

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780020213.9

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)

[43] 公开日 2009 年 6 月 17 日

[11] 公开号 CN 101460846A

[22] 申请日 2007.3.30

[21] 申请号 200780020213.9

[30] 优先权

[32] 2006.4.3 [33] US [31] 60/788,878

[32] 2006.4.3 [33] GR [31] 2006/0100207

[86] 国际申请 PCT/US2007/007913 2007.3.30

[87] 国际公布 WO2007/123682 英 2007.11.1

[85] 进入国家阶段日期 2008.12.1

[71] 申请人 美德爱克西斯公司

地址 希腊雅典

[72] 发明人 N·贝科普洛斯

K·阿列维佐普洛斯

R·L·布查南 C·斯图尔纳拉斯

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 刘冬 李连涛

权利要求书 5 页 说明书 42 页 附图 6 页

[54] 发明名称

膜雄激素受体(mAR)调节剂的检测方法

[57] 摘要

公开了能调节膜雄激素受体(mAR)的调节剂的检测方法。在一个实施方案中,本发明提供用于检测和任选鉴别 mAR 结合配体的方法。相对于结合经典胞内雄激素受体(iAR 或 AR)而言,本发明的一个测定方法检测能选择性结合 mAR 的结合剂。本发明具有广泛用途,包括提供优先结合 mAR 的化学实体的文库的筛选方法。

1. 一种检测能调节膜雄激素受体(mAR)功能的调节剂的方法,所述方法包括以下步骤:

a. 在允许 mAR 与雄激素化合物结合的条件下,使 mAR 与带有可检测标记的雄激素化合物接触,形成第一复合物;

b. 在允许所述调节剂与 mAR 之间结合的条件下,使第一复合物与所述调节剂接触,形成第二复合物;和

c. 检测自第一复合物中释放的所述带有可检测标记的雄激素化合物,作为所述调节剂存在的标志。

2. 权利要求 1 的方法,其中相对于合适对照而言,认为所述带有可检测标记的雄激素化合物释放的增加进一步表明存在所述调节剂。

3. 一种检测能调节膜雄激素受体(mAR)功能的调节剂的方法,所述方法包括以下步骤:

a. 在允许 mAR 与雄激素化合物结合的条件下,使 mAR 与带有可检测标记的雄激素化合物和所述调节剂接触,形成第一复合物;和

b. 检测与第一复合物结合的带有可检测标记的雄激素化合物水平的下降,作为所述调节剂存在的标志。

4. 权利要求 3 的方法,其中相对于合适对照而言,认为结合雄激素化合物水平的下降进一步表明存在 mAR 调节剂。

5. 权利要求 1-4 中任一项的方法,其中所述方法还包括以下步骤:

i. 在允许胞内雄激素受体(iAR)与雄激素化合物结合的条件下,使 iAR 与带有可检测标记的相同或不同的雄激素化合物接触,形成第三复合物;和

ii. 在允许所述化合物与第三复合物之间结合的条件下,使第三复合物与所述调节剂接触。

6. 权利要求 1-4 中任一项的方法,其中所述方法还包括以下步

骤：在允许胞内雄激素受体(iAR)与雄激素化合物结合的条件下，使 iAR 与带有可检测标记的相同或不同的雄激素化合物和所述调节剂接触，形成第三复合物。

7. 权利要求 5-6 中任一项的方法，其中所述方法与权利要求 1-4 中任一项的方法基本上平行进行。

8. 权利要求 5-7 中任一项的方法，其中所述方法还包括以下步骤：相对于合适对照而言，在所述调节剂存在下，检测自第三复合物没有或几乎没有释放带有可检测标记的雄激素化合物，作为所述调节剂存在的标志。

9. 权利要求 1-4 中任一项的方法，其中一个或多个所述接触步骤是用已知或怀疑表达 mAR 的细胞、细胞系或组织样品进行的。

10. 权利要求 1-4 中任一项的方法，其中所述表达 mAR 的细胞系是 DU-145 或 LNCaP。

11. 权利要求 1-4 中任一项的方法，其中所述表达 mAR 的组织样品是前列腺组织。

12. 权利要求 11 的方法，其中所述前列腺组织已知或怀疑是癌性的。

13. 权利要求 5-8 中任一项的方法，其中一个或多个所述接触步骤是用表达 iAR 的细胞、细胞系或组织样品进行的。

14. 权利要求 13 的方法，其中所述 iAR 是由所述细胞、细胞系或组织样品瞬时表达的。

15. 权利要求 14 的方法，其中所述细胞或细胞系还包括含有雄激素应答元件(ARE)的报道基因构建体。

16. 权利要求 15 的方法，所述方法还包括以下步骤：相对于合适对照而言，检测没有或几乎没有来自所述报道基因构建体的信号，作为所述调节剂存在的标志。

17. 权利要求 5-8 和 13-16 中任一项的方法，其中 iAR 呈合成脂质体组合物形式。

18. 权利要求 1-17 中任一项的方法, 其中所述方法是用来自已知或怀疑表达 mAR 的细胞、细胞系或组织样品的亚细胞部分实施的。

19. 权利要求 1-17 中任一项的方法, 其中所述方法是用能表达 iAR 的细胞的亚细胞部分实施的。

20. 权利要求 1-22 中任一项的方法, 其中所述雄激素化合物用放射性同位素、荧光团、荧光猝灭剂、酶、亲和标记或化学发光部分、发磷光部分或发色部分中的至少一种进行可检测标记。

