体を加えることによって溶液または懸濁液を調製するために使用すると好適な固体形態を調製することもできるし、製剤は乳化することもできる。

20

【0452】

注射用途に好適な医薬品の形態としては、滅菌水溶液または分散液；ゴマ油、ラッカセイ油、または水性プロピレングリコールを含む製剤；および滅菌注射液または分散液のための滅菌粉末が挙げられる。全ての場合で、その形態が、無菌であり、注射可能である程度に流動性であるべきである。これは、製造および貯蔵の条件下で安定であるべきであり、細菌および真菌類などの微生物の汚染作用に対して維持されるべきである。

30

【0453】

骨石灰化に関与するタンパク質を認識しこれと結合する免疫グロブリンは、中性または塩の形態で滅菌水性組成物中に配合することができる。遊離塩基または薬理的に許容される塩としての溶液は、水中で、好適にはヒドロキシプロピルセルロースなどの界面活性剤と混合されて調製される。薬学的に許容される塩としては、酸付加塩 (タンパク質の遊離アミノ基と形成)、ならびに、例えば塩酸またはリン酸などの無機酸、あるいは酢酸、トリフルオロ酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などの有機酸と形成される塩が挙げられる。遊離カルボキシル基と形成される塩は、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化アンモニウム、水酸化カルシウム、または水酸化第二鉄などの無機塩基、ならびにイソプロピルアミン、トリメチルアミン、ヒスチジン、プロカインなどの有機塩基から誘導されてもよい。

40

【0454】

免疫グロブリンと使用すると好適な担体としては、溶媒、ならびに、例えば水、エタノール、ポリオール (例えば、グリセリン、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど)、それらの好適な混合物、および植物油を含有する分散媒体が挙げられる。多くの場合、糖または塩化ナトリウムなどの等張剤を含むことが好ましい。適切な流動性は、例えば、レシチンなどの被膜の使用によって、分散液の場合に必要な粒径の維

50

持によって、および/または界面活性剤の使用によって維持することができる。

【0455】

通常の貯蔵および使用の条件下で、全てのこのような製剤は、微生物の増殖を防止するための保存剤を含有すべきである。微生物の阻止は、種々の抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン類、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸、チメロサルなどによって行うことができる。注射組成物の持続性吸収は、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどの吸収を遅延させる物質を組成物中に使用することによって実現することができる。

【0456】

滅菌注射液は、適切な溶媒中に必要量の有効物質を必要に応じて前述の種々の他の成分とともに混入し、続いて濾過滅菌することによって調製される。一般に、分散液は、種々の滅菌有効成分を、基本分散媒体および前述の必要な他の成分を含有する滅菌賦形剤中に混入することで調製される。

10

【0457】

滅菌注射液の調製用の滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、あらかじめ滅菌濾過した溶液から、有効成分と任意の所望の追加成分との粉末を得る真空乾燥技術および凍結乾燥技術である。

【0458】

(9.2.3 持続放出製剤)

タンパク質を認識してこれと結合することによって骨石灰化を調節する免疫グロブリンの製剤は、前述の注射液などの種々の剤形で容易に投与されるが、例えば、錠剤、丸剤、カプセル、または他の経口投与用固体、坐剤、ペッサリー、点鼻液またはスプレー、エアロゾル、吸入薬、局所製剤、リポソーム形態などの他の薬学的に許容される形態も考慮される。投与形態は、治療される疾患または障害に合わせられる。

20

【0459】

医薬品の「徐放性」カプセルまたは「持続放出」組成物または製剤を使用することができ、一般に適用される。徐放性製剤は、長期間にわたって一定薬物濃度が得られるように一般に意図されている。徐放性製剤は、典型的には長骨などの疾患部位の近傍に埋め込まれる。

【0460】

持続放出製剤の好適な例としては、抗体または免疫複合体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスを含み、このマトリックスは、フィルムまたはマイクロカプセルなどの成形物品の形態である。持続放出マトリックスの例としては、ポリエステル；ヒドロゲル、例えば、ポリ(メタクリル酸2-ヒドロキシエチル)またはポリ(ビニルアルコール)；ポリラクチド；L-グルタミン酸および-L-エチル-L-グルタメートのコポリマー；非分解性エチレン-酢酸ビニル；分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、例えばルプロンデポ(Lupron Depot)(商標)(乳酸-グリコール酸コポリマーおよび酢酸ロイプロリドで構成される注射用微小球)；ならびにポリ-D-()-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。

30

【0461】

エチレン-酢酸ビニルおよび乳酸-グリコール酸などのポリマーは100日を超えて分子を放出することができるが、ある種のヒドロゲルはより短い期間タンパク質を放出する。カプセル化された抗体は体内で長期間維持され、これらは37°Cにおいて水分に曝露すると変性または凝集することができ、それによって生物活性の低下および/または免疫原性の変化が起こり得る。関連する機構に応じて安定化のために合理的な戦略を使用することができる。例えば、凝集機構が、チオ-ジスルフィド交換を介する分子間S-S結合の形成を伴う場合、スルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分量の制御、適切な添加剤の使用、特殊なポリマーマトリックス組成物の開発などによって安定化が実現される。所望の免疫グロブリンを含む組成物は、リポソームまたはナノ粒子の中に配合することもできる。

40

50

【実施例】

【0462】

(実施例1)

(GSK阻害剤を使用するTCF-Luc assay)

ある種のGSK阻害剤が知られている。塩化リチウム(LiCl)の形態で投与されるリチウムは、特異性が低く、高ミリモル用量でGSK-3のみを阻害することができる(スタンボリック(Stambolic) et al., Curr. Biol. 6:1664-68(1996))。より選択的なGSK阻害剤の3-(3-クロロ-4-ヒドロキシフェニルアミノ)-4-(2-ニトロフェニル)-1H-ピロール-2,5-ジオンは、GSK-3のアイソフォームに対する特異性がより高い。この化合物、その誘導体、同族体、および類似体は、特に、骨形成分子を同定するためのアッセイを較正するために使用することができる。例えば、GSK-3阻害剤は、LRP5/6アゴニスト、Wntアゴニスト、LRP5/6-Dkk1アンタゴニスト、および他のクロストーク経路特異的シス/トランス要素含有レポーターを同定するための骨または非骨細胞系TCF assayの較正に使用することができる。これらの化合物は、骨形成遺伝子活性の研究に使用することもでき、骨芽細胞/破骨細胞機能、増殖、分化、およびアポトーシスに対する二次アッセイ; ひずみまたは機械的負荷を使用するまたは使用しない、インビトロまたはインビボでの骨芽細胞遺伝子プロファイリングアッセイ; 頭蓋冠モデルを使用したインビボ局所効果アッセイ; エクスビボの頭蓋冠または他の骨に由来する骨代謝回転アッセイ、ヤング率モデル(young rate model)などを使用する全身作用評価アッセイ、あるいはインビボ非活動/卵巣切除型アッセイも、これらの化合物を使用することができる。

【0463】

TCFレポーターアッセイは、16コピー(すなわち16x)のWnt-カテニンシグナル応答TCF要素、基本TKプロモーター、およびルシフェラーゼ遺伝子を含むTCFレポーターを使用する。ヒト胚腎臓(HEK)-293A細胞(ATCC)または他の骨肉腫由来骨細胞系(例えば、U2OS)を、ダルベッコの最小必須培地(DMEM、インビトロジェン)、または10%の熱不活性化FBS、1%のグルタミン酸(glutamax)(インビトロジェン)、および1%のペニシリン-ストレプトマイシン(インビトロジェン)を補給したRPMI(インビトロジェン)中で培養した。HEK-293A細胞(約40,000細胞/ウェル)またはU2OS細胞(25,000細胞/ウェル)を播種した。24時間のインキュベーションの後(すなわち、80~90%コンフルエントになるまで)、培地を、100μLの新しい無血清OPTIM(Gibco/BRL)またはRPMIまたはDMEMの培地のいずれかと交換した。製造元の説明通りにリポフェクタミン2000トランスフェクション試薬(プロメガ、ウィスコンシン州マディソン)を使用して、両方の種類の細胞に、16x-TCF(TK)-ホタルルシフェラーゼ(0.3μg/ウェル)およびTK-Renilla-ルシフェラーゼ(0.06μg/ウェル)をトランスフェクトした。このDNA混合物および試薬を次に室温で20分間インキュベートする。1ウェル当たり50μL/ウェルのDNA-試薬混合物を100μLのOPTIMに加え、37°Cで4時間インキュベートする。トランスフェクション培地を、それぞれ293A細胞またはU2OS細胞で140μLの新しいDMEMまたはRPMI培地に交換した。GSK阻害剤(3-(3-クロロ-4-ヒドロキシフェニルアミノ)-4-(2-ニトロフェニル)-1H-ピロール-2,5-ジオン)をそれぞれの培地で希釈して、1ウェル当たり150μLの最終量の10xストックを得た。1ウェル当たり10μLの10xストックを、適宜希釈した賦形剤(すなわちDMSO)コントロールとともに加えた。CO₂インキュベーター中37°Cで20~24時間のインキュベーションの後、この化合物を含有する培地を除去した。トランスフェクトし、GSK-3阻害剤で処理した細胞単層に、デュアルLuci(Dual Luci)試薬(プロメガ・コーポレーション(Promega Corp.)、ウィスコンシン州マディソン)の1x溶解バッファー150μLを加えることによって、溶解させた。10分後、20μLの溶解物

を96ウェル白色プレート(パッカード/コスター(Packard/Costar))中に移した。細胞溶解物を、100 μ L/ウェルのLARIIBUFFER(デュアルLuci試薬)と混合し、相対ルシフェラーゼ単位(RLU)を測定した。この後、100 μ L/ウェルの「ストップ・アンド・グロウ」(stop & grow)試薬(デュアルLuci試薬)を加え、内部標準renillaルシフェラーゼを測定した。TCF-ホタル-Luciのrenillaに対する比率を計算し、図1~2に示した。

【0464】

図1Aおよび1Bは、TCFレポーターコンストラクトがHEK-293AおよびU2OS骨細胞の中にトランスフェクトされた場合に、iGSK-3が用量依存的にレポーターを転写活性化することができることを示している。TCF-ルシフェラーゼシグナル、すなわちWntシグナルの誘導は、U2OS骨細胞中の方がHEK-293細胞中よりも顕著である。さらに、図1Bは、U2OS細胞中で、TCFシグナルの顕著な誘導がiGSK-3の濃度10 μ Mで観察され、30 μ Mでは、293A細胞とは異なりほぼ最大に達したことを示している。これより、U2OS骨細胞はHEK-293A細胞よりも、Wntシグナル調節に対して敏感であることが分かる。

10

【0465】

(実施例2)

(GSK-3阻害剤は、U2OSヒト骨芽細胞中のTCFシグナリングを、Dkk1の媒介する阻害から開放する)

この実施例は、GSK-3阻害剤(3-(3-クロロ-4-ヒドロキシフェニルアミノ)-4-(2-ニトロフェニル)-1H-ピロール-2,5-ジオン)が、U2OS細胞中のTCFシグナリングを、Dkk1の媒介する阻害から開放するために使用できることを示す。図2に示されるように、Wnt1およびWnt3AはTCFシグナルをコントロールの約10~15倍活性化する。Dkk1を添加すると、Wntの媒介するTCFシグナリングが阻害される。しかし、GSK-3阻害剤が阻害を逆転させることができる。さらに、これらのデータは、Wntリガンド(例えば、Wnt3A)の存在下でDkk1およびLRP5の相互作用を遮断することができる化合物を同定することが意図された別の細胞によるTCFアッセイを確認し構成するための小分子ツールとしてiGSK-3を使用できることを示している。最終読取値では、Dkk1が媒介して抑制されるTCFシグナルが活性化されている。Dkk1-LRP5相互作用を遮断してTCFシグナルを活性化することができる既知の性分死が存在しないと、iGSK-3がTCFシグナルを活性化することが示されている。これは、経路を内部から調節することによって、Dkk1によってLRP5を介して外部に発揮される抑制を開放することができることを示している。図2に示される実験は、U2OS(ATCC)骨細胞を使用しており、LRP5/6受容体の内因性発現に基づいている。これらの細胞を25,000細胞/ウェルで播種し、24時間のインキュベーションを行う(すなわち、80~90%コンフルエントまで)。培地を、100 μ Lの新しい無血清OPTIM(ギブコ/BRL)またはRPMI培地と交換する。製造元の説明通りにリポフェクタミン2000トランスフェクション試薬(プロメガ、ウィスコンシン州マディソン)を使用して、細胞に、16x-TCF(TK)-ホタルルシフェラーゼ(0.3 μ g/ウェル)、TK-Renilla-ルシフェラーゼ(0.06 μ g/ウェル)、Wnt1またはWnt3a(0.0025 μ g/ウェル)、およびDkk1(0.1 μ g/ウェル)を共トランスフェクトした。このDNA混合物および試薬を次に室温で20分間インキュベートする。1ウェル当たり50 μ L/ウェルのDNA-試薬混合物を100 μ LのOPTIMに加え、37 $^{\circ}$ Cで4時間インキュベートする。トランスフェクション培地を、140 μ Lの新しいRPMI培地に交換した。GSK-3阻害剤をRPMI培地で希釈して、1ウェル当たり150 μ Lの最終濃度(30 μ M)の15xストックを得た。1ウェル当たり10 μ Lの15xストックを、適宜希釈した賦形剤(すなわちDMSO)コントロールとともに加えた。ACO₂インキュベーター中37 $^{\circ}$ Cで20~24時間のインキュベーションの後、この化合物を含有する培地を除去した。トランスフェクトし、GSK-3阻害剤で処理した細胞単層に、デュアルLu

20

30

40

50

c i 試薬 (プロメガ・コーポレーション、ウィスコンシン州マディソン) の 1 × 溶解バッファー 150 μL を加えることによって、溶解させた。10 分後、20 μL の溶解物を 96 ウェル白色プレート (パッカード/コスター) 中に移した。細胞溶解物を、100 μL / ウェルの L A R I I バッファー (デュアル L u c i 試薬) と混合し、相対ルシフェラーゼ単位 (R L U) を測定した。この後、100 μL / ウェルの「ストップ・アンド・グロー」試薬 (デュアル L u c i 試薬) を加え、内部標準 r e n i l l a ルシフェラーゼを測定した。T C F - ホタル - L u c i の r e n i l l a に対する比率を計算し、図 2 に示した。

【0466】

この結果は、W n t 1 または W n t 3 A のいずれかを使用すると、それぞれ T C F シグナルが基本レベルの約 10 ~ 15 倍増加することを示している。D k k 1 を W n t 1 または W n t 3 A とともに共トランスフェクトすると、T C F 活性がほとんど完全に抑制される。しかし、W n t 1 / W n t 3 A および D k k 1 をトランスフェクトした細胞に i G S K - 3 を加えると、W n t 1 ではほとんど完全に抑制から開放され、W n t 3 A では約 75 % 開放される。この実験は L R P 5 / 6 受容体の内因性発現に基づいているが、このようなアッセイは、トランスフェクトした L R P 5 / 6 の過剰発現、または L R P 5 / 6 と分子の特異的相互作用に対処するために特異的 s i R N A による内因性 L R P 5 / 6 の抑制によって変更することができる。

【0467】

(実施例 3)

(マウス頭蓋冠モデルにおける骨形成に対するグリコゲンシンターゼキナーゼ - 3 (G S K - 3) 阻害剤の影響)

G S K - 3 阻害を介した W n t 経路活性化によって骨形成が誘導されるかどうかをインビボで調べるため、G S K - 3 阻害剤 (i G S K - 3) (すなわち、3 - (3 - クロロ - 4 - ヒドロキシフェニルアミノ) - 4 - (2 - ニトロフェニル) - 1 H - ピロール - 2 , 5 - ジオン) のマウス頭蓋冠に対する局所投与を行った。