21. 权利要求 20 的方法, 其中所述雄激素化合物用氘进行可检测标记。

22. 权利要求 1-21 中任一项的方法, 其中所述带有可检测标记的雄激素化合物是氘化二氢睾酮(^3H -DHT)或氘化睾酮(^3H -T)。

23. 权利要求 1-22 中任一项的方法, 其中所述雄激素化合物包括雄激素和与所述雄激素共价结合的连接基。

24. 权利要求 23 的方法, 其中所述雄激素是睾酮或二氢睾酮。

25. 权利要求 1-24 中任一项的方法, 其中所述连接基结合在甾体环的 3'-碳上, 所述连接基是 O-羧甲基肼连接基。

26. 权利要求 1-25 中任一项的方法, 其中所述检测步骤是用至少一种下列方法来完成的: 标记置换、表面等离子共振、荧光共振能量转移、荧光猝灭、荧光偏振、发光、化学发光、荧光、吸收和闪烁计数。

27. 权利要求 1-26 中任一项的方法, 其中所述调节剂是肽、类肽、多肽、抗体或其抗原结合片段、脂质、碳水化合物、核酸、小分子; 或它们的组合。

28. 权利要求 27 的方法, 其中所述调节剂是与连接基和氨基酸序列共价结合的雄激素或其衍生物。

29. 权利要求 28 的方法, 其中所述调节剂具有按顺序共价结合的下列结构: 睾酮或其衍生物/连接基/血清白蛋白或其衍生物。

30. 权利要求 1-29 中任一项的方法, 其中所述连接基是羧基-甲

基醚基团。

31. 权利要求 30 的方法, 其中所述调节剂是睾酮 3-(O-羧甲基) 肼-血清白蛋白。

32. 权利要求 31 的方法, 其中所述调节剂带有可检测标记。

33. 权利要求 1-32 中任一项的方法, 其中所述方法还包括检测 mAR 的信号分子下游的快速调节的步骤, 所述方法还包括检测所述信号分子水平相对于合适对照的变化的步骤。

34. 权利要求 33 的方法, 其中所述检测信号分子的调节的步骤包括测定鸟嘌呤核苷酸结合或交换、激酶活性、鸟苷三磷酸酶活性、磷脂酰肌醇分解、二酰基甘油、肌醇三磷酸、肌动蛋白重组构、报道基因表达和胞内钙水平中的至少一种的活性。

35. 权利要求 34 的方法, 其中所述激酶是黏着斑激酶(FAK)或磷脂酰肌醇-3 (PI-3)激酶。

36. 权利要求 34 的方法, 其中所述方法还包括检测 FAK 与磷脂酰肌醇-3 (PI-3)激酶缔合的步骤。

37. 权利要求 34 的方法, 其中所述鸟苷三磷酸酶是 Cdc42/Rac1。

38. 权利要求 34 的方法, 其中所述鸟苷三磷酸酶是 RHO。

39. 权利要求 34 的方法, 其中所述激酶是 ROCK。

40. 权利要求 34 的方法, 其中所述激酶是 LIMK2。

41. 权利要求 34 的方法, 其中通过使用钙探针、钙探针的抗体、钙离子载体和钙螯合剂中的至少一种来检测所述胞内钙水平。

42. 权利要求 1-41 中任一项的方法, 其中所述方法还包括快速检测由已知或怀疑表达 mAR、iAR 或这两者的细胞、细胞系或组织样品表达的前列腺特异性抗原(PSA)的步骤。

43. 权利要求 42 的方法, 其中所述 PSA 通过免疫学方法来检测。

44. 权利要求 1-43 中任一项的方法, 其中所述方法还包括检测能表达 mAR 的细胞、细胞系或组织样品中的细胞死亡(细胞凋亡)的步骤。

45. 权利要求 44 的方法,其中通过测定膜联蛋白或通过使用可检测小分子来检测细胞凋亡。

46. 权利要求 1-45 中任一项的方法,其中所述方法还包括检测 iAR 在体内的任何活化的步骤。

47. 权利要求 46 的方法,其中所述方法还包括将所述调节剂给予接受了睾丸切除术的哺乳动物。

48. 权利要求 47 的方法,其中所述方法还包括相对于合适对照而言,选择在哺乳动物中具有至少一种以下特性的调节剂:

- a. 前列腺重量没有或几乎没有增加;
- b. 体重没有或几乎没有增加;
- c. 体脂肪没有或几乎没有降低; 和
- d. 骨密度没有或几乎没有增加。

49. 权利要求 48 的方法,其中所述方法还包括选择具有至少一种以上特性的调节剂,作为所述调节剂存在的另一标志。

膜雄激素受体(mAR)调节剂的检测方法

相关申请

本申请要求于 2006 年 4 月 3 日申请的美国临时专利申请号 60788,878 和 2006 年 4 月 3 日申请的希腊专利申请号 GR2006/0100207 的权益。上述专利申请的全部内容都通过引用结合到本文中。

发明领域

一般而言, 本发明涉及可调节膜雄激素受体(membrane androgen receptor, mAR)的配体和其它调节剂的检测方法。更具体地讲, 本发明提供这类调节剂的检测方法。优选本发明的测定方法检测配体, 相对于结合胞内雄激素受体(intracellular androgen receptor, iAR 或 AR)而言, 这类配体选择性结合 mAR。本发明具有广泛用途, 包括提供用于筛选特异性结合 mAR 的实体化学文库的方法。

背景

众所周知, 雄激素活性是通过与胞内雄激素受体(在本文称为 iAR 或 AR)结合而介导的。认为 iAR 是核受体超家族成员, 其作用是作为配体激活的转录因子。已经报告了雄激素对表达 iAR 的细胞的效应, 包括与受体结合。额外效应包括雄激素内化、二聚化、核易位、核酸结合、以及雄激素敏感基因的活化/阻遏。雄激素介导的基因表达是通过 AR 起作用, 通常需要数小时。一般性介绍可参见 Pietras, RJ. 等(2001) *Endocrine* 14: 417-427, Kumar, MV (1998) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 59: 289-306; 及其中引用的参考文献。