【0468】

4 週齢の雄のスイス - ウェブスター (S w i s s - W e b s t e r) マウスの頭蓋冠の右側に、1 m g / k g の i G S K - 3 または賦形剤のみを、7 日間および 18 日間毎日皮下注射した。i G S K - 3 の頭蓋冠の骨に対する影響を、組織切片において、アルカリホスファターゼ (A L P アーゼ) 酵素組織化学的染色、定量的形態計測、および免疫組織化学による カテニン発現によって評価した。C O₂ 麻酔によって屠殺した後、頭蓋冠を無傷で取り外し、軟部組織を丁寧に解剖し、さらなる処理および分析のために骨を 70 % エタノール中で 24 時間固定した。次に、ラムダ縫合および冠状縫合と平行に頭頂骨の中心部を通過して矢状縫合に対して垂直に頭蓋冠を二等分した。頭蓋冠前部をパラフィン切片に使用し、頭蓋冠後部を凍結切片に使用した。厚さ 5 μm の代表的で不連続な段階の切片を 4 ~ 5 枚切り取った。パラフィン切片は、通常通りヘマトキシリンおよびエオシン (H & E) で染色して頭蓋冠の厚さを測定した。凍結切片は、アルカリホスファターゼ検出に使用した。組織形態計測的測定を容易にするため、矢状縫合の縁から各骨の外側縁における筋肉付着部までの各切片の 2 m m の標準長さを使用した。全ての測定は、R & M バイオメトリック・インコーポレイテッド (R & M B i o m e t r i c s I n c .) バイオクアント・イメージ・アナリシス・システム (B i o q u a n t I m a g e A n a l y s i s S y s t e m) を使用して行った。

【0469】

固定後、頭蓋冠前部を、サージパス・デカルシファイア I I (S u r g i p a t h D e c a l c i f i e r I I) (イリノイ州、リッチモンド (R i c h m o n d , I L)) 中で 7 ~ 8 時間脱灰した後、等級分けされたアルコール中で脱水する。厚さ 4 ~ 5 μm の代表的で不連続な冠状の段階のパラフィン切片を ~ 5 枚切り取った。組織切片中の非リン カテニンの検出には、合成ペプチド C G G - S Y L D S G I H S G A T T T A P S L S G K (配列番号 4) を免疫原として使用してアップステート・バイオテクノロジー (U

10

20

30

40

50

p state Biotechnology) (ニューヨーク州レークブラシッド) によって産生されたマウスモノクローナル抗体を使用した。このモノクローナル抗体は カテニンの非リン酸化体を認識する (カタログ番号 06-734、アップステート・バイオテック (Upstate Biotech))。アビジン結合 AP システム (ベクター・ラボラトリーズ (Vector Laboratories)、カリフォルニア州バーリングゲーム) を使用して抗体のエピトープへの結合を可視化した ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$)。コントロールは、一次抗体が存在せずにアビジン - AP を使用するサンプルを含んだ。

【0470】

70% エタノールで固定した後のマウス頭頂骨の $6 \mu\text{m}$ 凍結切片において、ベクター・レッド・アルカリホスファターゼ基質キット (Vector Red Alkaline Phosphatase Substrate Kit) (ベクター・ラボラトリーズ、カリフォルニア州バーリングゲーム) を使用して組織化学的染色を行って、アルカリホスファターゼ (ALPアーゼ) の活性評価した。

10

【0471】

これらの実験 (図3~4) から、GSK-3 阻害剤を 18 日日間注射した右半分の頭蓋冠を、同じ動物の注射していない左半分の頭蓋冠と比較すると頭蓋冠の厚さが統計的に増加することが示された (11.8% 、 $p < 0.005$)。しかし、GSK-3 阻害剤の頭蓋冠の厚さに対する影響を、賦形剤コントロールのみ (賦形剤は 2% の Tween 80 および 0.5% メチルセルロースを含有する 50% の DMSO) で処理したマウスと比較すると、頭蓋冠の厚さはわずか 6% の非統計的増加であった (図5)。重要なことは、2% の Tween 80 および 0.5% のメチルセルロースを含有する 10% DMSO を含有する異なる賦形剤に GSK-3 阻害剤を溶解させ、 $1 \text{mg}/\text{kg}/\text{d}/\text{s.c.}$ で 7 日間注射すると、賦形剤コントロール処理の頭蓋冠と比較して、頭蓋冠の厚さが統計的に有意な 10% の増加となった (図6)。

20

【0472】

GSK-3 阻害剤がどのようにして同化作用を誘発するのかの機序を調べるために、アルカリホスファターゼ、骨芽細胞分化、および機能マーカーに対して組織化学的染色を実施した。賦形剤コントロールと比較して、アルカリホスファターゼの顕著な増加が、GSK-3 阻害剤を 7 日間局所投与した頭蓋冠中の骨芽細胞において観察された (図7)。GSK-3 阻害剤を注射した頭蓋冠の免疫組織化学 (IHC) から、前骨芽細胞および骨芽細胞が裏打ちする骨膜中に強い カテニン発現が見られた (図7)。これとともに、これらの発見から、iGSK の局所注射による GSK-3 の阻害によって、骨同化作用が得られ留ことが分かり、これは骨芽細胞活性を誘導する カテニン量の増加層関連がある。

30

【0473】

(実施例 4)

(骨芽細胞中の Flexercell (登録商標) 荷重および遺伝子発現)

Flexercell (登録商標) アッセイを、骨芽細胞に対して実施することができる: U2OS (ATCC)、MG-63 (ATCC)、SAOS-2 (ATCC)、HOS-TE85 (ATCC)、HOB03CE6 (ワイエス)、HOB01C1 前骨細胞 (ワイエス)、およびヒト初代骨芽細胞。このアッセイは、MC3T3 細胞 (ATCC)、およびマウス初代骨芽細胞に対して実施することもできる。さらに、UMR-106 (ATCC)、ROS17/2.8、およびラット初代骨芽細胞などのラット細胞系も同様に使用することができる。使用するためのさらに別の哺乳類細胞系は当業者には明らかである。

40

【0474】

この実施例では、細胞のインビトロ荷重および遺伝子分析をマウス骨芽細胞 MC3T3 細胞に対して実施した。本明細書に記載の Flexercell (登録商標) システムを使用して MC3T3 細胞に対して機械的ひずみ (5 時間) を与えると、付加を与えていないコントロールと比較して、負荷直後で、COX-2 (2.5 倍)、eNOS (2.5 倍)、コネキシン 43 (3.5 倍)、Jun (3.5 倍)、サイクリン D1 (3.5 倍)、

50

Wnt 10B (3倍)、SFRP1 (3倍)、c-Fos (3.5倍)、およびFrizzled 2 (3倍)の誘導を示した(図8)。負荷を与えた後ではWISP2遺伝子発現の誘導が最小であった。

【0475】

これらの実験では、マウスMC3T3骨芽細胞を、10%の熱不活性化FBS、1%のグルタマックス(インビトロジェン)、および1%のペニシリン/ストレプトマイシン(インビトロジェン)を補給した最小必須培地(MEM)(インビトロジェン)中で培養した。MC3T3細胞を80,000~100,000細胞/ウェルで、コラーゲンI型をコートしたバイオフィレックス6ウェルプレート(フレクセル・インターナショナル・コーポレーション、ペンシルバニア州マッキーズポート(McKeesport, PA)中に播種し、続いて3~4日またはコンフルエントになるまで培養した。荷重を与える24時間前に、培地を、2mLの新しい増殖培地、またはMEM、0.25%のBSA(セロロジカルズ・プロテインズ・インコーポレイテッド(Serologicals Proteins Inc.)),イリノイ州カンカキー)、グルタマックス、および/ストレプトマイシンを前述のように含有する無血清培地と交換した。無血清培地中で予備処理されるサンプルは、細胞を2mLの基本MEM培地でそれぞれ2回洗浄した後、BSA含有培地を加えた。機械的荷重を与える直前に、培地を除去し(すなわち、増殖培地を含有するサンプルを基本MEM培地で2回洗浄した)、1mLのMEM/BSAのみ、または化合物(すなわち、GSK-3阻害剤、3-(3-クロロ-4-ヒドロキシフェニルアミノ)-4-(2-ニトロフェニル)-1Hピロール-2,5-ジオン)とともに各ウェルに加えた。FX-3000Flexercell(登録商標)ひずみユニット(フレクセル・インターナショナル・コーポレーション)を使用して細胞に、3,400 μ (2Hz、7200サイクル/時)相当の機械的変形を5時間与えた。次に、機械的ひずみを与えたサンプルおよびひずみを与えていないコントロールの両方から、荷重を与えた直後または24時間後に、RNAを回収した(キアゲン・Rnイーザー(Qiagen Rneasy)ミニキットを使用)。フレクサーセルを使用した実施例で示される全データは、荷重を与えた直後に回収したrna8から得たものである。Wnt/カテニン標的遺伝子発現の調整の大きさの変動はわずかであったが、負荷によって調節される遺伝子は、負荷の24時間後にRNAを回収した場合と同じであった(データは示していない)。

【0476】

次に、前述のマウス遺伝子特異的プライマーおよびプローブを使用して記載の遺伝子のリアルタイムPCRを行った。使用したプライマーおよびプローブは表13に示している。

【0477】

(実施例5)

(Wnt経路の予備活性化による骨荷重の増強)

遺伝子発現結果に基づいて、次のステップでは、Wnt経路の予備活性化が骨負荷応答を増強するかどうかを調べた。ここで、MC3T3細胞、グリコーゲンシンターゼキナーゼ-3阻害剤(すなわち、3-(3-クロロ-4-ヒドロキシフェニルアミノ)-4-(2-ニトロフェニル)-1Hピロール-2,5-ジオン)で処理して、カテニンの核へのトランスロケーションを増加させ、それによって標準Wnt/カテニン経路を活性化させた。GSK-3阻害剤を投与した直後に、細胞に負荷(3,400 μ 、2Hz、72,000サイクル/時、実施例4で前述したものと同一)を5時間与えた。GSK-3阻害剤(5 μ M)によって、コネキシン43、サイクリンD1、Wnt 10B、SFRP1、FZD2、WISP2、COX-2、eNOS、FOS、およびJUNに対して相乗的な誘導が得られた(図9)。さらに、本発明者らは、負荷の存在下でのこれらのWnt/カテニン標的遺伝子の相乗的誘導は、iGSK-3濃度に対して用量依存性であることを示した(図10および表4参照)。

【0478】

10

20

30

40

50

このデータに基づくと、Wnt経路を活性化する物質を与えることによって、骨負荷刺激に対する応答で得られる遺伝子発現応答を増強できる。このような骨負荷刺激の増強は、類似の増強特性を示す他の物質の同定に有用であり、骨量減少の予防または骨量減少障害の治療に使用することができる物質の同定にも有用である。

【0479】

(実施例6)

(インビボの機械的負荷に対する応答における骨のシグナリング経路を媒介する カテニンの活性化)

骨量の増加と減少の両方は、Wnt補助受容体、低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質(LRP)5中の変異と関連がある。LRP5 G171Vトランスジェニックマウスおよびそれらの非トランスジェニック同腹子の脛骨に対して脛骨4点(4-pt.)曲げシステムを使用して機械的負荷を与えると、骨細胞シグナリング経路のいくつかの重要な成分の遺伝子発現パターンに顕著な変化が見られた(表2)。骨芽細胞活性の増加と関連する カテニンの媒介する遺伝子転写は、荷重を与えた後で非トランスジェニックマウスおよびLRP5 G171Vトランスジェニックマウスの両方でアップレギュレートしたが、LRP5 G171Vトランスジェニック(HBMトランスジェニックとも呼ばれる)の方がアップレギュレーションが大きかった。LRP5 G171V変異は、破骨細胞の動員および機能を弱めるRANKL/OPGシグナリングを抑制することも確認された。これらの結果から、HBM変異(G171V)は骨の異化作用に負の影響を与え、それによって骨増殖が増加することを示している。

10

20

【0480】

齧歯類の脛骨に4点まげシステムなどの装置を使用して周期的な機械的負荷を骨に与えると、体重負荷運動の効果が刺激され、骨膜の骨芽細胞の増殖、分化、および活性が増加する(タナー(Tanner) et al., J. Bone Miner. Res. 16: S203 (2001); ボパート(Boppart) et al., Bone 23(5): 409-415 (1998); ラーブ-カレン(Raab-Cullen) et al., Calcif. Tissue Int. 55: 473-78 (1994); カレン(Cullen) et al., J. Appl. Physiol. 88: 1943-48 (2002))。4点曲げはいくつかの増殖因子の遺伝子発現を刺激するが、機械的シグナルの生化学的応答から骨モデリング過程の活性化までの変換を市販する正確な分子事象はほとんど分かっていない。

30

【0481】

低密度リポタンパク質受容体関連タンパク質(LRP)は、多様な生物学的過程に関与する細胞表面受容体のファミリーの1つである。このファミリーの2つのメンバーであるLRP5および6は、カテニンを介するTCF/LEF活性化プロモーターへの信号伝達を促進するWnt補助受容体であると推定されている。骨量減少は、LRP5遺伝子の不活性化変異と関連する。LRP5ノックアウトマウスは、骨芽細胞増殖および機能が低く、Runx2/CBFA1が正常な発現をするにもかかわらず低骨ミネラル密度となる。一方、骨量増加は、同じ遺伝子の他の変異と関連する。LRP5遺伝子中の特定の1つの点変異、グリシン171からバリンへの(G171V)変異によって、高骨量の表現型(すなわち、HBM)となり、2つの独立したヒト家系の全てのメンバーが影響を受ける。ヒトLRP5 G171V遺伝子を発現するトランスジェニックマウス(LRP5 G171V TG)は、高骨量の表現型を忠実に複製している。したがって、骨芽細胞生物学、増殖、および分化は、LRP5/Wnt媒介シグナリングと関連していると思われる。

40

【0482】

以下のデータは、LRP5 G171Vトランスジェニック(TG)マウスが、負荷を与えた後に、非TGマウスよりも、骨形成および応力で活性化される応答が大きくなることを示している。さらに、カテニン媒介遺伝子転写は、荷重後に非トランスジェニック(非TG)マウスおよびLRP5 G171V TG(HBM TG)マウスの両方で誘

50

導される。カテニンシグナリング経路を介したシグナリングによって増強される遺伝子型を有する(負荷がない場合でも)HBM TGマウスは、カテニン媒介遺伝子転写をさらにアップレギュレートすることによって負荷に応答する。LRP5におけるHBM変異(すなわち、G171V)は、破骨細胞の増殖および活性に關与する遺伝子をダウンレギュレートさせることも本明細書で示されている。本発明者らは、破骨細胞の増殖および活性と關与する主要遺伝子の発現をダウンレギュレートし、それによって骨吸収を阻害する、LRP5におけるG171V変異のこれまで不明であった役割についても議論する。

【0483】

マウスの骨のインビボ荷重を伴う実験のための、ヘテロ接合体TIC-LRP5 G171Vマウスが、バビー(Babij) et al., J. Bone Mineral Res. 18(6):960-974(2003)に記載されており、これを使用した。これらの動物は、全体積骨密度において統計的に有意な増加(30~55%)を示す。機械的負荷は、右腓骨に対してマウス4点曲げ装置を使用して与えた(アクター(Akhter) et al., Calcif. Tissue Int. 63(5):442-9(1998)。この装置は、インビボで正確に外力を与えるために特性決定し校正を行った。同様に; ペデルセン(Pedersen) et al., Calcif. Tissue Int. 65(1):41-6(1999);アクター(Akhter) et al., J. Clin. Densitom. 5(2):207-16(2002)。この装置はバルサ材で構成された厚さ1mmの手術用チューブで覆われてる4つの丸いパッドを介して力が加えられる。上部パッドは4.5mm離れており、12mm離れた下部パッドの中間部にあり、これによって中央横方向で曲げが生じる。荷重を与えている間、動物はイソフルランで麻酔をかけて、脚を適切な位置に維持した。

【0484】

これらの実験においては、左足は負荷を与えないコントロールとして機能し、変異によって大きさの差を示した。4点曲げで5日間、右脛骨に負荷を与えた。カルセインを5日目および12日目に注射し、15日目に組織を回収した。雌には6ニュートン(N)(すなわち、非TG2, $231 \pm 110 \mu$; HBM TG1, $525 \pm 81 \mu$)を与え、雄には7N(すなわち、非TG2, $740 \pm 157 \mu$; HBM TG1, $841 \pm 131 \mu$)。LRP5 G171V TGマウスおよび非TGマウスの負荷を与えた領域から脛骨断面を得た。蛍光顕微鏡を使用して得られた骨の2つの2つのカルセイン先端の間の距離を計算することによって、無機物付着速度(MAR)を計算した。単一標識表面(SLS)、二重標識表面(DLS)、および骨表面(BS)の線寸法を求め、式 $DLS + (1/2 SLS) / BS \times 100$ を使用してパーセントMS/BSを計算した。0.03 mm²の画像ウィンドウを使用し、約1.67 mm²の領域を覆って、40倍の倍率で染色されていない10 μmの切片上で測定を行った。全ての測定は、R&Mバイオメトリック・インコーポレイテッドのバイオクアント・イメージ・アナリシス・システムを使用して行った。