人们一直认为某些雄激素衍生物例如二氢睾酮(DHT)是天然 AR 配体。为了开发模拟或抑制这些效应的物质所进行的研究工作已有报道。例如, 许多小分子 AR 调节剂包括醋酸环丙孕酮、氟他胺、

chloramidone、比卡鲁胺、以及某些喹啉和喹啉酮(quinolinone)衍生物。参见例如 PCT/IB2005/002592 (WO 2006/024931); PCT/US2004/038859 (WO 2005/052118) ; PCT/2004/027483 (WO 2005/018573) ; PCT/2005/013775 (WO 2005/105091) ; PCT/US2005/029592 (WO 2006/026196); 和 PCT/IB2005/002592 (WO 2006/024931); 及其中公开的参考文献。

逐渐公认至少某些雄激素的生物活性比 AR 结合(以小时计)要快得多(以分钟计)。因此,已经报告了不包括 AR 的“非经典”甾体结合实体,即结合实体。参见 Papakonstanti, E.等(2003) *Molecular Endocrinology* 17: 870; Koukouitaki, S.B.等(1999) *Mol. Med.* 5: 731; 及其中引用的参考文献。

更具体地讲,报道了在表达最少量 iAR 或不表达 iAR 的细胞中的雄激素膜结合位点。这类细胞包括但不限于 T 淋巴细胞、单核细胞、成骨细胞(ostoblast)、前列腺组织和某些细胞系。已报道的参与调节 mAR 的共同要素包括胞内钙的增加,可检测的前列腺特异性抗原(PSA)的增加,细胞死亡(细胞凋亡)的增加和大量肌动蛋白重组。参见 Gorczynska, E.和 Handelsman, DJ (1995) *Endocrinology* 136: 2052; 和 Kampa, M.等(2002) *FASEB J.* 16: 1429。

已经综述了 mAR 的分布和作用。参见 Kampa, M. E. Castanas (2006) *Mol. and Cell. Endocrinology* 246: 76; 及其中公开的参考文献。简而言之,认为 mAR 活化在肌动蛋白重组、细胞凋亡和胞内钙水平的调节上起到重要作用。已经提出, mAR 可代表新型治疗靶标。参见 Kampa, M.E.和 Castanas (2006), 出处同上; Hatzoglou, A.等(2005) *J. of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90: 893; Kampa, M.等(2002), 出处同上; Stathopoulos, E.等(2003) *BMC Clinical Pathology* 3:1; 及其中引用的参考文献。

希望检测能调节 mAR 的调节剂。更希望拥有检测调节剂的方法,相对于调节 AR 而言,所述调节剂优先调节 mAR。更优选的方法是能

够检测受体结合配体, 相对于结合 AR 而言, 所述配体特异性结合 mAR。

发明概述

一般而言, 本发明涉及可检测用于调节(增加或降低)膜雄激素受体(mAR)的调节剂的方法。更具体地讲, 本发明涉及可用于检测调节剂的方法, 相对于调节胞内膜受体(iAR 或 AR)而言, 所述调节剂优先调节 mAR。更具体的方法可用于检测和鉴定配体, 相对于 AR 而言, 所述配体特异性结合 mAR。本发明具有广泛用途, 包括提供可用于筛选化学文库的方法, 以筛选与 mAR 特异性结合的分子。

说明性的调节剂是受体结合配体和类似分子。可通过采用本文所述的体外和体内方法中的一种或其组合, 鉴定这类调节剂。可根据有待分析的调节剂数量、所需的特异性和选择性、以及使用者可完成的方法数量等公知的参数, 指导对本发明具体方法(或方法的组合)的选择。

因此, 一方面, 本发明提供可调节(增加或降低) mAR 功能的调节剂的检测方法。在一个实施方案中, 该方法包括至少一个和优选所有以下步骤:

- a. 在允许 mAR 与雄激素化合物结合的条件下, 使 mAR 与带有可检测标记的雄激素化合物接触, 形成第一复合物;
- b. 在允许调节剂与 mAR 之间结合的条件下, 使第一复合物与调节剂接触, 形成第二复合物; 和
- c. 检测自第一复合物中释放的带有可检测标记的雄激素化合物, 作为所述调节剂存在的标志。

可以理解, 带有可检测标记的雄激素化合物和调节剂用于本发明的顺序并不重要, 只要能得到预期结果。因此, 在一个实施方案中, 可采用这样的方法, 使得能形成第一复合物(有时用过量雄激素), 然

后添加待测调节剂(饱和形式)。或者,可以同时加入调节剂和带有可检测标记的雄激素,形成第一复合物(竞争形式)。在另一个方法实施方案中,在加入待筛选调节剂之后,加入带有可检测标记的雄激素。

因此,在一个实施方案中,本发明包括检测可调节 mAR 功能的调节剂,所述检测包括至少一个和优选所有以下步骤:

a. 在允许 mAR 与雄激素化合物结合的条件下,使 mAR 与带有可检测标记的雄激素化合物和调节剂接触(通过例如将它们全部混合在一起或一次加一种地混合它们),形成第一复合物;和

b. 检测与第一复合物结合的带有可检测标记的雄激素化合物水平的下降,作为所述调节剂存在的标志。

在上述本发明实施方案中,当待测调节剂存在时,形成第一复合物。带有可检测标记的雄激素和调节剂竞争性结合 mAR。mAR 与调节剂间形成的任何复合物在本文称为“第二复合物”。在该实施方案中,认为带有可检测标记的雄激素化合物水平下降(例如检测到比第一复合物更多的第二复合物),就表明存在可调节 mAR 的调节剂。尽管筛选组分的加入顺序未必重要,但是通常先形成第一复合物,然后再添加待测调节剂。

尽管未必需要优化实践本发明(例如当特定调节剂的受体活性已知时),但是包括合适的对照之一或其组合通常是很有用的。一般而言,与调节剂不存在时相比,“合适的对照”将会给出有关所述调节剂活性的信息。或者,或另外,“合适的对照”将会给出有关调节剂对 AR 的活性的信息。谨慎使用这样的对照有许多实践益处,包括增加能特异性结合 mAR 的检测试剂的可能性。正如所讨论的,具体的目标调节剂的确会增加 mAR 活性,而且优选在本文所提供的对照测定之一或其组合中也会显示出无活性或活性可忽略不计。举例来说,具体的目标调节剂可直接或间接地使自第一复合物释放出的带有可检测标记的雄激素化合物有实质性的增加。在设计用于检测和任选定量