【0485】

初代骨芽細胞を得るために、負荷を与えていない約4週齢のTIC系19 LRP5 G171V TGマウスおよびそれらの野生型非TG同腹子から脛骨を分離し、小さなチップに切断し、DMEM中に溶解したコラゲナーゼ(1 mg/mL)を使用して、震盪水浴中37で30分間消化した。消化した上澄みを遠心分離によって除去し、コラゲナーゼ消化をさらに2回繰り返した。3回目の消化後に得られたチップを新しい増殖培地(10%ウシ胎児血清を補給したDMEM)に写し、細胞のコンフルエントプレートが得られるまで標準的方法で増殖させた。このプレートをシーディング1と呼んだ。チップを次に再度播種して培養し、さらに2つのシーディングを回収した。

【0486】

最初の2つの骨チップシーディングから単離したRNAを使用して、アフィメトリックス(Affymetrix)MGU74Av2アレイにハイブリダイゼーションするため

の cRNA (すなわち、相補的 RNA) を作製した。製造元の使用説明書通りにキアゲン RNA キットを使用して 80% コンフルエントプレート全ての RNA を単離した。標的の相補的 RNA (cRNA) 製剤およびアフィメトリックス MGU74Av2 アレイに対するハイブリダイゼーションは、実質的に記載通りに行った。ヒル (Hill) et al., Science 290 (5492): 809-12 (2000)。

【0487】

データは、1組のスパイクインコントロールを使用して規格化し、従来記載の通りに分析した。ヒル (Hill), Genome Biol. 2 (12): RESEARCH 0055 (2001)。

【0488】

TaqMan (登録商標) 分析のため、製造元の使用説明書通りにアンピオン (AMBIION) RNA キットを使用して骨から全 RNA を単離した。全 RNA に対して DNアーゼ I 処理を行い、以下の標準プロトコル通りに TaqMan (登録商標) 反応で分析した:

【0489】

【表 21】

1.	ABI	4322171	高容量 cDNA アーカイブキット	
2.	ABI	4313663	接着カバー・スタートパック (Adhesive Cover Start Pack)	20
3.	ABI	4311971	接着カバー、100/PK	
4.	ABI	4318157	2×マスター・ミックス (Master Mix)	
5.	ABI	450025 または 4316034	6FAM または VIC と標示されるプローブ	
6.	ABI	4304971	配列決定プライマー、最小 40,000pmol	
7.	マーシュ (Marsh)	AB-0626	接着 PCR ホイルシール (Adhesive PCR Foil Seals)	
8.	マトリックス 8095	25mL	リザーバー (Reservoir)w/デバイダー (Divider)	30
9.	アンピオン	9937	ヌクレアーゼ非含有の水	
10.	アンピオン	2684	RN アーゼ阻害剤	

【0490】

(逆転写 (ABI 4322171 高容量 cDNA アーカイブキット (High Capacity cDNA archive Kit)))
cDNA カクテルを以下のように作製する:

【0491】

【表 2 2】

試薬	反応当たりの体積(ウェル当たり)	
10×RT バッファー	10 μL	
25×dNTP ミックス	4 μL	
マルチスクライブ(Multiscribe)RT アーゼ (50U/μL)	5 μL	
10×ランダムプライマー	10 μL	
RN アーゼ阻害剤	2 μL	10
H ₂ O	X(100 μL まで)	
DN アーゼ処理した RNA	Y(1~10 μg)	
合計	100 μL	

【0 4 9 2】

十分混合し、室温で10分、さらに37℃で2時間インキュベートする。プレートは -80℃で1年間まで保管することができる。

【0 4 9 3】

(I I . Q C および P C R)

1 ウェル当たりプレート 50 ng / 10 μl の c D N A 。希釈した c D N A は - 2 0 で1週間保管することができる。50 μM のプライマーミックスを調製する。A B I (1 0 0 μ M) から一部のプローブを使用する。c D N A カクテルを以下のように作製する。

【0 4 9 4】

【表 2 3】

試薬	反応当たりの体積(ウェル当たり)	
2×PCR マスターミックス	12.5 μL	
50 μM プライマーミックス	0.2 μL	30
100 μM プローブ	0.05 μL	
H ₂ O	2.25 μL	
cDNA	10 μL	
合計	25 μL	

【0 4 9 5】

簡単に述べると、プレートを回転させて、A B I 7 0 0 0 に入れ、A B I 使用説明書によりデータを分析する。さらに考慮する点としては以下のことが挙げられる：

- 1 . プライマー希釈液および P C R カクテルはプレ P C R フード (p r e - P C R h o o d) で調製すべきであり、好ましくは使用日に調製する。 40
- 2 . 低レベルで発現する遺伝子に調整するためにベースラインが必要となり得る。
- 3 . ポジティブコントロールは、できれば各プレートに加えるべきである。これによって異なるプレートおよび装置から得られるデータを規格化しやすくなる。

【0 4 9 6】

(インピボ荷重実験での使用)

DN アーゼ 1 消化
アンピオンの試薬

【0 4 9 7】

【表 2 4】

	小規模	
RNA	10 μ g	
10 \times DN アーゼ 1 バッファー	5 μ L	
RN アーゼ阻害剤	1 μ L	
DN アーゼ処理済 1	2 μ L	
DEPC H ₂ O	50 μ L まで	
合計	50 μ L	10

【0 4 9 8】

37 で 45 分 ~ 1 時間 インキュベートする。1 \times フェノール C H C l₃ を加え、完全一致 (e x a c t) (スピ ン 15 分 @ 14 , 000) 。

【0 4 9 9】

沈殿：

【表 2 5】

	EA	
DN アーゼ 1 消化	全て	20
DEPC H ₂ O	200 μ L まで	
5M の NaOAC	5 μ L	
グリコーゲン	5 μ L	
冷 100% ETOH	600 μ L	

【0 5 0 0】

十分混合する。- 80 で 3 時間またはドライアイス中で 20 分維持する。4 で 15 分間回転させる。75% の E T O H で 1 回洗浄する。D E P C H₂O 中に再度懸濁させる。定量するために、1 : 50 で希釈し OD を測定する。キアゲンの方法などの他の方法を使用することもできる。アーノルド (A r n o l d) e t a l . , B i o T e c h n i q u e s 25 (1) : 98 - 106 (1998) 。全てのプローブ - プライマー対は、アプライド・バイオシステムズ (A p p l i e d B i o s y s t e m s) から入手した。この研究で使用した T a q M a n (登録商標) プローブ - プライマー対の一覧は表 13 で見ることができる。

【0 5 0 1】

非 T G マウスと比較して L R P 5 G 1 7 1 V T G マウスの骨の大きさの増加が観察された。大腿骨および椎骨のより大きな構造強度特性と直接関係があり、外部負荷 1 ニュートン (N) 当たりの実際のひずみは、L R P 5 G 1 7 1 V T G マウスの方が非 T G マウスよりもはるかに小さい。したがって、非 T G 同腹子とは対照的に、L R P 5 G 1 7 1 V T G マウスはひずみとして与えられた実際の負荷の約 70% しか感知していない。

【0 5 0 2】

非トランスジェニックおよび L R P 5 G 1 7 1 トランスジェニックの雄および雌のマウスの骨形成を、4 - p t 曲げシステムで荷重を与え後に組織形態計測的方法を使用して評価した。雌マウスには 6 N の負荷を与えた (T G マウスにおける同等のひずみは 2 , 2 3 1 \pm 1 1 0 μ であり、L R P 5 G 1 7 1 V T G マウスにおいては 1 , 5 2 5 \pm 8 1 μ である) 。雄マウスには 7 N の負荷を与えた (非 T G マウスにおける同等のひずみは 2 , 7 4 0 \pm 1 5 7 μ であり、L R P 5 G 1 7 1 V T G マウスにおいては 1 8 4 1 \pm 1 3 1 μ である) 。負荷を与えていないコントロールと比較すると、荷重を与える

と両方の遺伝子型および性別で脛骨において強い骨形成応答が見られ、これは骨膜のカルセイン標識表面の増加によって確認した(図11)。負荷を与えた非TGおよび負荷を与えたLRP5 G171V トランスジェニックマウスにおけるカルセイン標識の増加に、顕著な差はなかった。しかし、LRP5 G171V TGマウスで感知されるひずみが非TGマウスよりも約30%低いことを考慮すると、外部負荷を与える場合、LRP5 G171V TGマウスにおける骨形成応答の方が大きい。

【0503】

機械的負荷および同化による骨増殖の効果に関する従来の研究に基づくと、LRP5 G171V 変異は、骨負荷に対する骨細胞の感受性を変化させ、それによって骨形成を増加するか能力についての試験であった。ボパート(Boppart) et al., Bone 23(5):409-415(1998);カレン(Cullen) et al., Exercise: BasicおよびApplied Science 227-237(リップニコット・ウィリアムズ・アンド・ウィルキンス(Lippincott Williams & Wilkins),ボルチモア(Baltimore), MD 2000);アクター(Akhter) et al., Calcif. Tissue Int. 63(5):442-9(1998);およびアクター(Akhter) et al., J. Clin. Densitom. 5(2):207-16(2002)を参照されたい。インビトロでの周期的機械的荷重によって、プロスタグランジンE(PGE)の放出、プロスタグランジンシンターゼ(COX-2)、プロスタサイクリンシンターゼ(PTGIS)、および内皮酸化窒素シンターゼ(eNOS)遺伝子の発現を誘導し、これらは骨芽細胞機能において重要な役割を果たす。骨負荷に対する応答で転写される遺伝子のさらなる分析は、17週齢の雄および雌のLRP5 G171V TGマウスおよび非TGマウスを使用し、雌マウスに6Nおよび雄マウスに7Nの負荷をインビボで与えてから4時間後および24時間後に脛骨から得られるRNAに対してリアルタイムPCR(TaqMan(登録商標))を実施することで行った。3つ全ての遺伝子(すなわち、COX-2、eNOS、およびPTGIS)の転写が全てのマウスの骨中でアップレギュレートした($P < 0.01$)(図12)。しかし、このアップレギュレーションは、LRP5 G171V TGマウスの方がその非TG同腹子よりも約4~10倍大きかった。

【0504】

オステオネクチン(SPARC)、カテプシンK(CTSK)、およびメタロプロテイナーゼ組織阻害剤(TIMP)などのいくつかの骨細胞マーカー遺伝子の転写が、荷重を与えた非TGマウスおよびLRP5 G171V TGマウスの両方でアップレギュレートした。これは、表13のプライマーおよびプローブを使用してTaqMan(登録商標)により測定した。しかし、前述の遺伝子の場合と同様に、LRP5 G171V TGマウスにおける応答の方が大きく、これらのマウスにおいて骨形成活性の増加が示された。表7は骨荷重に対する応答でこれらのマウスでアップレギュレートおよびダウンレギュレート遺伝子を示している。

【0505】

【表 2 6 A】

表 7

HBM 識別特性遺伝子の遺伝子型および負荷により誘導される転写

経路	遺伝子名	遺伝子型効果	負荷効果	
Wnt	サイクリン	顕著な変化なし	TG 動物および非 TG 動物の両方で増加。 HBM TG 動物の方が大きい。	
	D1			
	コネキシン	顕著な変化なし	TG 動物および非 TG 動物の両方で増加。 HBM TG 動物の方が大きい。	10
	43			
	WISP2	HBM TG 動物で増加	TG 動物および非 TG 動物の両方で増加。 HBM TG 動物の方が大きい。	
	Frizzled 2	顕著な変化なし	TG 動物および非 TG 動物の両方で増加。 HBM TG 動物の方が大きい。	
	SFRP1	HBM TG 動物で増加	TG 動物および非 TG 動物の両方で増加。 HBM TG 動物の方が大きい。	
	SFRP4	HBM TG 動物で増加	TG 動物および非 TG 動物の両方で増加。 HBM TG 動物の方が大きい。	20
	Wnt10B	HBM TG 動物で増加	TG 動物および非 TG 動物の両方で増加。 HBM TG 動物の方が大きい。	
	HBM1 識別 特性遺伝子	IGFBP6	HBM TG 動物で増加	TG 動物および非 TG 動物の両方で増加。 HBM TG 動物の方が大きい。
CTSK		HBM TG 動物で増加	TG 動物および非 TG 動物の両方で同様に増加。	
オステオネ クチン		顕著な変化なし	TG 動物および非 TG 動物の両方で増加。 HBM TG 動物の方が大きい。	30
IGF2		HBM TG 動物で減少		
GADD45A		HBM TG 動物で減少		
Col1A1		顕著な変化なし		
TGF β		HBM TG 動物で増加		
TIMP3		HBM TG 動物で増加		
ACP5		HBM TG 動物で増加		
負荷センサ 一遺伝子		eNOS	顕著な変化なし	TG 動物および非 TG 動物の両方で増加。 HBM TG 動物の方が大きい。
	PTGS	顕著な変化なし	TG 動物および非 TG 動物の両方で増加。 HBM TG 動物の方が大きい。	

【表 2 6 B】

経路	遺伝子名	遺伝子型効果	負荷効果
	IL-6	HBM TG 動物で減少	TG 動物および非 TG 動物の両方で増加。 HBM TG 動物の方が大きい。
応力および 破骨細胞機 能遺伝子	IL-8	HBM TG 動物で減少	TG 動物および非 TG 動物の両方で増加。 HBM TG 動物の方が大きい。
	MK2	HBM TG 動物で減少	非 TG 動物でのみ増加。HBM TG では顕 著な変化なし。
	OPG	顕著な変化なし	HBM TG でのみ増加。非 TG では顕著な 変化なし。
	RANKL	顕著な変化なし	いずれも顕著な変化なし。
	LRP5	HBM TG でわずかに 増加	いずれも顕著な変化なし。

10

20

【0506】

「遺伝子型効果」とは、HBM TG または非 TG 同腹子のいずれかの骨中の遺伝子活性がどのように応答するかを意味する。骨で見られるタンパク質の発現も分析している（「負荷効果」の項目の列）。

統計的には、観察される遺伝子発現は、表 8 ~ 10 に示される以下の結果が得られる。

【0507】

【表 2 7】

表 8

非 TG マウスおよび LRP5 G171V TG マウスにおける
Wnt/ β -カテニン標的遺伝子の遺伝子型依存性転写
倍数の変化

<u>Wnt 関連および標的の遺伝子</u>	<u>HBM TG 対非 TG 動物</u>
CCND1	1.17
DKK3	0.33
MT2	3.00
NOTCH1	1.67
SFRP1	7.00
SFRP2	2.36
WISP2	2.33
WNT10B	1.55

30

40

【0508】

【表 2 8】

表 9

非 TG マウスおよび LRP5 G171V TG マウスにおける NF-kB
および JNK シグナリング経路遺伝子の遺伝子型依存性転写

<u>NF-kB/JNK シグナリング遺伝子</u>	<u>倍数の変化</u> <u>HBM TG 対非 TG 動物</u>	
GRO1	0.63	10
Jun B	0.38	
MAPKAPK5	0.50	
NFkB1	0.35	

【 0 5 0 9】

【表 2 9】

表 10

非 TG マウスおよび LRP5 G171V TG マウスにおける骨細胞機能遺伝子の転写の差

<u>骨機能関連遺伝子</u>	<u>倍数の変化</u> <u>HBM TG 対非 TG 動物</u>	
BGN	1.67	
BMP1	0.52	
Col1A1	1.64	
Col3A1	3.14	
CSF1R	0.42	30
CSPG2	5.00	
CTSK	2.42	
IGFBP5	0.48	
LUM	4.20	
MMP-14	1.56	
MMP-9	5.29	
OGN	3.00	
PCOLCE	2.00	40
PLAT	0.45	
S100A10	1.89	
SDF1	6.80	
SERPINE1	3.09	
SPP1	2.16	
TOB1	0.66	

【 0 5 1 0】

50

上記3つの表に記載される全ての倍数の変化は、 < 0.05 のP値で関連づけられている。

【0511】

遺伝子転写の最も強い誘導は、WntアンタゴニストのSRFP1で観察された。これは、慢性的に活性化されたカテニンシグナリングの過剰増殖作用を防止する骨細胞中のホメオスタシス応答を示しているといえる。Wnt10B RNAも、HBMマウスの骨中でのアップレギュレーションが観察された。早期の発育におけるWnt / カテニンシグナリングの役割は十分に研究されており、主要において実証された役割を有する。例えば、興味深いことに、Wnt-補助受容体(すなわち、LRP5)における変異によって、罹患した個人または動物が高骨量となるが悪性の表現型は現れない。さらに、カテニンは発育中に関与すると広く記載されているが、カテニンシグナリング経路が、正常成人の骨を活性化させ、機械感受性シグナルに対する応答で骨密度調整に関与することが示されたのは、これが最初である。

10

【0512】

カテニン標的遺伝子の発現は、負荷を与えていないHBM TGマウス(すなわち、G171V変異を有するマウス)の骨細胞中でアップレギュレートすることが示された。骨形成の差に寄与し得る、LRP5 G171V TGマウスまたは非TGマウスからの骨細胞の転写プロファイルの遺伝子型特性の差を理解するために、脛骨の骨チップシーディングからのRNA(前述の材料および方法で説明した通り)を分析した。骨芽細胞活性に作用する多くの遺伝子の転写が観察され、例えば、プロコラーゲンC-プロテイナーゼエンハンサータンパク質(PCOLCE)、コラーゲン1および3、骨特異的ビグリカン(BGN)、オステオグリシン(OGN)、マトリックスメタロプロテイナーゼ9および14(それぞれMMP-9およびMMP-14)、コンドロイチン硫酸プロテオグリカン(CSPG2)、コロニー刺激因子1受容体(CSF1R)、ErbbB-2.1のトランスドューサー(TOB1)、ならびにルミカン(LUM)の転写が観察された。これらの遺伝子は、G171V LRP5 TGマウスの骨で誘導され、これらのマウスの骨の骨形成活性の増加が見られた。これらの遺伝子の一部の転写活性を表8~10に示している。

20

【0513】

これらの骨特異的遺伝子以外に、多数のWnt / カテニンシグナリング関連遺伝子について、LRP5 G171V TGマウスにおいて異なる転写が観察された。Wntシグナリング成分遺伝子(例えば、Wnt10B、SRFP1、SRFP2、およびDKK3)およびカテニン標的遺伝子(すなわち、メタロチオニエン2(MT2)、サイクリンD1(CCND1)、およびWNT1誘導性シグナリング経路タンパク質2(WISP2))の転写が、LRP5 G171V TGマウスからの骨で誘導された(表8~11)。これらの観察は、Wntシグナリング経路におけるLRP5 G171V変異の役割に関して実施した研究によるものである。本発明者らは、数種類のシグナリング成分およびNF-kBおよびJNK経路の標的遺伝子(すなわち、NF-kB1、GRO1、JUNB)の転写がこれらのマウスにおいてダウンレギュレーションすることに気づいた。例えば、LRP5 G171V変異は、数種類の経路のシグナリングを調節することによって骨密度に影響を与えることができるが、最も顕著であるのがカテニンシグナリング経路である。

30

40

【0514】

カテニン媒介シグナリングは、非TGマウスおよびHBM TGマウスの両方で、骨に機械的負荷を与えた後で活性化することが示された。Wnt / カテニンシグナリングに依存するLRP5のアップレギュレーションは、骨芽細胞の増殖および機能の増加と関連している。機械的負荷を与えた後の、カテニン経路の骨形成活性に対する役割を評価するために、HBM TGマウスおよび非TGマウスの負荷を与えていないおよび負荷を与えた脛骨中の数種類の経路成分および標的遺伝子のRNA量を、前述のようにTaqMan(登録商標)によって分析した。

50

【0515】

非TGマウスの骨中のWnt 10B、SFRP1、CCND1、コネキシン43、およびWISP2のRNA量は、機械的負荷を与えてから4時間後および24時間後の両方で顕著にアップレギュレートした($\log_2 1 \sim 2$ の平均増加)(図13Aおよび13B)。Frizzled 2の転写は負荷の4時間後に誘導されたが、Frizzled 2のRNA量は24時間でベースラインまで戻った。SFRP4遺伝子の転写は、非TGマウスに荷重を与えて4時間後または24時間後のいずれでも顕著な変化はなかった。これらのデータから、機械的応力によって、非TG野生型マウスの骨細胞中の数種類のシグナリング成分およびカテニンシグナリング経路の下流標的遺伝子の転写を誘導することが分かる。

10

【0516】

LRP5 G171V TGマウスにおいては、分析した全てのWnt関連遺伝子およびカテニン標的遺伝子(SFRP4を含む)の転写でより顕著な増加(すなわち、 $\log_2 1.5 \sim 5.0$)が観察された。Frizzled 2のRNA量は、負荷の4時間後には非TGマウスおよびHBM TGマウスの両方でほぼ同僚で誘導された。しかし、非TGマウスとは異なり、HBM TGマウスでは24時間でもこの増加が維持された。遺伝子転写におけるこれらの変化は、両方の時点で $P < 0.01$ で統計的に有意であった(図13Aおよび13B)。これらの観察から、機械的荷重がカテニン媒介シグナリングを活性化させ、LRP5 G171V変異はWnt経路において機能獲得変異として作用することが分かる。

20

【0517】

機械的負荷のOPG/RANKL媒介シグナリングに対する影響も、HBM TGマウスおよび非TGマウスの両方で調べた。HBM TGマウスの骨においてNF- κ BおよびJun/Fos媒介シグナリングと関与する遺伝子のダウンレギュレーションが観察された。この観察は、破骨細胞中のNF- κ BおよびJun/Fos駆動経路の両方を刺激するRANKリガンド(RANKL)などの上流因子の発現の変化と見ることができる(Romasら、Bone 30(2):340-6(2002))。RANKLは、NF- κ Bの受容体アクチベーター(すなわち、RANK)のリガンドである。RANK/RANKL相互作用によって破骨細胞分化が進行する。この過程は、おとりのRANKL受容体であるオステオプロテゲリン(OPG)によって効果的に遮断される。骨芽細胞およびストローマ細胞の中のOPGおよびRANKLの量は、インビトロおよびインビボの両方で観察されるように相互に調整されることが多い。この相互の調整をふまえて、非TGマウスおよびLRP5 G171V TGマウスの骨中のRANKLおよびOPGのRNA量を分析した。負荷がない場合には、非TGマウスおよびG171V LRP5-TGマウスの間でRANKLおよびOPG RNAの間の量の差は観察されなかった。RANKLのRNA量は、いずれの遺伝子型で機械的負荷を与えても影響しなかった。OPGのRNA量は、非TGマウスでは顕著な誘導は観察されなかったが($0.9 \log_2$ 倍、 $P < 0.01$)、HBM TGマウス中のOPGのRNA量は顕著に増加した(すなわち、 $3.5 \log_2$ 倍、 $P < 0.01$)(図14)。HBM TGマウスにおいてRANKLの同時の増加が起らずにOPG量が顕著に増加することから、破骨細胞の分化および活性がLRP5 G171V変異によって抑制されていることが分かる。

30

40

【0518】

(実施例7)

(重力負荷を与えた後のMC3T3細胞の転写プロファイリング)

15分間遠心分離することによって、重力負荷(すなわち、1G、6G、12G、および25G)をMC3T3細胞に与えた。荷重を与えた細胞を回収し、全RNAを得る処理を行った。このRNAを、アフィメトリックス MG U74Av2アレイにハイブリダイゼーションするための標的を作製するために使用した。

【0519】

実験条件下で、ERK(p42/44 MAPKとも呼ばれる)がリン酸化、このリン

50

酸化は25Gで最大となる。Fos、Jun、およびCOX-2のRNA量を全て評価し、3つ全ての遺伝子の最大の誘導がこれも25Gで起こることが分かった。さらに、アップレギュレートした遺伝子の大部分は、Wnt/ β -カテニン経路の成分であった。表11は、重力負荷に対する応答でアップレギュレートまたはダウンレギュレートのいずれかが起こるとして同定された上位の遺伝子を示している。

【0520】

【表30A】

表 11

重力負荷を与えた後で、数種類の Wnt/ β -カテニン標的遺伝子の転写が
MC3T3 マウス骨芽細胞 細胞中で誘導される

10

アップレギュレートした遺伝子	遺伝子の分類	ダウンレギュレートした遺伝子	遺伝子の分類
AP1	Wnt標的遺伝子	BMP4	Wnt標的遺伝子
AXIN	Wnt シグナリング中間体	BTG2	増殖抑制遺伝子
BMP1	GSK 阻害剤誘導性遺伝子	IDB2	Wnt 標的遺伝子
CBFA1	骨芽細胞機能	IDB3	Wnt 標的遺伝子
CK1	Wnt 標的遺伝子	NRA1	Wnt 標的遺伝子
コネキシン 31	Wnt標的遺伝子	TOB1	増殖抑制遺伝子
コネキシン 43	Wnt 標的遺伝子		
CRABP2	骨芽細胞分化		
CTGF	増殖因子		
DVL	Wnt シグナリング中間体		
EPHB6	Wnt シグナリング遺伝子		
FOS	Wnt 標的遺伝子		
GADD45B	Wnt 標的遺伝子		
GADD45G	細胞周期調節遺伝子		
HERPUD1	Wnt 標的遺伝子		
IKK α	β -カテニン核トランスロケーション		
IL1R1	炎症		
JUN	応力シグナリング		
LDLR	リポタンパク質受容体		
MAPKAPK2	キナーゼ-応力シグナリング		
MSX-1	Wnt 標的遺伝子		
MYC	Wnt 標的遺伝子		
NCAM1	Wnt 標的遺伝子		
OPG	Wnt 標的遺伝子		
PTGS1	炎症		
PTGS2	Wnt 標的遺伝子		
STAT3	細胞成長および増殖		

20

30

40

【表 3 0 B】

アップレギュレート		ダウンレギ	
した遺伝子	遺伝子の分類	ユレートし	遺伝子の分類
		た遺伝子	
TIMP1	マトリックスメタロプロテイナーゼ		
TIMP3	マトリックスメタロプロテイナーゼ		
WISP1	Wnt 標的遺伝子		

10

【 0 5 2 1】

負荷によってアップレギュレートおよびダウンレギュレートされる遺伝子のより詳細な概要は以下の表 1 2 を参照されたい。「W n t 標的遺伝子」は、W n t / カテニンシグナリングの活性化に应答して転写が誘導される遺伝子を含むが、これに限定されるものではない(図 1 6)。「W n t シグナリング中間体」とは、活性化された W n t の細胞シグナリングの下流に關与するタンパク質をコードする遺伝子を含みが、これに限定されるものではないことを意味する。表 1 1 に使用される「炎症」とは、炎症性应答に關与するタンパク質をコードする遺伝子の意味する。表 1 1 に使用される「細胞成長および増殖」とは、細胞の成長および増殖に關与するタンパク質をコードする遺伝子を含むことを意味するが、これに限定されるものではない。表 1 1 に使用される「増殖因子」とは、細胞増殖に必要なタンパク質をコードする遺伝子を含むことを意味するが、これに限定されるものではない。表 1 1 に使用される「マトリックスメタロプロテイナーゼ」とは、マトリックス金属タンパク質の開裂に關与するプロテイナーゼをコードする遺伝子を含むことを意味するが、これに限定されるものではない。表 1 1 に使用される「キナーゼ - 応力シグナリング」は、応力应答の下流のシグナリングカスケード(例えば p 3 8 M A P K 経路)に關与するキナーゼをコードする遺伝子を含むことを意味するが、これに限定されるものではない。表 1 1 に使用される「リポタンパク質受容体」は、リポタンパク質の受容体をコードする遺伝子を含むことを意味するが、これに限定されるものではない。表 1 1 に使用される「カテニン核トランスロケーション」とは、細胞質のカテニンの核への移行に關与するタンパク質をコードする遺伝子を含むことを意味するが、これに限定されるものではない。表 1 1 に使用される細胞周期調節遺伝子」とは、細胞周期の調整に關与するタンパク質をコードする遺伝子を含むことを意味するが、これに限定されるものではない。表 1 1 に使用される「骨芽細胞機能」は、骨芽細胞の機能および活性に關与するタンパク質をコードする遺伝子を含むことを意味するが、これに限定されるものではない。表 1 1 に使用される「骨芽細胞分化」とは、骨芽細胞系細胞の成熟骨芽細胞および骨細胞への分化に關与するタンパク質をコードする遺伝子を含むことを意味するが、これに限定されるものではない。表 1 1 に使用される「増殖抑制」とは、細胞増殖を抑制するタンパク質をコードする遺伝子を含むことを意味するが、これに限定されるものではない。表 1 1 に使用される「i G S K によって誘導される」とは、i G S K によって転写が誘導されることが

20

30

40

【 0 5 2 2】

【表 3 1 C】

クオリティ	avg.IG	avg.6G	6G/IG	FC2	スコア	avg.IG	avg.12G	12G/IG	FC2	スコア	avg.IG	avg.25G	25G/IG	FC2	スコア	名称	遺伝子の説明	
98501_at	41.72	47.42	1.14	1.14	1.14	-1.00	41.72	163.79	3.93	3.93	15.63	41.72	208.34	4.99	4.99	15.08	IL1RL1	インターロイキン 1 受容体様 1
92364_at	7.02	10.58	1.51	1.51	5.96	7.02	10.64	1.52	1.52	-1.91	7.02	18.88	2.69	2.69	14.96	CELSR2	カドヘリン EGF LAG 7 回貫通 G 型受容体 2	
94932_at	11.61	19.40	1.67	1.67	5.02	11.61	63.00	5.43	5.43	15.38	11.61	90.48	7.79	7.79	13.99	PDGFA	Cluster Incl M29464 : 血小板由来増殖因子、 α /cds=(62,652)gb=M29464 /gt=200272 /ug=Mm.2675 /len=906 /STRA=for	
95597_at	5.17	7.10	1.37	1.37	-9.00	5.17	11.45	2.22	2.22	5.22	5.17	15.19	2.94	2.94	13.88	PTGS1	プロスタグランジン-エンドペルオキシド シンターゼ 1	
99602_at	5.74	6.42	1.12	1.12	-9.00	5.74	24.64	4.30	4.30	12.22	5.74	30.38	5.30	5.30	13.58	TIEG	TGFβ 誘導性早期増殖応答	
103328_at	7.20	12.43	1.73	1.73	1.36	7.20	13.92	1.93	1.93	2.60	7.20	28.12	3.91	3.91	13.56	TANK	TRAF ファミリーメンバー関連 Nf-κB アク チベーター	
100065_r_at	13.95	10.52	0.75	1.33	-7.00	13.95	34.44	2.47	2.47	12.03	13.95	42.27	3.03	3.03	13.51	GJA1-Wnt 標的遺伝子	ギャップ結合膜チャネルタンパク質 α 1	
100127_at	42.07	44.53	1.06	1.06	-1.00	42.07	83.88	1.99	1.99	8.99	42.07	117.86	2.80	2.80	13.18	CRABP2	細胞レチノイン酸結合タンパク質 II	
93546_s_at	34.86	40.83	1.17	1.17	-3.00	34.86	64.06	1.84	1.84	8.03	34.86	106.90	3.07	3.07	13.08	CBFB	核結合因子 β	
96033_at	8.55	9.08	1.06	1.06	-9.00	8.55	18.68	2.19	2.19	9.19	8.55	24.30	2.84	2.84	13.04	SDC1	シンデカン 1	