检测能调节 AR 的调节剂的能力的合适对照测定中，优选该调节剂显示出无活性或活性可忽略不计。

因此，通常可用于进行一个或多个合适的对照测定，例如设计用于检测对 AR 的调节的那些。在一个具体的实施方案中，评价调节剂增加 mAR 活性的能力，并与该调节剂增加或降低 AR 功能的能力进行比较。更特异性的对照测定包括使该调节剂与已知能表达 AR 的合适细胞或其亚细胞部分(例如细胞膜、细胞核或细胞溶质部分)接触。这样的对照测定包括测定所述调节剂的活性。在对照测定中可直接监测其活性(例如通过监测受体结合)或可间接监测(例如通过监测 AR “下游”的分子；通过监测基因转录、翻译或 AR 特异性蛋白质的表达)。因此，一个说明性对照设计用于检测和任选定量检测调节剂作为受体配体而结合 AR 的能力。在本文所公开的一个对照测定或对照测定组合中，本发明的优选调节剂将会表现出不增加或几乎不增加 AR 活性。在本发明的一个或多个 mAR 测定中，高度优选的调节剂表现出基本活性，而在任何 AR 对照测定中则表现出无活性或活性可忽略不计。

在本发明的合适对照测定的一个实施方案中，进行至少一个和优选所有以下步骤：

- i. 在允许 iAR 与雄激素化合物结合的条件下，使 iAR 与带有可检测标记的雄激素化合物接触，形成第三复合物；和
- ii. 在允许化合物与第三复合物之间结合的条件下，使第三复合物与待测调节剂接触。优选的调节剂可使自第三复合物不释放或几乎不释放出带有可检测标记的雄激素。

在另一个合适的对照实施方案中，使 iAR 接触带有可检测标记的雄激素化合物和调节剂。优选在允许 iAR 与调节剂结合的条件下进行接触，形成第三复合物。在本发明的该实例中，设计对照，用于在竞争性形式中形成第三复合物。iAR 与调节剂间形成的任何复合物在本文称为“第四复合物”。或者，在有利于形成第三(或第四)复合物的

条件下,使待测调节剂接触 iAR,然后使 iAR 接触带有可检测标记的雄激素。

本发明是灵活多变的,可以视需要进行修改,以适合预期用途。因此,例如,用于一种对照或上述对照的带有可检测标记的雄激素化合物可以与用于所选择的 mAR 测定的化合物相同或不同。可根据所选择的特异性对照测定、待测调节剂的数量和所需测定灵敏度等公知的参数,指导对带有可检测标记的雄激素用于给定对照的选择。

尽管未必需要优化使用本发明,但是有时进行一种方法以测定某一调节剂调节 mAR 功能的能力,基本上同时平行用对照来测定该调节剂调节 AR 的能力,这是很有用的。因此,在一个实施方案中,可以进行 mAR 筛选测定之一或其组合,基本上同时平行用对照测定之一或其组合,以测定所述调节剂调节 AR 的能力。可以理解,未必总是需要进行具体 mAR 测定和平行(即同时)的对照测定。例如,在 AR 活性相对于给定调节剂而言是众所周知的实施方案中,在进行所选 mAR 测定时,并非每次测定都需要有对照。或者,在筛选大量调节剂(例如其中要检查较大的化学文库)的实施方案中,就不必进行对照测定之一或其组合,以达到优化结果。例如,先通过检测活化 mAR 的潜力而筛选调节剂,再用对照测定之一或其组合进行进一步测定,可能会很有用。

对于本发明的许多实施方案而言,可能有用的是包括至少某些对照测定,用于监测 AR 调节,尤其是在本发明用于高或超高通量筛选(HTS)模式的实施方案中。这样的模式对分析大量候选调节剂对 mAR 活化潜力而言特别有用。

在用对照测定来检测第三复合物(由 iAR 与带有可检测标记的雄激素化合物结合而形成)的实施方案中,该方法还可包括对第三复合物在调节剂存在下释放带有可检测标记的雄激素化合物的检测步骤。优选这样的调节剂表现出从第三复合物中不释放或几乎不释放带标记的雄激素化合物。

根据以下讨论和实施例,本发明的这些和其它用途和优势将会显而易见。

附图简述

图 1A-1B 是显示氘化睾酮在表达 mAR (LNaCP)的细胞的细胞膜上的饱和及置换结合的图。

图 2A-B 是显示经睾酮处理后 DU-145 细胞的修饰和聚合肌动蛋白的图。

图 3A-C 是显示雄激素对肌动蛋白细胞骨架组构的效应的形态学分析的显微照片。

图 4 是细胞暴露给不同化合物后的细胞死亡(细胞凋亡)的图。

图 5A-B 是暴露给睾酮 BSA 缀合物之后的不同信号分子的活性的图。

图 6A 是凝胶图,图 6B 是柱状图。这两幅图显示当用睾酮-BSA 缀合物处理 DU-145 细胞时,RhoA 和 ROCK 信号分子被激活。

发明详述

正如所讨论的,本发明可用于检测能增加或降低 mAR 结合的调节剂。优选的调节剂是能优先或专一地增加 mAR 活化的受体配体,相对于调节 AR 的潜力而言。优选的受体配体特异性结合 mAR,而不能或几乎不能结合并活化 AR。