イア-

【表 3 1 D】

クオリアライ	avg_1G	avg_6G	6G / 1G	FC2	スコア	avg_12G	12G / 1G	FC2	スコア	avg_25G	25G / 1G	FC2	スコア	名称	遺伝子の説明	
99070_at	9.12	10.15	1.11	1.11	-7.00	9.12	17.39	1.91	1.91	6.44	9.12	27.50	3.02	13.00	CHUK / IKK	保存ヘリックスループヘリックスユピキ
イブニ																
93914_at	16.86	21.65	1.28	1.28	-3.00	16.86	42.12	2.50	2.50	9.50	16.86	53.40	3.17	12.89	IL1R1	インターロイキン1受容体、I型
92399_at	3.38	2.47	0.73	1.37	-9.00	3.38	10.45	3.09	3.09	9.44	3.38	15.52	4.59	12.39	RUNX1	run1 関連転写因子 1
162371_r_at	3.47	9.72	2.80	2.80	1.80	3.47	8.63	2.49	2.49	1.49	3.47	23.30	6.72	12.19	EPHB6-Wnt 標的 Eph 受容体 B6	
93076_at	44.37	49.28	1.11	1.11	-3.00	44.37	71.31	1.61	1.61	2.64	44.37	110.55	2.49	11.99	CK1 α-Wnt 経路成カゼイン キナーゼ 1、α1	遺伝子
102779_at	1.24	1.40	1.13	1.13	-9.00	1.24	23.06	18.63	18.63	15.13	1.24	12.48	10.08	11.81	GADD45B-Wnt 標 増殖抑制およびDNA 損傷誘発 45β	分
160319_at	9.21	12.56	1.36	1.36	-5.00	9.21	15.26	1.66	1.66	2.94	9.21	19.30	2.10	11.57	SPARCL1	SPARC 様 1(mast9、hevin)
103904_at	56.45	86.00	1.52	1.52	8.10	56.45	91.28	1.62	1.62	2.70	56.45	124.06	2.20	11.55	IGFBP6	インスリン様増殖因子結合タンパク質 6
95704_at	1.33	4.81	3.61	3.61	2.00	1.33	1.26	0.95	1.06	-9.00	1.33	10.30	7.72	11.49	APIB1-Wnt 標的 アダプタータンパク質複合体 AP-1、β1	β1 分
101918_at	1.25	2.33	1.87	1.87	-0.30	1.25	5.34	4.28	4.28	4.00	1.25	7.93	6.35	10.00	TGFB1	トランスフォーミング成長因子、β1
95010_at	6.69	7.70	1.15	1.15	-9.00	6.69	10.17	1.52	1.52	-1.88	6.69	18.54	2.77	9.77	TRAF3	TNF 受容体関連因子 3

10

20

30

40

【表 3 1 E】

クオリアア イア	avg1G	avg6G	6G/1G	FC2	スコア	avg1G	12G/1G	12G	スコア	FC2	avg25G	25G/1G	25G	スコア	FC2	名称	遺伝子の説明
98427_s_at	18.20	22.39	1.23	1.23	-3.00	18.20	41.13	2.26	2.26	2.26	50.30	2.76	9.76	2.76	2.76	NFKB1	B細胞1のκ軽鎖遺伝子エンハンサーの核因子、p105
93547_at	32.35	36.22	1.12	1.12	-1.00	32.35	56.86	1.76	1.76	1.76	87.52	2.71	9.71	2.71	2.71	CBFB	核結合因子β
160701_at	10.08	15.90	1.58	1.58	2.47	10.08	15.96	1.58	1.58	1.58	27.07	2.69	9.69	2.69	2.69	AXIN-Wnt 標的遺伝子	アキシン
95557_at	10.82	12.21	1.13	1.13	-7.00	10.82	18.24	1.69	1.69	1.69	28.59	2.64	9.64	2.64	2.64	BMP1-iGSK	により骨形成タンパク質 1
95721_at	14.59	21.14	1.45	1.45	1.99	14.59	29.03	1.99	1.99	1.99	38.34	2.63	9.63	2.63	2.63	MAPKAPK2	MAP キナーゼ活性化タンパク質キナーゼ
103975_at	1.37	1.75	1.28	1.28	-14.00	1.37	4.37	3.20	3.20	3.20	9.33	6.83	9.50	6.83	6.83	PRDC-PENDING	DACおよびCerberusと関連するタンパク質
98418_at	7.19	9.09	1.26	1.26	-1.65	7.19	11.40	1.59	1.59	1.59	17.97	2.50	9.50	2.50	2.50	DVL1-Wnt 経路成	dishevelled, dsh ホモログ(Drosophila)
101979_at	14.76	20.79	1.41	1.41	-3.00	14.76	33.81	2.29	2.29	2.29	33.55	2.27	9.27	2.27	2.27	GADD45G	増殖抑制およびDNA損傷誘発 45 γ
92701_at	8.04	8.16	1.01	1.01	-9.00	8.04	10.36	1.29	1.29	1.29	8.04	2.20	9.20	2.20	2.20	BMP1-iGSK-3	により骨形成タンパク質 1
101464_at	267.45	308.38	1.15	1.15	-3.00	267.45	451.79	1.69	1.69	1.69	587.13	2.20	9.20	2.20	2.20	TIMP1	マトロプロテイナーゼの組織阻害剤

伝子(?) ; Wnt 経路
成分
誘導されることが
観察されている

分
誘導されること
が観察されている

10

20

30

40

【表 3 1 F】

クオリアン	avg1G	avg6G	6G/1G	FC2	スコア	avg1G	12G/1G	12G	スコア	avg1G	avg25G	25G/1G	FC2	スコア	名称	遺伝子の説明
99100_at	19.86	27.06	1.36	1.36	-3.00	19.86	34.24	1.72	1.72	3.35	19.86	43.36	2.18	2.18	STAT3	RIKEN cDNA 1110034C02 遺伝子
95057_at	8.47	7.95	0.94	1.07	-9.00	8.47	22.90	2.71	2.71	9.71	8.47	18.10	2.14	2.14	HERPUD1-Wnt	標的ホモシステイン誘発性、小脳体ストレス誘発性、ユビキチン様ドメインメンバナー1
99835_at	58.37	72.72	1.25	1.25	-1.00	58.37	53.64	0.92	1.09	-3.00	58.37	116.08	1.99	1.99	FOSL1	fos 様抗原 1
100152_at	2.28	3.76	1.65	1.65	3.71	2.28	3.41	1.50	1.50	-4.51	2.28	8.79	3.86	3.86	NCAMI-Wnt	標的神経細胞接着分子
93126_at	3.15	3.79	1.20	1.20	-9.00	3.15	6.30	2.00	2.00	5.82	3.15	6.52	2.07	2.07	CKB	クレアチンキナーゼ、脳
102364_at	68.18	93.10	1.37	1.37	-1.00	68.18	86.33	1.27	1.27	-3.00	68.18	128.57	1.89	1.89	JUND1	Jun 癌原遺伝子関連遺伝子 d1
104354_at	1.78	2.54	1.43	1.43	-12.00	1.78	6.32	3.55	3.55	6.43	1.78	10.49	5.89	5.89	CSF1R	コロニー刺激因子 1 受容体
104647_at	73.47	76.91	1.05	1.05	-3.00	73.47	88.97	1.21	1.21	-3.00	73.47	129.55	1.76	1.76	PTGS2-Wnt	標的連プロスタグランジン-エンドペルオキシド伝子
94231_at	9.85	9.49	0.96	1.04	-9.50	9.85	11.24	1.14	1.14	-7.50	9.85	17.92	1.82	1.82	CCND1-Wnt	標的サイクリン D1
160545_at	6.70	13.85	2.07	2.07	10.83	6.70	11.95	1.78	1.78	3.69	6.70	14.13	2.11	2.11	CCND3	サイクリン D3
102581_at	3.02	3.26	1.08	1.08	-9.00	3.02	4.18	1.38	1.38	-9.50	3.02	7.86	2.60	2.60	MYCS-Wnt	標的連myc 様癌遺伝子、s-myc タンパク質
162371_r_at	3.47	9.72	2.80	2.80	1.80	3.47	8.63	2.49	2.49	1.49	3.47	23.30	6.72	6.72	EPHB6-Wnt	標的 Eph 受容体 B6
99532_at	33.19	37.56	1.13	1.13	2.03	33.19	15.81	0.48	2.10	9.10	33.19	34.25	1.03	1.03	TOBI	ErbB-2.1 のトランスデュサー

10

20

30

40

【表 3 1 G】

クオリアリ	avg_1G	avg_6G	6G / 1G	FC2	スコア	avg_12G	12G / 1G	FC2	スコア	avg_25G	25G / 1G	FC2	スコア	遺伝子の説明	
<u>イア</u>															
102371_at	154.66	172.23	1.11	1.11	-3.00	154.66	9.31	0.06	16.62	15.71	154.66	36.71	0.24	4.21	16.00 NR4A1-Wnt 標的 核受容体サブファミリー4、グループ A、メ 遺伝子；細胞の種類ンバー1
92614_at	64.65	92.80	1.44	1.44	-1.00	64.65	3.01	0.05	21.46	15.98	64.65	2.88	0.04	22.45	16.00 IDB3 DNA 結合阻害剤 3
93013_at	27.81	31.19	1.12	1.12	-3.00	27.81	3.11	0.11	8.95	16.00	27.81	3.27	0.12	8.49	15.73 IDB2-Wnt 標的 遺 DNA 結合阻害剤 2 類に依存してアッ ブ/ダウン
160901_at	224.53	258.08	1.15	1.15	-3.00	224.53	12.27	0.05	18.30	16.00	224.53	35.45	0.16	6.33	15.64 POS FBJ 骨肉腫 癌遺伝子
94820_r_at	22.51	6.05	0.27	3.72	10.00	22.51	13.15	0.58	1.71	5.28	22.51	5.85	0.26	3.85	12.40 CCNI サイクリン I
93456_r_at	20.57	20.29	0.99	1.01	-3.00	20.57	7.90	0.38	2.61	12.51	20.57	7.14	0.35	2.88	9.88 BMP4-Wnt 標的 遺骨形成タンパク質 4 伝子；細胞の種類に 依存してアッ/ダ ウン
101583_at	140.08	182.43	1.30	1.30	-3.00	140.08	18.54	0.13	7.56	15.87	140.08	49.79	0.36	2.81	9.81 BTG2 B 細胞転座遺伝子 2、抗増殖性

転写プロファイリングを実施するために使用することができる他のアッセイ(すなわち、骨負荷に対する応答における遺伝子のアップレギュレーションおよびダウンレギュレーションの評価)は、メトリゲニックス(Metrigenix)などが製造した他のオリゴヌクレオチドアレイの使用、cDNAアレイ(例えば、インサイト(Incyte)、ベクトン・ディキンソン(Becton Dickinson)、クロンテック(Clontech)など)の使用、または本明細書に記載のアレイ、タンパク質および抗体アレイ(例えば、ベクトン・ディキンソン、クロンテック、および他の供給元のアレイ)、従来方法を使用するポリメラーゼ連鎖反応(例えば、PCRプロトコル:方法および応用への手引き(PCR PROTOCOLS: A GUIDE TO METHODS AND APPLICATIONS)(マイケル・イニス(Michael Innis)ら

10 編著, 1990)を参照されたい)の使用、TaqMan(登録商標)(すなわちABIのリアルタイムPCR)、eTAG(アクララ・バイオサイエンス(ACLARA Biosciences))、ノーザンブロット分析、S1ヌクレアーゼ分析、RNアーゼ保護アッセイ、およびウエスタンブロットの使用である。これらのアッセイの実施方法は当技術分野において周知である。例えば、抗体の使用:実験室マニュアル(USING ANTI BODIES: A LABORATORY MANUAL, ハーロー(Harlow), Edおよびレーン(Lane), デビッド(David)(コールド・スプリング・ハーバー・プレス(Cold Spring Harbor Press), 1999); サンプルック(Sambrook) et al., 分子クローニング:実験室マ

20 ニュアル(MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL)(第2版, コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー・プレス(Cold Spring Harbor Laboratory Press), 1989); およびマニアティス(Maniatis) et al., 分子クローニング, 実験室マニュアル(MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL), (コールド・スプリング・ハーバー・ラボラトリー(Cold Spring Harbor Laboratory), コールド・スプリング・ハーバー(Cold Spring Harbor), ニューヨーク(NY)1982)を参照されたい。

【0524】

遺伝子の分析に使用したプライマーおよびプローブを表13に示す。

【0525】

10

20

30

表13

タックマン(登録商標)分析に使用したプローブとプライマーのリスト
 (フォワードプライマーはそれぞれ登場順に配列番号 5~40 である)
 (リバースプライマーはそれぞれ登場順に配列番号 41~76 である)
 (プローブはそれぞれ登場順に配列番号 77~112 である)

遺伝子	記号	登録	フォワードプライマー	リバースプライマー	プローブ
10064_f_at	GJAI	M63801	FI: TGAAGGGGAAAGAAGCGAICCTT	RI: GGAGATCCGCAGTCTTTGGA	ACGCCACCACCCGGCCCACT
コネキシン43		X61576	FI: GGCCGGAAGCACCAATCT	RI: TGGCTGTCGTCAGGGAATC	CAACTCCACGCCCAGC CGTT
101918_at	TGFB1	AJ009862	FI: GGAGCCTGGACACACAGTACAG	RI: GCTTGGGACCCACGTAGTAGA	ACCAACACAAACCCGGGGCGTT
102801_at	BGLAP-RS1	L24430	FI: TGCATGTTGAAAAGGTTCCTGAA	RI: CACCCTCCTGTTGCCTCTGA	AGTGTGCTCGTTTCTTTCTGCTGGTCAG
103709_at	COL1A1	AA763466	FI: AGTTCTCTGGGCCTATCTGATCTC	RI: CCTGATGCAGGACAGACCAA	A
103904_at	IGFBP6	X81584	FI: CGGCCCAATCCTGTTCAA	RI: CGCCTCGGAAGACCTCAGT	TCCCCTCTTGCTGCTGCCCTC
103991_at	AKP5	M61704	FI: TGTGGCAGGGAATAATGTTGA	RI: GGCCTGGAACAAGCAACAA	CCCCCTGCCGACAGACACTTGG
160406_at	カテプシン K	AJ006033	FI: GGTGCAAGATATGGTGGCTTT	RI: TCGCTGGCTCCCTCTCA	TTCAGCCCGCCGCAATCAGC
160519_at	TIMP3	U26437	FI: AGTCGGCTGTTTGGGTTGAG	RI: ACAGCTGGCTTGCTAGAGGAA	AGCGCCATGCCCACTCCCTTC
161515_i_at	TIMP2	AV156389	FI: TTCCCCGCGATGAGTGCCTT	RI: ATTTGGCCTGGTGCCTAATAA	CCCCGAGAAATGACCATGCTCTGG
161666_f_at	GADD45B	AV138783	FI: TGGGAAACAGTAAATGTGTATAA	RI: AGAATTTGCTGTAGCTGGGAAGTC	TGCTCTTCTCTGTGACCCAGTCCATCC
92469_at	SFRP4	AF117709	FI: TGGAGCCACCCCTTACAGGAT	RI: GCAAGTGGTATGTGGCCCTTCTG	ACGACCCCTTGGCCGGGGAC
94231_at	CCND1	M64403	FI: AGAAATGTACTCTGCTTTGCTGAA	RI: GGGCTGTAGGCACTGAGCAA	AGGCTGTCCCAGGCAGCACCA
					AGGCCCTCAGCCTCACTCCCTGG

10

20

30

40

【 表 3 2 B 】

遺伝子	記号	登録	フロードプライマー	リバースプライマー	プローブ
94704_at	WISP2	AF100778	FI: GGTGACCTTGTAAAGTGTGCCTTT FI: CCCTCCCAAGGCTTGAGTAAAG	RI: TCCATCTTTCATGTTCCAGAA RI: AGCACATGCATAGGCGGTGTA	TCTGAGAACACCCCTGCCCCGGCT TCGTTGACTGCCCAAGGCTGCC
97997_at	SFRP1	U88566	FI: CCTCCCTTTTGTCAATCATGTGAA	RI: GGACAGTGGCACAGGTGACA	TTCCCACGGTTCGAAAGGCC
98623_g_at	IGF2	X71922	FI: TCATATATGTGGAAGCCTCTGGAA	RI: GCAGGACTCTCGTGGTGTTC	CCAGCCTCCCAAGGAGACCCAGA
98859_at	ACP5	M99054	FI: GCCCGACTTCACAGTCTACATG	RI: GCCGGACCAGATCCAGAA	CCGACGTGATGCCACGATGA
Frizzled2	Frizzled 2	af363723	FI: GGAGCAAGGACAGTGGAGAATC	RI: CCTGAGAGGAGAGCGTCAATTG	CCAACCCAGCCTGACCAGCAA
	Catnip1	NM_023465	FI: CGGGGGTTTCTTTCCATGT	RI: GCCCAATTGCAGTTGAGTGA	TTCTGGCCCACCCATTGGCTCA
	オステオネクリン	M20692			
	beta2 M		FI: GAGAATGGGAAGCCGAACATAC	RI: TTTCCTGTTCTTCAGCAATTG	CACAGTTCCACCCCGCTCACATTG
mLPR5	Lrp5	AF064984	FI: CCCCTCTATGACCCGGAATCAC	RI: CGGATATAGTGTGGCCTTTGTG	CATCCAGCAGCTCGT(MGB)
104647	PTGIS	M88242	FI: AGGCTGTTGGAATTTACGCATAA	RI: CATGCTTGGTCACTCAATATTG	AGCAGACTGCATAGAT(MGB)
104538	PTGS2	AB001607	FI: TGGCTTCGGTCTGATGCA	RI: CCCAGGTGAGTCTGTCTCCAT	CCAGAGGAAGACGTGCCCATCCG
	eNOS	nm_008713	FI: TCTGCGGCGATGTCATATG	RI: GCCCTCTGTTGCCAGAATTC	AGCGTCTGCAACCCGTGCA
Wnt10B	Wnt10B	AF029307	FI: CCTCGGGCTCAGGTTCCCTA	RI: AAGAGGAGTGGCCAAAAGATAGACT	CCCTATCCAAAAGGAAG(MGB)
	MK2	XM_129464	FI: CATTTCATGCATCTCCCCTGAT C	RI: GCGAAGACTGTCCCATCCA	CACGTGGTCTGATGGCACCCGTCTG
95348_at	GRO1	J04596_	FI: CCCC AAGTAACGGAGAAAAGAAGA	RI: GTTGTGAGAAGCCAGCGTTCA	CAGGCAGGCTCTCCATCAAGGCA
	OPG	NM_008764	FI: CCACTCGAACCTCACACAGA	RI: CAATCTTCTTGGGCTGATCTTC	TGTTGGTCAACCAGGTGCCTTTCAAATTT
93416_at	RANKL		FI: GACTTGTCAAAAACATATGCAAGCAA	RI: TGGTATGTCACTCTCTAAAGTCA	TGCGGCTCACCTGCCCTTGT
	H_mk2		FI: ACCAGCCCGTCTTCTCTCTCT	RI: CAGCACAGGAAGGGTACAGA	CCAGCATGAGATCCA(MGB)
99333_at	E_SELECTIN	M80778	FI: TGTCTGTGTCTCTGGCACTGA	RI: TTTGACCCCTTGAGCTGACATAAGAA	TGAAAAGCATCATCTTC(MGB)
102802_at	mIL18	D49949	FI: GGACACTTTTCTTGTCTTGCCAA	RI: CAGATTTATCCCCATTTTCATCCT	AGGCAACACACTGTCA(MGB)
96574_at	mIL9	M30136	FI: AAGCCATGCAACCAGACCAT	RI: GTCCCCAGGAGACTCTTCAGAA	

10

20

30

40

【表 3 2 C】

遺伝子	記号	登録	フローワードプライマー	リバースプライマー	プローブ	
97497_at	mNOTCHI	Z11886	F1: TCCGAACCCAGTAGCTCCTAA	R1: ACTTGGTGGGCAGCAGATG	AGCACAAACCCAGGATG(MGB)	10
92560_at	mVCAM	U12884	F1: CCCTCCACAAGGCTTCAAGA	R1: GGTAGACCCCTCGCTGGAACA	TGCTGTGACAATGAC(MGB)	20
mIL6	IL6	PDAR_#43295ABI	ABIからの配列情報なし			
		92F				
hIL6	hIL6	PDAR:	ABIからの配列情報なし			
		#4327040F				
mFOS	mFOS	PDAR	ABIからの配列情報なし			
mJUN	mJUN	PDAR	ABIからの配列情報なし			

【 0 5 2 6 】
(実施例 8)

(COX-2 阻害剤に誘導される Wnt 経路活性の調節および骨負荷に対する影響)

前述したように、COX-2 遺伝子の転写は、インビトロおよびインビボの両方で、機械的骨負荷を与えることによって誘導される。COX-2 の発現は、Wnt 1 によって誘導することができる (ハウ (Howe) et al., J. Biol. Chem. 276 (23): 20108-15 (2001))。COX-2 のプロモーターが TCF-4 結合部位を有することもさらに知られている (アラキ (Araki) et al., Cancer Res. 63 (3): 728-34 (2003))。したがって、COX-2 活性が、負荷によって誘導される Wnt / カテニン 標的遺伝子の転写に必要であるかどうか疑問であった。以下の実験および関連するデータがこの質問の答になる。

【0527】

MC3T3 細胞は、未処理のままとするか、または、前述のように Flexercell (登録商標) による荷重を与える 1 時間前に 1、10、および 60 μ M の COX-2 阻害剤の NS-398 ([N-(2-シクロヘキシルオキシ-4-ニトロフェニル)メタン スルホンアミド]) で処理した。

【0528】

負荷を与えた直後に RNA を単離し、TaqMan (登録商標) 分析を行った。分析した転写物は、COX-2、eNOS、コネキシン 43、SFRP1、Wnt10B、サイクリン D1、Frizzled 2、WISP2、Fos、および Jun (図 15) であった。

【0529】

これらの結果から、Fzd2、eNOS、FOS、JUN、COX-2、コネキシン 43、サイクリン D1、SFRP1、および Wnt10B の転写が負荷により誘導されることが示された。最後の 4 つの遺伝子は、COX-2 活性に完全に依存し、その理由は、COX-2 阻害剤が存在すれば、これらの遺伝子の転写が負荷によって誘導されないからである。Frizzled 2、eNOS、Fos および Jun の負荷に誘導された転写は、COX-2 活性とは無関係であった (図 15)。WISP2 遺伝子発現は、MC3T3 細胞においては負荷によって誘導されなかった。COX-2 阻害剤を使用するこれらの実験、およびこれらの実験から導き出すことができる結論は、このおよびその他のシグナリング経路モジュレーターを、荷重の同化作用および Wnt / カテニン経路の活性化への寄与に必要となる重要な要素 / 要因の同定にいかにして使用することができるかの一例となる。

【0530】

(実施例 9)

(Wnt 3A は カテニン 標的遺伝子発現を相乗的に誘導する)

負荷の存在下で GSK-3 阻害剤を使用した MC3T3 細胞 (実施例 1 参照) の治療およびその カテニン 標的遺伝子発現に対する影響と関連する上記実験と同様に、以下の荷重実験を実施して、別の化合物が骨負荷を増強できるかどうかを調べた。この実験は、天然の Wnt リガンドの Wnt 3A の存在下で実施した。この目的は LRP5 / 6 / Frizzled 補助受容体のレベルで Wnt / カテニン経路の活性化が、GSK-3 阻害剤 (上記実施例) で観察されたように、負荷の存在下で、カテニン 標的遺伝子発現を同様に相乗的に誘導するかどうかを調べることであった。

【0531】

ここで、Wnt 3A のならし培地を、マウス Wnt 3A をトランスフェクトしたマウス L-細胞から得た。前述のように、MC3T3 細胞を、増殖培地に播種してコンフルエントになるまで 3 日間培養した。次に、MC3T3 細胞の培地を、BSA 含有培地に交換し、これらの細胞を 24 時間インキュベートした。BSA 含有培地を次に除去して、種々の量の L-細胞 Wnt 3A 馴化培地、またはトランスフェクトしていない L-細胞から得たコントロール馴化培地を含有する最終体積 1 mL の新しい BSA 培地と交換した。Wnt 3A 馴化培地の量は、最終体積 1 mL の無血清 BSA 培地中 0.5、2.0、5.0、10.0、20.0、および 100 μ L で変動させた。次に、前出の実施例のよう

10

20

30

40

50

に、MC3T3細胞に3,400 μ を2Hz、7200サイクル/時で5時間与えた。

【0532】

これらの細胞を回収し、前述の実施例に記載のように処理を行った。図17に示される結果から、Wnt3A単独(すなわち負荷なし)では、サイクリンD1、コネキシン43、SFRP1、Wnt10B、WISP2、COX-2、FOS、およびJUNの遺伝子発現に対する影響は見られなかったことが分かる。しかし、負荷が存在すれば、Wnt3Aの用量依存的(すなわち、二相性で)および相乗的にサイクリンD1、コネキシン43、SFRP1、Wnt10B、WISP2、COX-2、FOS、およびJUNの発現を誘導した。負荷単独に対する誘導の倍率は、1.8倍~2.6倍の誘導の範囲であった。負荷の増強に最も効果的なWnt3Aならし培地の量は、約2 μ L~20 μ Lの範囲であり、より好ましくは2~10 μ Lの間であった。Wnt3Aを含有しなかったコントロールのL-細胞馴化培地は、負荷の存在下でのカテニン標的遺伝子発現に対する付加的な効果はなかった。

10

【0533】

これらのデータは、天然のWntリガンドを使用したWnt/カテニン経路の活性化によって、骨細胞が機械的荷重に対してより応答しやすくなるという構想をさらに支持している。したがって、Wnt3Aおよびそのミメティックを、本明細書に記載のGSK阻害剤として提案したものと同一目的で使用することができる。例えば、Wnt3A発現の増強、またはWnt3Aミメティックまたは機能性変異体の使用は、患者の骨量を増加させる目的で骨負荷を増強させるために行うことができる。

20

【0534】

(実施例10)

(機械的負荷へのインビボ応答に対するGSK阻害剤全身投与の影響)

GSK阻害剤を使用した全身治療によって、Wntシグナリングを活性化し、それによって機械的負荷に対する骨応答が模倣されるという仮説を発展させてきた。この応答は、高骨量(「HBM」)トランスジェニック動物モデルで観察されるものと類似していると予想され、すなわち骨が、野生型動物よりも骨のひずみが小さい量のHBM動物における同化負荷作用を経験する(Wntシグナリングを活性化する)(図12、13a、および13b、実施例6参照)。以下の材料および方法を使用してこの仮説を試験した。

30

【0535】

材料および方法。野生型17週齢の雌マウスに、10 μ g/mL/kg(低)、50 μ g/mL/kg(高)、または賦形剤(コントロール)をそれぞれ注射した。注射は、14日間で1日2回、皮下投与した。各コホートで合計20匹の動物が存在した。使用したGSK阻害剤は、3-(3-クロロ-4-ヒドロキシフェニルアミノ)-4-(2-ニトロフェニル)-1H-ピロール-2,5-ジオンであった。

【0536】

動物の右脛骨に、6Nの負荷を36サイクル、2Hzで与えた。動物の左脛骨は、負荷を与えないコントロールとした。この手順の後、負荷から4時間後に動物を塗擦した。その時点で組織を処理し、液体窒素中で急速冷凍した。脛骨を各コホートで5匹分の4群に集め、負荷(左)および未負荷(右)と集めた。脛骨(負荷および未負荷)、肝臓、脾臓、腎臓、脳、大腸、および皮膚からmRNAを精製した。選択した負荷-およびWnt-応答遺伝子(図12、13a、および13b、実施例6に記載)に対する脛骨からの試料に対してTaqMan(登録商標)リアルタイムRT-PCRを実施することで、転写分析を行った。アフィメトリックス(登録商標)遺伝子チップを使用し、その遺伝子チップの製造元の使用説明書を使用して、より全体的なプロファイリングを実施した。

40

【0537】

全ての動物で全てのプロトコルを実施した。以下の遺伝子の発現を脛骨において監視した: Cox2、eNos、Wnt10B、SFRP1、Cxn43、CCND1、Fzd2、およびWISP2。GSK阻害剤で処理した動物で、顕著な転写の変化が観察され、GSK阻害剤を低用量で投与した動物と高容量で投与した動物の間に用量依存性の傾向が

50

得られた。高用量のGSKi治療では、監視した全ての遺伝子で、負荷を与えた脛骨の方が未負荷の脛骨よりも顕著に誘導が起こった。この比較において、Cox2は約27倍、eNosが5倍、Wnt10Bが7倍、SFRP1が2.5倍、Cx43が5倍、CCND1が4倍、Fzd2が7倍、WISP2が3倍で誘導された。負荷の早産かでは、高用量のGSKiを使用した治療では、賦形剤治療と比較して以下の遺伝子発現が相乗的に誘導された：Cox2、eNos、Wnt10B、SFRP1、Cx43、CCND1、およびFzd2。このデータは、HBMトランスジェニック（実施例6）およびインビトロフレクサーセル研究（実施例9）からの前述の観察を裏付けており、Wntシグナリング経路の活性化によって、機械的負荷に対する正常な骨応答が増強され、骨は同等の負荷でより小さなひずみを経験または知覚することが確認された。

10

【0538】

以上の実施例を参照しながら本発明を説明してきたが、本発明の意図から逸脱せずに種々の変形を汚くすることができ、容易に当業者に知ることとなることを理解されたい。

【0539】

本出願は、2003年6月6日提出の米国仮出願第60/476,164号明細書、および2003年9月10日提出の米国仮出願第60/501,398号明細書と関連しており、これらの記載内容全体が、本明細書に組み入れられる。本明細書で引用される全ての特許および刊行物は、それらの記載内容全体が本明細書に組み入れられる。

【図面の簡単な説明】

【0540】

20

【図1A】HEK-293A細胞中のGSK-3阻害剤によるTCFシグナルの用量依存性活性化を示している。このグラフは、30 μ M~60 μ Mの間の濃度のiGSK-3が、トランスフェクトしたTCFレポーターを活性化し、293A細胞中のWntシグナリングを活性化することを示している。

【図1B】HEK-293A細胞およびU2OS骨細胞中のGSK-3阻害剤によるTCFシグナルの用量依存性活性化の比較を示している。このデータは、293A細胞以外に、iGSK-3阻害剤がU2OS骨細胞中のTCFシグナルを活性化することを示している。U2OS細胞は、293A細胞よりも、iGSK-3媒介TCFシグナル活性化に対する応答が大きい。TCFの誘導は、293A細胞よりも低い用量（10 μ M）で開始し、293A細胞とは異なり30 μ Mでピークとなっている。

30

【図2】U2OS細胞におけるTCFシグナルのDkk1媒介阻害から開放するためにGSK-3阻害剤を使用することができる。図示されるように、Wnt1およびWnt3Aは、コントロールよりも約10~15倍TCFシグナルを活性化する。Dkk1を追加すると、Wnt媒介TCFシグナルが阻害される。GSK-3阻害剤はこの阻害を逆転させることができる。このことは、これおよび他のGSK-3阻害剤を、Dkk1-アンタゴニストレポーターアッセイにおけるコントロールまたは有効物質として使用できることを示している。他のWntアンタゴニストは、GSK-3阻害剤を使用して較正することができる。

【図3】マウス頭蓋冠厚さに対するiGSK-3局所投与の影響。iGSK-3を注射による局所投与から18日後に、処理したマウスの頭頂骨の横断面がH&Eによって染色された。右半分の頭蓋冠に対する1mg/kg/dのiGSK-3に夜局所同化作用が明らかである。

40

【図4】頭蓋冠の非注射側からのパーセント変化によって表したマウス頭蓋冠厚さに対するiGSK-3局所効果。ヒトPTH（hPTH）、iGSK-3、および賦形剤（2%のTween80および0.5%のメチルセルロースを含有する50%のDMSO）で処理したマウスの頭蓋冠骨厚さの定量。20 μ g/kg/日におけるヒトPTH（1-34）はポジティブコントロールとして機能し、頭蓋冠の厚さが顕著に増加した。同じ動物の非注射の左半分の頭蓋冠と比較するとiGSK-3を18日注射した右半分の頭蓋冠で頭蓋冠厚さの顕著な増加が見られた（11.8%、 $p < 0.005$ ）。

【図5】賦形剤処理した頭蓋冠と比較した、18日iGSK-3処理の局所効果の頭蓋冠

50

厚さへの影響。hPTH、iGSK-3、および賦形剤（2%のツイーン80および0.5%のメチルセルロースを含有する50%のDMSO）で処理したマウスの頭蓋冠骨厚さの定量。20 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ におけるヒトPTH（1-34）はポジティブコントロールとして機能し、頭蓋冠の厚さが顕著に増加した。賦形剤単独と比較した場合、iGSK-3を18日間注射した右半分の頭蓋冠で頭蓋冠厚さの増加（6%）が観察された。

【図6】賦形剤で処理した頭蓋冠と比較した、7日間PTH1-34およびiGSK-3で処理した頭蓋冠の厚さに対する局所効果（上図）。hPTH、iGSK-3、および異なる賦形剤（すなわち、2%のツイーン80および0.5%のメチルセルロースを添加する10%のDMSO）で7日間処理したマウス頭蓋冠の骨の厚さを定量すると、賦形剤コントロール処理の頭蓋冠と比較して、統計的に有意な10%の頭蓋冠厚さの増加が見られた（下図）。 10

【図7】iGSK-3の、内因性アルカリホスファターゼ活性（ALPアーゼ）、およびマウス頭蓋冠のカテニンタンパク質発現に対する影響。iGSK-3の頭蓋冠の骨に対する影響を、免疫組織化学によるALPアーゼ酵素組織化学的染色およびカテニン発現によって評価した。ALPアーゼ活性は、iGSK-3またはPTH投与のいずれかの後で骨芽細胞において顕著に増強した（上図）。iGSK-3を注射した頭蓋冠の免疫組織化学から、骨膜を裏打ちする骨芽細胞においてカテニンの強い発現が見られた。対照的に、PTHでは、カテニン発現量に対する影響はなかった（下図）。