本文所用的“调节剂”包括其多种形式,是指通过共价或非共价相互作用与 mAR 或 AR (或两者)缔合的部分。经本文所公开的方法之一或其组合测定,优选的调节剂直接或间接地优先缔合 mAR。更优选的调节剂是“配体”。“配体”是指通常通过非共价相互作用而结合 mAR (或 AR)的具体调节剂。优选配体的受体结合常数足以允许通过一个或多个本文所公开的测定来检测结合。说明性的这类测定包括直接或间接监测受体结合复合物的形成或分解,检测第二信使、检测细

胞凋亡、检测前列腺特异性抗原(PSA)、检测胞内钙的那些测定,以及测定蛋白-配体结合的结合测定、测定抗体-抗原相互作用或细胞骨架重排的免疫测定。本发明的说明性配体是特定的雄激素,例如睾酮及其衍生物(例如 DHT)。其它合适的配体包括能结合 mAR 的抗体、抗原、酶、肽、多肽、类肽、核酸、甾体或小分子配体。优选的配体特异性结合 mAR,通常形成受体-配体复合物,而没有或几乎没有与 AR 相互作用的潜力。

本文所用的术语“第二信使”是指通过 mAR 或 AR 的活化而产生或引起浓度变化的分子。术语“第二信使的水平变化”是指,相对于候选调节剂不存在时进行的测定中所检测到的含量而言,所检测的给定第二信使水平提高或降低至少约 10%。本文提供了说明性的第二信使(信号)分子。

至于术语“特异性结合”或类似术语是指本文所公开的分子(例如调节剂)可结合另一分子(例如受体),由此形成特异性结合对。通过例如蛋白质印迹、ELISA、RIA、迁移率变动测定、酶-免疫测定、竞争性测定、饱和测定或本领域已知的其它蛋白质结合测定的检测所示,优选的分子不识别或结合其它分子。一般性参见 Ausubel 等,出处同上; Harlow 和 Lane,载于 *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988) 及其中引用的参考文献,例如合适的免疫学方法和检测分子间特异性结合的方法。在优选的实施方案中,该调节剂与 mAR 间的“特异性结合”的 K_d 为 1mM 以下,通常范围为 0.01nM 至约 100nM,优选约 0.1nM 至约 10nM 之间。本文公开了用于检测 K_d 的各种标准方法。

在本发明的 mAR 测定检测第二信使、胞内钙、PSA 分泌或细胞骨架重排中的一个或多个的实施方案中,在认为 mAR 发挥最大效应的时间内进行检测,即在约 3 小时之内、优选约 1 小时至约 2 小时之内、更优选约几分钟至约 30 分钟之内。相比之下,可在更长的时间之后进行凋亡效应的检测,即在约几小时至几天之间,例如 1、2、3 或 4 天至约一周。

调节剂，尤其是与 mAR 缔合(例如非共价结合)并模拟天然 mAR 配体(例如睾酮)效应的 mAR 受体配体，在本文称为“mAR 激动剂”。相比之下，能抑制天然 mAR 配体(例如睾酮)效应的调节剂称为“mAR 拮抗剂”。

更广而言之，与合适的对照例如天然配体(例如睾酮或 DHT)的结合相比，本发明的 mAR 激动剂可调节(在本实例中增加)由 mAR 介导的一种或多种生物学反应达至少约 2 倍、优选约 5 倍、更优选约 10 倍和最优选约 100 倍或更高(即约 150 倍、200 倍、250 倍、500 倍、1000 倍、至约 10,000 倍)。另一方面，与天然配体存在时的反应相比，本发明的 mAR 拮抗剂可调节(在本实例中减少)由 mAR 介导的一种或多种生物学反应达至少约 2 倍、优选约 5 倍、更优选约 10 倍和最优选约 100 倍或更高(即 150 倍、200 倍、250 倍、500 倍、1000 倍、至约 10,000 倍)。

本文所用的术语“雄激素”包括其多种形式，包括能刺激脊椎动物雄性性征发育的任何天然、合成、半合成或重组物质。优选的雄激素通常表现出有调节 mAR 的能力(经过例如以下讨论的已知测定方法之一或其组合而测定)。更具体的雄激素包括能控制附属雄性性器官活性的那些天然或合成化合物。雄激素有时称为“雄激素性激素”，或者有时也称为“睾丸激素”。

本发明更具体的雄激素在可接受的体外或体内测定中表现出明显活性。参见例如以下文献中用于检测 AR 调节的测定：PCT/IB2005/002592 (WO 2006/024931)；PCT/US2004/038859 (WO 2005/052118)；PCT/2004/027483 (WO 2005/018573)；PCT/2005/013775 (WO 2005/105091)；PCT/US2005/029592 (WO 2006/026196)；和 PCT/IB2005/002592 (WO 2006/024931)；及其中公开的参考文献。

鉴定雄激素的合适的体外测定在本领域中称为“放射性配体置换测定”。简而言之，该测定检测和优选检测置换 AR 受体配体(例如 DHT)的能力。可进行这个一般性试验的不同操作，以鉴定给定调节剂

的 IC_{50} 、 K_d 和 K_i 值。参见一个或多个以下文献：PCT/IB2005/002592 (WO 2006/024931)；PCT/US2004/038859 (WO 2005/052118)；PCT/2004/027483 (WO 2005/018573)；PCT/2005/013775 (WO 2005/105091)；PCT/US2005/029592 (WO 2006/026196)；和 PCT/IB2005/002592 (WO 2006/024931)；及其中公开的参考文献，例如 PCT/US2005/029592 (WO 2006/026196)，例如第 54-56 页。合适的体内测定用于在合适的动物模型中，在睾丸切除之后检测前列腺(以及附属器官，如有必要的话)。另见 Chang 等(1984) *J. Steroid Biochem.* 20: 1-17；和 Chang 等(1992) *PNAS* 89: 5546，用于其它优选的测定形式。因此，本发明的“雄激素”在一种或多种这些测定中表现出良好活性。