【図8】負荷を与えた直後のMC3T3細胞中の、遺伝子の広範なリストの遺伝子応答に対するひずみの影響。サイクリンD1、コネキシン43、SFRP1、Wnt10B、COX-2、およびeNOSは遺伝子発現が誘導され、負荷を与えるとFrizzled2、Fos、およびJunも発現が誘導される。負荷の5時間後でWISP2遺伝子発現の誘導が最小であった。 20

【図9】iGSK-3、および負荷とiGSK-3の併用によるカテニン経路の活性化に対する負荷単独の影響。このデータは、負荷なしのコントロールと比較すると、負荷単独で各遺伝子（WISP2を除く）の発現が誘導されることを示している。GSK-3阻害剤（5 μM ）単独ではFrizzled2およびWISP2の発現が誘導されたが、コネキシン43、サイクリンD1、Wnt10B、SFRP1、COX-2、eNOS、Fos、およびJunに対する影響はなかった。しかし、負荷の存在下、MC3T3細胞を5 μM のGSK-3阻害剤で処理すると各標的遺伝子について相乗的な遺伝子発現の誘導が起こった。 30

【図10】負荷の存在下での、Wnt標的遺伝子発現に対するiGSK-3の用量依存性作用。このデータは、負荷なしのコントロールと比較すると、各遺伝子の発現が負荷単独によって誘導されたことを示している。GSK-3阻害剤単独では、記載の遺伝子に対してあらゆる濃度で遺伝子発現に影響は見られなかったデータ示さず）。しかし、負荷の存在下、濃度を増加させて（0.05~20 μM ）GSK-3阻害剤を使用してMC3T3細胞を処理すると、各標的遺伝子で、用量依存性の相乗的な遺伝子発現の誘導が起こった。

【図11】カルセイン標識に対するインビボ荷重の影響。雌マウスに6Nの力の負荷を与え、雄マウスには7Nの負荷を与えた。負荷なしのコントロールと比較して、負荷を与えたマウスの非トランスジェニックおよびHBMトランスジェニックの両方、および両方の性で、脛骨中でカルセイン標識表面が増加したことによって顕著な骨形成応答が観察された。 40

【図12】非TGマウスおよびLRP5 G171V TGマウスの負荷なしおよび負荷ありの脛骨における、COX-2、PTGS、およびeNOSの発現を示すTaqMan（登録商標）データ。3つ全ての遺伝子で、負荷により誘導されたmRNA量の増加は、LRP5 G171V TGマウスの方が非TGマウスよりも大きかった。

【図13A】負荷を与えて4時間後の非TGマウスおよびLRP5 G171V TG（HBM TG）マウスにおける、Wnt関連遺伝子およびWnt標的遺伝子の発現を示すTaqMan（登録商標）データを表している。非TGマウスおよびLRP5 G17 50

1 V T Gマウスの両方で、 カテニン標的遺伝子の転写が、 負荷に誘導されて増加している。しかし、この誘導は、 L R P 5 G 1 7 1 V T G マウスの場合の方が遙かに大きい。

【図 1 3 B】 負荷を与えて 2 4 時間後の非 T G マウスおよび L R P 5 G 1 7 1 V T G (H B M T G) マウスにおける、 W n t 関連遺伝子および W n t 標的遺伝子の発現を示す T a q M a n (登録商標) データを表している。

【図 1 4】 負荷を与えて 4 時間後および 2 4 時間後の、 非 T G マウスおよび G 1 7 1 V L R P 5 T G (H B M T G) マウスにおける、 R A N K L および O P G の発現を示す T a q M a n (登録商標) データ。 R A N K L の遺伝子転写は、 非 T G マウスおよび L R P 5 G 1 7 1 V T G マウスのいずれもあまり誘導されない。 O P G 遺伝子転写は、

10

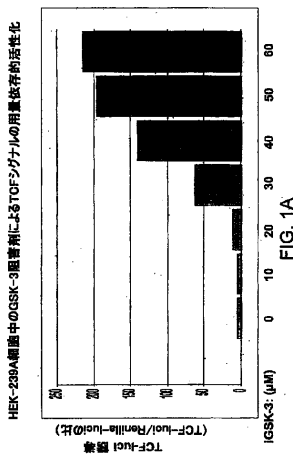
【図 1 5】 負荷が誘導する遺伝子発現に対する C O X - 2 発現の阻害の影響。 荷重 (3 , 4 0 0 μ ひずみを 5 時間) を与える 1 時間前に、 C O X - 2 阻害剤の N S - 3 9 8 を種々の濃度 (1 ~ 6 0 μ M) で細胞に加えた。 C O X - 2 阻害剤は、 負荷によって誘導されるコネキシン 4 3、 サイクリン D 1、 W n t 1 0 b、 S F R P 1、 および C O X - 2 遺伝子発現の誘導を遮断したが、 F r i z z l e d 2、 e N O S、 F o s、 および J u n に対しては影響がなかった。 これらのデータは、 負荷刺激を与えることによって W n t 標的遺伝子発現の応答を調節する重要な役割を C O X - 2 発現が担っていることを示している。

【図 1 6】 W n t / カテニン経路の活性化における L R P 5 の関与を説明するモデルである。

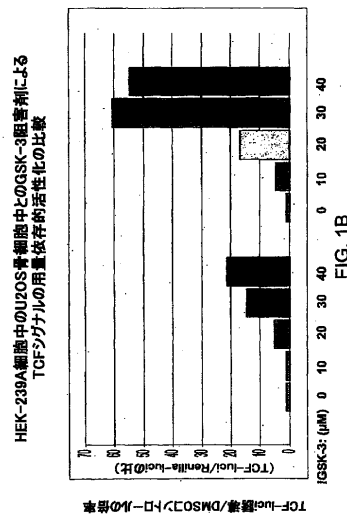
20

【図 1 7】 天然 W n t リガンド (W n t 3 A) は カテニン標的遺伝子発現を相乗的に誘導する。

【 図 1 A 】



【 図 1 B 】



【 図 2 】

GSK-3阻害剤は、USO2細胞中のTCFシグナルのDkk1介在性阻害を解除する

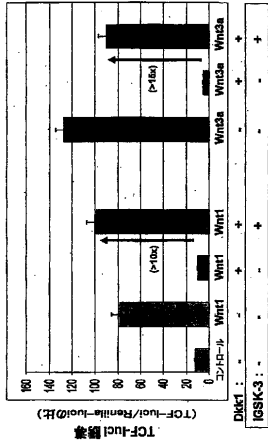


FIG. 2

【 図 3 】

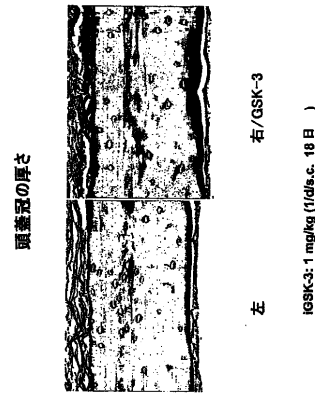
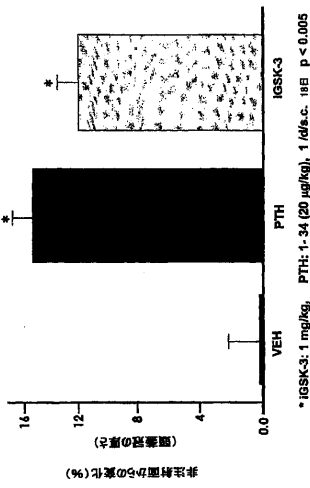


FIG. 3

【 図 4 】

骨形成に対するGSK-3阻害剤の局所作用

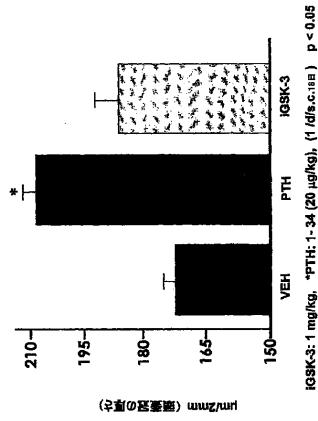


*GSK3i: 1 mg/kg, PTH: 1-34 (20 µg/kg), 1 d/s.c. 18日 p < 0.005

FIG. 4

【 図 5 】

骨形成に対するGSK-3阻害剤の局所作用

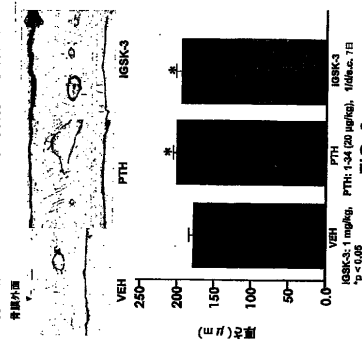


*GSK3i: 1 mg/kg, PTH: 1-34 (20 µg/kg), 1 d/s.c. 18日 p < 0.05

FIG. 5

【 図 6 】

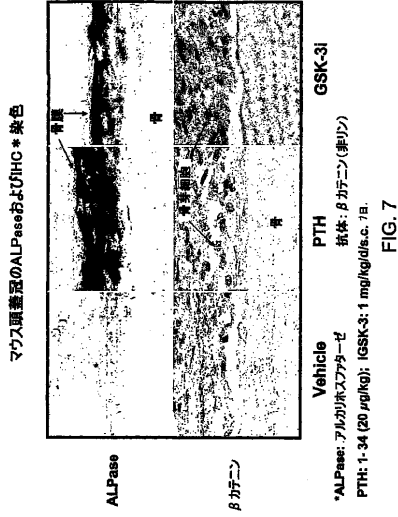
骨形成に対するGSK-3阻害剤の局所作用



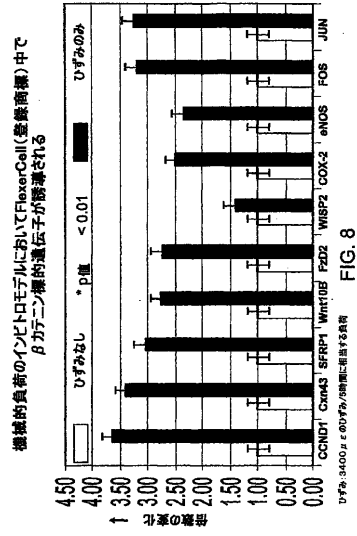
*GSK3i: 1 mg/kg, PTH: 1-34 (20 µg/kg), 1 d/s.c. 7日 p < 0.005

FIG. 6

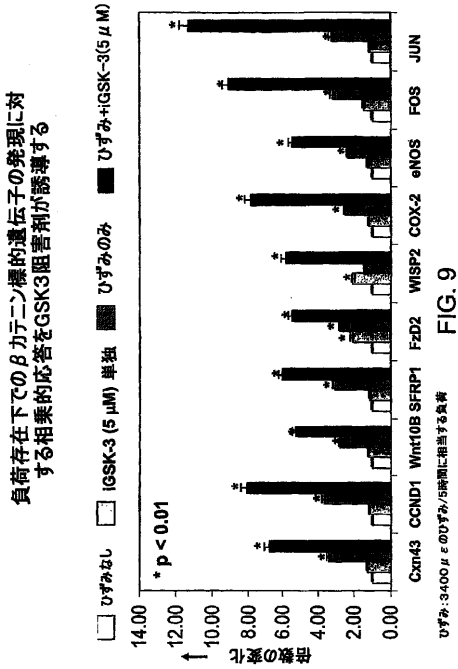
【 図 7 】



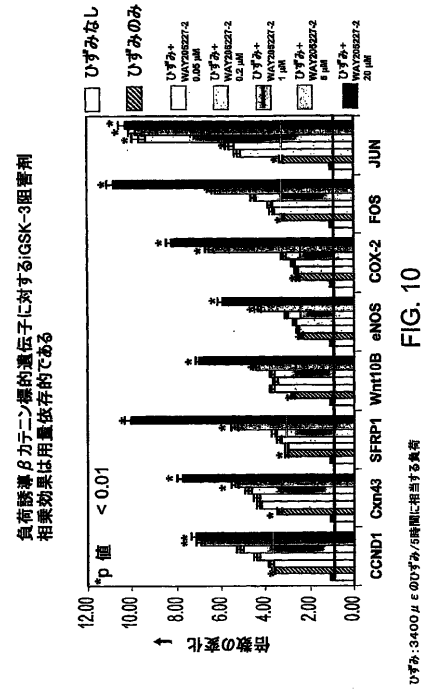
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 1 1 】

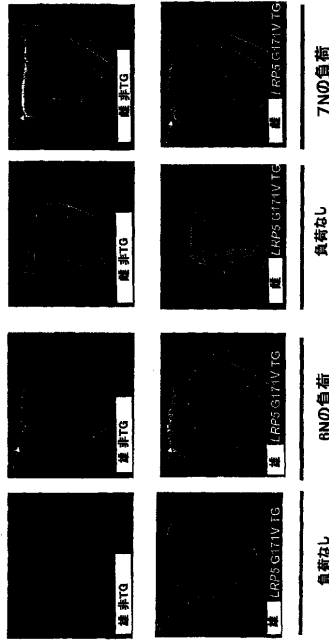


FIG. 11

【 図 1 2 】

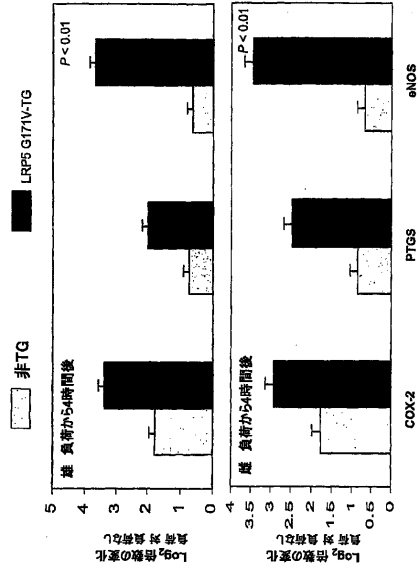


FIG. 12

【 図 1 3 A 】

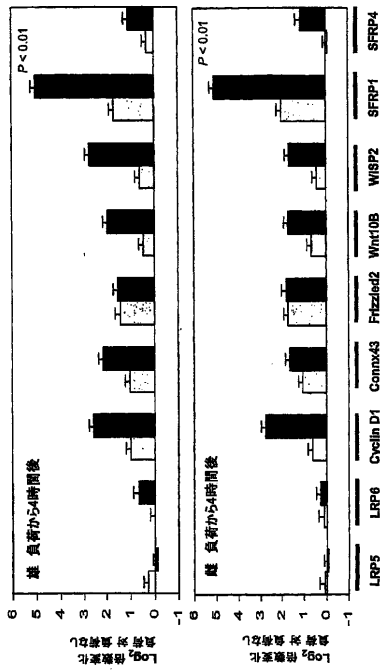


FIG. 13A

【 図 1 3 B 】

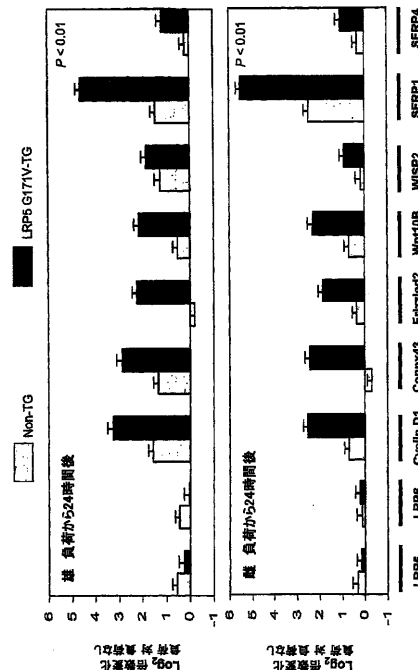


FIG. 13B

【 図 1 4 】

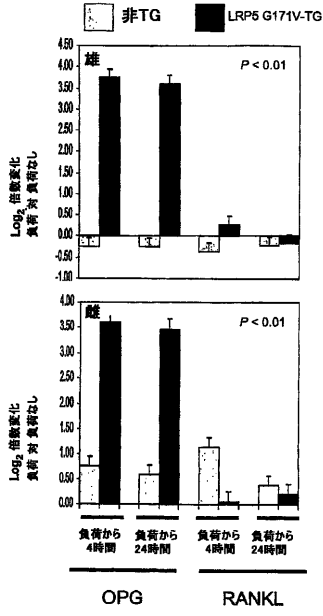


FIG. 14

【 図 1 5 】

COX-2は、負荷誘導Wnt/ β カテニン応答において部分的な役割を担っている

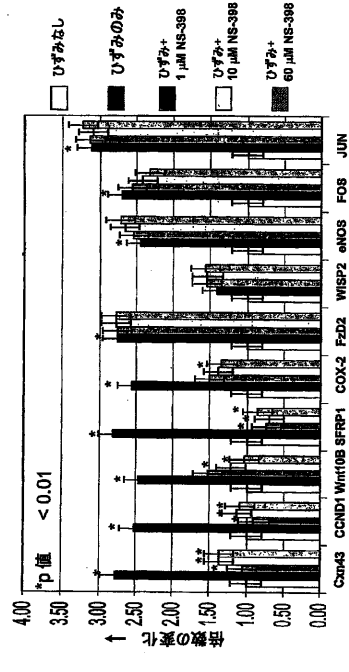


FIG. 15

【 図 1 6 】

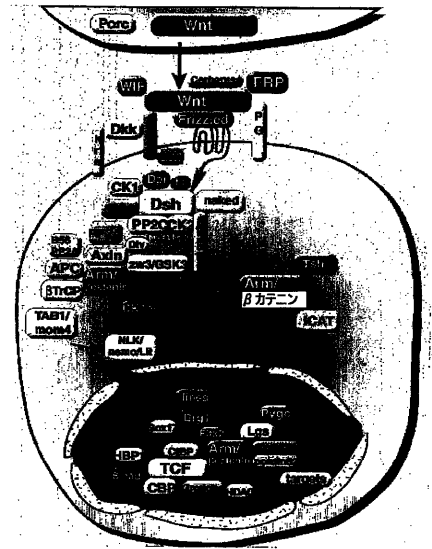


FIG. 16

【 図 1 7 】

天然Wntリガンド(Wnt 3A)も β カテニンを相乗的に誘導する

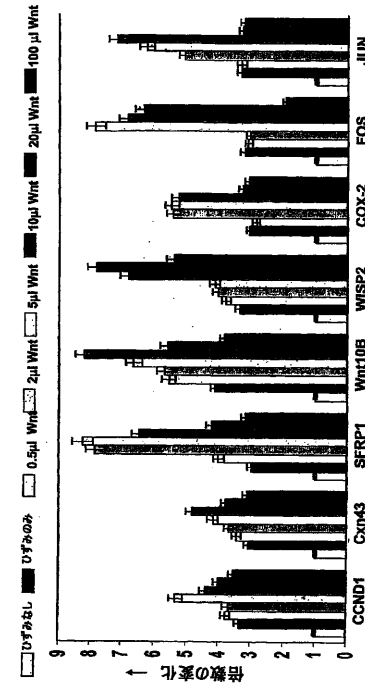


FIG. 17

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/US2004/017951

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12Q1/68		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12Q		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 99/60164 A (QUARK BIOTECH, INC) 25 November 1999 (1999-11-25) page 75; example 2	15,48, 50,51
A	KUHL M ET AL: "The Wnt/Ca ²⁺ pathway - a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape" TRENDS IN GENETICS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 16, no. 7, July 2000 (2000-07), pages 279-283, XP004207238 ISSN: 0168-9525 the whole document	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents:		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *8* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 July 2005		Date of mailing of the international search report 01/08/2005
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Leber, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2004/017951

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the International application and necessary to the claimed invention, the International search was carried out on the basis of:
- a. type of material
- a sequence listing
- table(s) related to the sequence listing
- b. format of material
- In written format
- In computer readable form
- c. time of filing/furnishing
- contained in the International application as filed
- filed together with the International application in computer readable form
- furnished subsequently to this Authority for the purpose of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/017951

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SANEYOSHI TAKEO ET AL: "The Wnt/calcium pathway activates NF-AT and promotes ventral cell fate in Xenopus embryos." NATURE. 16 MAY 2002, vol. 417, no. 6886, 16 May 2002 (2002-05-16), pages 295-299, XP002332460 ISSN: 0028-0836 the whole document	
A	SHELDAHL L C ET AL: "Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner." CURRENT BIOLOGY : CB. 1 JUL 1999, vol. 9, no. 13, 1 July 1999 (1999-07-01), pages 695-698, XP002332461 ISSN: 0960-9822 the whole document	
X	SIRONEN REIJO K ET AL: "High pressure effects on cellular expression profile and mRNA stability. A cDNA array analysis." BIORHEOLOGY. 2002, vol. 39, no. 1-2, 2002, pages 111-117, XP002332462 ISSN: 0006-355X page 112, last paragraph	1,2,32, 35
X	GARRIDO JOS L ET AL: "Protein kinase C inhibits amyloid beta peptide neurotoxicity by acting on members of the Wnt pathway." THE FASEB JOURNAL : OFFICIAL PUBLICATION OF THE FEDERATION OF AMERICAN SOCIETIES FOR EXPERIMENTAL BIOLOGY. DEC 2002, vol. 16, no. 14, December 2002 (2002-12), pages 1982-1984, XP002332463 ISSN: 1530-6860 page 1984; figures 2D,E,F	26
X	LAL S P ET AL: "Antibody arrays: an embryonic but rapidly growing technology" DRUG DISCOVERY TODAY, ELSEVIER SCIENCE LTD, GB, vol. 7, no. 18, 15 September 2002 (2002-09-15), pages S143-S149, XP004534138 ISSN: 1359-6446 the whole document	44

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/017951

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LUCAS F R ET AL: "Inhibition of GSK-3beta leading to the loss of phosphorylated MAP-1B is an early event in axonal remodelling induced by WNT-7a or lithium." JOURNAL OF CELL SCIENCE. MAY 1998, vol. 111 (Pt 10), May 1998 (1998-05), pages 1351-1361, XP002332464 ISSN: 0021-9533 abstract page 1352, left-hand column; figures 1-3	26
Y	WOLF M E ET AL: "Lithium therapy, hypercalcemia, and hyperparathyroidism." AMERICAN JOURNAL OF THERAPEUTICS. 1997 SEP-OCT, vol. 4, no. 9-10, September 1997 (1997-09), pages 323-325, XP009049131 ISSN: 1075-2765 the whole document	27
Y	MCHENRY C R ET AL: "Lithiumogenic disorders of the thyroid and parathyroid glands as surgical disease." SURGERY. DEC 1990, vol. 108, no. 6, December 1990 (1990-12), pages 1001-1005, XP009049152 ISSN: 0039-6060 the whole document	27
Y	WOLF M E ET AL: "Hypercalcemia, arrhythmia, and mood stabilizers." JOURNAL OF CLINICAL PSYCHOPHARMACOLOGY. APR 2000, vol. 20, no. 2, April 2000 (2000-04), pages 260-264, XP009049151 ISSN: 0271-0749 the whole document	27
A	HADJIARGYROU MICHAEL ET AL: "Transcriptional profiling of bone regeneration. Insight into the molecular complexity of wound repair." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 16 AUG 2002, vol. 277, no. 33, 16 August 2002 (2002-08-16), pages 30177-30182, XP002332465 ISSN: 0021-9258	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US2004/017951

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BURGER E H ET AL: "Responses of bone cells to biomechanical forces in vitro." ADVANCES IN DENTAL RESEARCH. JUN 1999, vol. 13, June 1999 (1999-06), pages 93-98, XP009049014 ISSN: 0895-9374	
A	US 6 048 723 A (BANES ET AL) 11 April 2000 (2000-04-11)	

International Application No. PCT/US2004 /017951

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 1-3, 26-30, 32-34, 38-42, 44(partly);
4-14, 19-25, 31, 36, 43, 45, 47(fully)

Claim 1 refers to a "gene expression profile" and thus to the mere presentation of information, which is objectable under Rule 39(1)(v) PCT. Thus, no search is carried out for claim 1 over its full scope. In view of dependent claim 2, the term "gene expression profile" used in claim 1 is understood as referring to a "set of nucleic acids corresponding to specific genes". The search of claim 1 is thus limited to a set of nucleic acids corresponding to the specific genes of claim 2.

Claim 3 refers to gene expression profiles comprising two or more genes of Tables 1-5, 11 or 12. In view of the fact that the said tables contain more than 100 entries which according to the wording of claim 3 can arbitrarily be combined, claim 3 lacks clarity and conciseness rendering it impossible to carry out a meaningful search over its full scope. The description, however, appears to specify a particular preferred set of genes (page 32, lines 23-25). Claim 3 was thus searched with regard to the genes specified in this section. Claims 4-11 relate to gene expression profiles for which only a functional definition is provided. The absolute lack of any corresponding structural features renders it impossible to interpret these claims in the way claims 1-3 have been interpreted. These claims thus relate to mere presentation of information and, furthermore lack clarity (Art 6 PCT) to such an extent as to render impossible a meaningful search with respect to their subject-matter. The same applies to claim 14.

Claim 12 refers to a method whereby a gene expression profile is compared to the gene expression profile of claim 1. The expression "gene expression profile" is interpreted as above for claim 1. In view of this, claim 12 is so unclear that no meaningful search can be carried out. The same applies to dependent claim 13.

For the same reasons, also no search is carried out for claim 19. Consequently, also no search over the full scope can be carried out for any of claims 32-34. A search of claims 32-34 and 37 limited to the embodiment specified in dependent claim 35 was carried out. Claim 36, which is also dependent on claim 32, refers to a composition wherein the plurality of probes comprise nucleic acid sequences that anneal to nucleic acid sequences of genes of gene transcripts of Tables 1-5, 11 or 12. As for claim 3 above, claim 36 was only searched with regard to the genes specified on page 32, lines 23-25 of the description.

Claim 20 refers to a method referring to the gene expression profile of claim 19. As stated above, no search is carried out for claim 19, and the term "gene expression profile" is understood as a "set of nucleic acids corresponding to specific genes". In spite of the meaning given to the term "gene expression profile" (see above) claim 20 is so unclear that no meaningful search can be carried out or for any of the claims 21-25 dependent thereon. For the same reasons, also no search is carried out for claim 43.

Claim 26 refers to a product identified by the screening method of claim 20. Claim 26 thus represents a reach through claim whereby the products claimed by reference to a screening method only without providing any

International Application No. PCT/US2004/017951

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

technical features of the products as such. Claim 26 is thus so unclear that no meaningful search can be carried out over its full scope. In the light of the description (page 11, lines 3-19) and dependent claim 31 (it seems that claim 31 refers by error to claim 25 but was meant to refer to claim 26), it would appear that LiCl would fall under the scope of claim 26. The search with respect to claim 26 is thus limited to this compound. Claim 27 and claims 28-30 dependent thereon, which refer to a method of treatment using the compound as identified by claim 26, is limited to the same compound. Claim 31 only provides a functional definition of the agent, rendering a meaningful search for this claim impossible.

Claim 38 refers to a method of modulating bone mineralization in a cell comprising administering an agent which produces a bone load expression profile of any of claim 1 or 14. As discussed above, only a partial search is carried out for any of claim 1 and no search for claim 14. In the light of the description (page 11, lines 3-19) and dependent claim 39 which refers to COX-2 antagonists, it would appear that LiCl would fall under the agents that could possibly generate a gene expression profile as specified in claim 38. The search with respect to claim 38 and claims 39-42 dependent thereon is thus limited to this compound. Claim 44 refers to a plurality of antibodies, wherein the said antibodies recognise and bind to two or more proteins of Tables 1-5, 11 or 12. For the same reasons as those outlined for claim 3 above, the search for claim 44 is limited to the specific proteins specified in claim 46. With regard to claims 45 and 47, no search is being carried out for the same reasons as those raised to claim 44 in combination with the fact that no searchable embodiments are referred to neither in the description nor in the claims dependent thereon.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2004/017951

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4 (a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US2004/017951

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
WO 9960164	A	25-11-1999	AU 4004699 A	06-12-1999
			CA 2332150 A1	25-11-1999
			EP 1082463 A1	14-03-2001
			JP 2002535956 T	29-10-2002
			WO 9960164 A1	25-11-1999
			US 2002022026 A1	21-02-2002
			US 2002086825 A1	04-07-2002
			US 2002137705 A1	26-09-2002
			US 2002151514 A1	17-10-2002
			ZA 200006613 A	14-02-2002
US 6048723	A	11-04-2000	NONE	

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 19/10 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/10	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 37/00	1 0 2
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
C 0 7 K 14/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z
	G 0 1 N 33/50	Z
	C 0 7 K 14/00	

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

(72) 発明者 ロビンソン, ジョン・エイ

アメリカ合衆国ペンシルヴァニア州 1 9 3 3 5, ダウニングタウン, ウェブ・ロード 2 3

(72) 発明者 バート, ベーム・エム

アメリカ合衆国ペンシルヴァニア州 1 9 3 8 0, ウェスト・チェスター, メイアップル・レイン
1 2 1 4

(72) 発明者 ベックス, フレデリック・ジェイムズ, ザ・サード

アメリカ合衆国ペンシルヴァニア州 1 9 0 7 3, ニュータウン・スクエア, レイクショア・ドライブ 4

F ターム(参考) 2G045 AA40 BB20 CB01 DA12 DA13 DA14 DA36 FB02 FB03 FB15
4B024 AA01 AA11 BA80 CA05 CA09 CA12 DA03 HA12
4B029 AA07 AA21 BB17 BB20 CC03 FA12
4B063 QA18 QQ08 QQ53 QR08 QR32 QR55 QR62 QR82 QS25 QS33
QS34 QS39
4C084 AA02 AA07 AA13 AA17 BA35 BA44 CA62 NA14 ZA962 ZA972
ZB112 ZC212 ZC412
4H045 AA10 AA11 AA30 BA05 DA75 EA50 FA20 FA72

专利名称(译)	用于鉴定调节骨重塑的物质的方法和材料，以及由此鉴定的物质		
公开(公告)号	JP2007525953A	公开(公告)日	2007-09-13
申请号	JP2006515244	申请日	2004-06-07
[标]申请(专利权)人(译)	惠氏公司		
申请(专利权)人(译)	魏斯		
[标]发明人	チャタジーキショールモイトレイー ロビンソンジョンエイ パートベームエム ベックスフレデリックジェイムズザサード		
发明人	チャタジーキショール,モイトレイー ロビンソン,ジョン・エイ パート,ベーム・エム ベックス,フレデリック・ジェイムズ,ザ・サード		
IPC分类号	C12N15/09 C12Q1/68 C12M1/00 C12Q1/02 A61K45/00 A61K48/00 A61P19/10 A61P19/02 A61P43/00 G01N33/53 G01N37/00 G01N33/15 G01N33/50 C07K14/00		
CPC分类号	A61P19/02 A61P19/10 C12Q1/6876 C12Q1/6883 C12Q2600/158		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12Q1/68.A C12N15/00.F C12M1/00.A C12Q1/02 A61K45/00 A61K48/00 A61P19/10 A61P19/02 A61P43/00 G01N33/53.M G01N37/00.102 G01N33/53.D G01N33/15.Z G01N33/50.Z C07K14/00		
F-TERM分类号	2G045/AA40 2G045/BB20 2G045/CB01 2G045/DA12 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA36 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB15 4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA80 4B024/CA05 4B024/CA09 4B024/CA12 4B024/DA03 4B024/HA12 4B029/AA07 4B029/AA21 4B029/BB17 4B029/BB20 4B029/CC03 4B029/FA12 4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ53 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR55 4B063/QR62 4B063/QR82 4B063/QS25 4B063/QS33 4B063/QS34 4B063/QS39 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/AA17 4C084/BA35 4C084/BA44 4C084/CA62 4C084/NA14 4C084/ZA962 4C084/ZA972 4C084/ZB112 4C084/ZC212 4C084/ZC412 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA05 4H045/DA75 4H045/EA50 4H045/FA20 4H045/FA72		
优先权	60/476164 2003-06-06 US 60/501398 2003-09-10 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明公开了用于研究骨矿化并鉴定调节骨矿化的试剂的组合物，化合物，设备和使用它们的方法。还公开了使用骨矿化基因概况和特征进行化合物筛选和研究的方法。提供用于调节骨矿化的试剂用于治疗和研究用途。

The GSK3 inhibitor Elicits a Synergistic Response on Expression of β -Catenin Target Genes in the Presence of Load