雄激素的“衍生物”是与睾酮具有结构和功能关系的物质，但也携带有一个或多个新的化学基团。这些基团可包括但不限于饱和基团、去饱和基团、烃基基团(包括烷烃、烯烃、炔烃和杂烃基)、芳基基团(包括芳烃和杂芳基)、醇、醚、胺、醛、酮、酸、酯、酰胺、环状化合物、杂环化合物(包括嘌呤、嘧啶、苯并二氮杂萘、 β -内酰胺类、四环素类、头孢类和碳水化合物)、其它甾体(包括雌激素、其它雄激素、可的松、ecodysone 等)、生物碱类(包括麦角、长春碱、箭毒、双吡咯烷(pyrollizidine)和丝裂霉素)、有机金属化合物、带有杂原子的化合物、氨基酸和核苷类。

更具体的雄激素和雄激素衍生物包括但不限于肾上腺雄激素，即由肾上腺皮质合成的任何 19 碳类固醇。其它雄激素包括睾酮、二氢睾酮(DHT)、特别是 5- α -二氢睾酮、脱氢表雄酮(DHEA，也称为脱氢异雄酮或脱氢雄酮)、雄烯二酮、雄烷二醇；以及天然、合成或半合成衍生物及其盐。本发明的“雄激素”可以呈盐形式，优选药学上可接受的盐。这类盐的实例包括酸加成盐，例如无机酸加成盐(例如盐酸盐、硫酸盐或磷酸盐)或有机酸加成盐(例如醋酸盐、马来酸盐、富马酸盐、酒石酸盐或柠檬酸盐)。药学上可接受的盐也可包括金属盐，尤其是碱金属盐，例如钠盐或钾盐；碱土金属盐，例如镁盐或钙盐；铵盐，例

如铵盐或四甲基铵盐；或氨基酸加成盐，例如赖氨酸盐、甘氨酸盐或苯丙氨酸盐。加成盐包括钠盐、氯化物、溴化物、富马酸盐、柠檬酸盐、丙酸盐、苯甲酸盐、环戊丙酸盐(cypionate)和己酸盐。

睾酮的许多衍生物是已知的，包括 D(-)-炔诺孕酮、表睾酮、17-苯甲酸睾酮、17-苯基丙酸睾酮、17 β -环戊丙酸睾酮、睾酮 3-(O-羧甲基)肼、睾酮肼，例如睾酮 3-(O-羧甲基)肼:BSA、睾酮 3-(O-羧甲基)肼:BSA-异硫氰酸荧光素缀合物、醋酸睾酮、睾酮 β -D-葡萄糖苷酸、睾酮 β -D-葡萄糖苷酸钠盐、庚酸睾酮、异己酸睾酮、丙酸睾酮、睾酮-d3、17- α -2-羧基-乙基-睾酮- γ -羧基-乙基-内酯、醋酸睾酮、睾酮- β -D-葡萄糖苷酸和 17- α -(2-羧乙基)睾酮- γ -内酯、5 α -雄甾烷-17 β -醇-3-酮、17-苯甲酸雄诺龙、丙酸二氢睾酮、甲雌三烯醇酮、雄诺龙、二氢睾酮、17-羟基雄甾烷-3-酮、hermalone、醋酸雄诺龙、5 β -二氢睾酮、丙酸雄诺龙、庚酸二氢睾酮、美雄诺龙、17-溴乙酰氧基二氢睾酮和 emdisterone。

另见 Hauptman, H. (2003) *Steroids* 68: 629 (介绍了二氢睾酮的 1 α -和 17 α -氨基烷基衍生物)。另见 National Library of Medicine (8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894 (USA)) PubChem Database, 公开了其它睾酮衍生物。

本发明范围内的其它具体睾酮衍生物包括这样的分子：其中例如睾酮或 DHT 与很大的蛋白质分子直接连接或者通过合适的连接基间接连接在一起。用于该目的说明性的蛋白质的分子量介于约 30kD 至约 100kD 之间，优选介于约 40kD 至约 80kD 之间，更优选约 60kD。说明性的蛋白质是血清白蛋白，例如牛血清白蛋白(BSA)或人血清白蛋白(HSA)。包括合适片段及其衍生物在内的说明性白蛋白讨论如下。通过包括凝胶电泳在内的标准方法测定分子量。如有必要，与睾酮连接的蛋白质本身是可检测的，例如 GFP。

本发明的其它雄激素公开于美国食品和药品管理局(U.S. Food and Drug Administration, USFDA)的网站上。具体地讲，EKDB (Endocrine Knowledge Disrupter Base)给出了经报告具有雄激素活性

(和/或雌激素活性)的约 2000 种天然和合成化合物的特性。数据包括测定这些活性的生物学测定。另见 Fang, H.等(2003) *Chem. Res. Toxicol.* 16: 1338, 综述了雄激素和用于检测雄激素的计算机分析方法。

本文公开的许多合适对照测定所用的优选雄激素是睾酮或 DHT。然而,可以理解,其它的雄激素,尤其是睾酮衍生物(例如甲雌三烯醇酮)可用于一种或多种这样的测定。一般而言,因为 DHT 是天然 AR 配体,所以会选择它。

正如所讨论的,本发明的一个目的是检测和任选鉴定能结合 mAR 的结合剂,例如受体结合配体。通常这样的结合剂是 mAR 激动剂。对于“膜雄激素受体”包括其多种形式和缩写形式,例如“mAR”表示“快速”发挥雄激素介导效应的雄激素敏感性受体,所谓快速的意思是在 3 小时之内、优选在约 1 小时至约 2 小时之内、更优选在 1 小时内、还更优选在约几分钟(例如 1 或 2 分钟)至约 30 分钟之内。参见 Kampa, M. E. Castanas (2006), 出处同上, (综述了各种可接受的 mAR 测定)。

例如,在一种 mAR 结合剂检测模式中,可以检测肌动蛋白重组构、胞内钙释放或 PSA 释放中的一个或多个,以便在约几分钟至约 3 小时内鉴定可结合 mAR 的结合剂。认为与 mAR 的结合是与“快速”效应有联系的,包括钙动员、分泌和肌动蛋白重组构。在某些细胞、细胞系和组织中,已经报道了检测和分析 mAR 的其它方法。参见例如 Porto, C.S.等(1995)载于 *Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53: 561。

至于“组织”是指在生物体中行使特定功能的细胞聚集体。本文所用的术语“组织”是指来自特定生理区的细胞材料。特定组织内的细胞可包含几种不同的细胞类型。一个非限制性实例就是前列腺和周围组织,还包括例如神经元、以及毛细血管内皮细胞和血细胞,全都包含在给定的组织部分或样品中。除了实体组织外,术语“组织”也包括非实体组织,例如血液和淋巴。

鉴定能表达 mAR 的细胞、细胞系和组织的优选方法包括使其与

特定的甾酮衍生物接触，其中甾酮衍生物的甾体环与大分子相连接。这样的分子设计极大地增加了雄激素的分子量。在这种情况下，经典胞内雄激素膜受体(iAR)阻止甾体内化。在更具体和合适的方法中，用带有可检测标记的甾酮-血清白蛋白缀合物作为探针，来鉴定 mAR。参见例如 Kampa, M.E.和 Castanas (2006), 出处同上; Hatzoglou, A.等 (2005), 出处同上; Kampa, M.等(2002), 出处同上; Stathopoulos, E.等 (2003), 出处同上(其公开内容涉及这类 mAR 探针的制备和使用)。

另见 Dambaki, C. 等 (2005) *BMC Cancer*, 5: 148; 以及 PCT/IB03/02785, 美国专利公布号 20050245442 和希腊专利申请号 20020100335 (E. Castanas, University of Crete Medical School (Heraklion, Greece)))。用于检测和表征 mAR 的优选甾酮血清白蛋白缀合物是甾酮-BSA (Test-BSA)。

至于使用合适方法之一或其组合，可以检测不同细胞和组织(例如前列腺癌组织、前列腺癌 LNCaP 细胞、DU-145 前列腺癌细胞和人乳癌细胞系 T47D)中的 mAR。参见 Kampa 等(2005), 出处同上; Kampa 等(2002); 出处同上; 和 Hatzoglou 等(2005), 出处同上。相比之下，认为某些组织样品例如非肿瘤和增生细胞表达低水平或几乎不可检测水平的 mAR。Stathopoulos 等(2003), 出处同上。已经报道，LNCaP 细胞表达 mAR 和 iAR 受体分子，而 DU-145 细胞系仅表达 mAR (即 iAR 无法检出)。

用这些和相关方法检测 mAR，可筛选几乎任何所需细胞、细胞系或组织样品，看 mAR 是否存在。检测到 mAR 的样品可用于本文所述的方法。例如，在一个实施方案中，LNCaP、T47D 或 DU-145 细胞系用作 mAR 的来源。在使用表达 mAR (而不是 AR)的细胞的实施方案中，特别优选使用 DU-145 细胞系。合适的细胞、细胞系和组织样品可得自各种来源，包括德国微生物和细胞培养物保藏中心(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures, Braunschweig, Germany) 和美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)

(Manassas, VA)。

筛选用于检测 mAR (或 AR) 存在与否的细胞的实例包括合适的真核细胞类型, 例如所有种类的肿瘤细胞(尤其是黑素瘤、骨髓性白血病、肺癌、乳癌、卵巢癌、结肠癌、肾癌、前列腺癌、胰腺癌和睾丸癌)、心肌细胞、内皮细胞、上皮细胞、淋巴细胞(T 细胞和 B 细胞)、肥大细胞、嗜酸性粒细胞、血管内膜细胞、肝细胞、白细胞包括单核白细胞、干细胞(例如造血干细胞、神经干细胞、皮肤干细胞、肺干细胞、肾干细胞、肝脏干细胞和肌肉干细胞)(用于筛选分化和去分化因子)、破骨细胞、软骨细胞和其它结缔组织细胞、角质细胞、黑素细胞、肝细胞、肾细胞和脂肪细胞。其它合适的细胞包括 Jurkat T 细胞、NIH3T3 细胞、CHO、COS 等。参见 ATCC 细胞系目录表。

正如所讨论的, 本发明的一个目的是提供可以检测和任选鉴定可激活 mAR 的受体配体的方法。优选的实践包括在允许 mAR 与雄激素化合物结合的条件下, 使 mAR 接触带有可检测标记的雄激素化合物(例如可结合 AR 的 ^3H -DHT 或其它合适的睾酮衍生物), 形成第一复合物。然后, 在允许所述调节剂与 mAR 之间结合的条件下, 使第一复合物与所述调节剂接触, 形成第二复合物。优选检测自第一复合物中释放的带有可检测标记的雄激素化合物, 并将其作为所述调节剂存在的标志。

至于术语“允许 mAR 与调节剂结合的条件”包括一种或多种条件, 是指通常能促进睾酮、DHT 或睾酮衍生物例如睾酮 3-(O-羧甲基)肼:BSA 与 mAR 结合的条件。这样的条件包括在例如睾酮 3-(O-羧甲基)肼:BSA 与 mAR 结合时的温度、盐浓度、pH 和蛋白质浓度。准确的结合条件因测定方法的性质不同而异, 例如在测定中是使用活细胞还是仅使用细胞膜部分。然而, 因为 mAR 是细胞表面蛋白, 有利条件通常包括生理盐(约 90mM)和 pH (约 7.0-8.0)。结合温度为 15°C 至 37°C, 但优选介于室温至约 30°C 之间。待测调节剂(结合剂)浓度也不同, 但优选为约 0.01nM 至 100 微摩尔浓度。

本文所用的术语“膜部分”是指包含 mAR 或 AR 的细胞脂质膜的制备物。本文所用的术语“膜部分”不同于细胞均质物，其区别在于至少去除了部分(即至少 10%和优选更多)不与膜缔合的细胞组分。术语“与膜缔合”是指可整合到脂质膜上或与整合到脂质膜的组分物理缔合的细胞组分。

已经报道了配体与 mAR 受体结合的更具体的条件。参见 Hatzoglou 等(2005) *J. Clin. Endocrinol Metab.* 90: 893; 和 Kampa, M. 等(2002), 出处同上; 其中每篇参考文献都介绍了 DHT、睾酮和睾酮 3-(O-羧甲基)肼:BSA 缀合物与 mAR 结合的具体条件。

因此,对于术语“允许 AR 与调节剂结合的条件”包括类似术语,都是指通常允许 mAR 与睾酮、DHT 或睾酮 3-(O-羧甲基)肼:BSA 结合的条件。

对于术语“带有可检测标记的雄激素”是指包含至少一种以下部分的雄激素:放射性同位素、荧光团、荧光猝灭剂、酶、亲和标记或化学发光部分、发磷光部分或发色部分。可检测标记可存在于雄激素甾体环上(例如在 1、3、7、11 和 15 碳位置中的一个或多个位置上)或可出现在另一基团上,例如在连接基或者与雄激素或连接基结合的氨基酸序列上。这类连接基的实例是通过使用羧基二酰亚胺与甾体环连接的羧基-甲基醚部分。更具体的连接基包括肼基。举例来说,带有可检测标记的雄激素包括睾酮肼和睾酮血清白蛋白缀合物,其中一个或多个可检测标记与合适的肼连接基或者与连接基连接的氨基酸序列结合。参见例如 PCT/IB03/02785、美国专利公布号 20050245442 和希腊专利申请号 20020100335 中有关制备和使用这些具体雄激素的更多信息。

i. 测定的检测方式

已经报道了用于本发明的各种可检测标记。一般性参见 W.T. Mason, 载于 *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity: A*

Practical Guide to Technology For Quantitative Real-Time Analysis, 第2版(Academic Press, 1999)。用于标记氨基酸序列的示例性标记包括荧光素、罗丹明红、FITC 和俄勒岗绿(Oregon green)。各种其它合适的荧光探针、发光探针和产色探针可得自 InVitrogen (1600 Faraday Avenue, Carlsbad, CA 92008 (USA))。

额外荧光标记的使用在本发明的范围之内。

例如, 荧光素、罗丹明、四甲基罗丹明、伊红、赤藓红、香豆素、甲基-香豆素、芘(pyrene)、孔雀石绿(Malachite green)、芪(stilbene)、荧光黄(Lucifer Yellow)、Cascade Blue.TM.、德克萨斯红(Texas Red)、IAEDANS、EDANS、BODIPY FL、LC Red 640、Cy 5、Cy 5.5 和 LC Red 705。合适的荧光染料可参见 1996 Molecular Probes Handbook (Richard P. Haugland), 通过引用结合到本文中。合适的荧光标记也包括但不限于绿色荧光蛋白(GFP; Chalfie 等, Science 263(5148):802-805 (1994 年 2 月 11 日); 和 EGFP; Clontech—Genbank 检索号 U55762)、蓝色荧光蛋白(BFP; 1. Quantum Biotechnologies, Inc. 1801 de Maisonneuve Blvd. West, 8th Floor, Montreal (Quebec) Canada H3H 1J9; 2. Stauber, R. H. Biotechniques 24(3):462-471 (1998); 3. Heim, R. 和 Tsien, R. Y. Curr. Biol. 6:178-182 (1996))、增强型黄色荧光蛋白(EYFP; 1. Clontech Laboratories, Inc., 1020 East Meadow Circle, Palo Alto, Calif. 94303)、萤光素酶(Ichiki 等, J. Immunol. 150(12):5408-5417 (1993))、 β -半乳糖苷酶(Nolan 等, Proc Natl Acad Sci USA 85(8):2603-2607 (1988 年 4 月))和 Renilla WO 92/15673; WO 95/07463; WO 98/14605; WO 98/26277; WO 99/49019; 美国专利号 5,292,658; 美国专利号 5,418,155; 美国专利号 5,683,888; 美国专利号 5,741,668; 美国专利号 5,777,079; 美国专利号 5,804,387; 美国专利号 5,874,304; 美国专利号 5,876,995; 和美国专利号 5,925,558)。

因此, 在本发明的一个实施方案中, 雄激素(例如睾酮)与荧光实体(例如 GFP 蛋白或其可检测片段)连接起来。在该实例中, GFP 得自

海肾(renilla)、海笔(ptilosarcus)或水母(aequorea)的 GFP。

本发明的某些实施方案的额外的合适标记包括: Alexa-Fluor 染料 (Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680)、Cascade Blue、Cascade Yellow 和 R-藻红蛋白 (R-phycoerythrin) (PE) (Molecular Probes) (Eugene, Oreg.)、FITC、罗丹明和德克萨斯红 (Pierce, Rockford, Illinois)、Cy5、Cy5.5、Cy7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, Pa.)。Cy5PE、Cy5.5PE、Cy7PE、Cy5.5APC、Cy7APC 的串联缀合方案可参见 drmr.com/abcon。可以对荧光探针缀合进行定量检测,以确定标记程度,包括染料光谱特性在内的方案可参见 metazoa.com/UPL3419。

在本发明的一个实施方案中,雄激素直接或间接(例如通过连接基)地用第二可检测标记来进行可检测标记。第二标记是间接测定的标记;例如,可与第一标记结合或反应而用于检测的第二标记,可以在额外产物上发生反应,以产生第一标记(例如酶)等。第二标记包括但不限于结合配偶体对之一;化学修饰部分;核酸酶抑制剂、酶例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、萤光素酶(luciferases)等。

举例来说,第二标记是结合配偶体对。例如,标记可以是能与其结合配偶体结合的半抗原或抗原。例如,合适的结合配偶体对包括但不限于抗原(例如蛋白质(包括肽)和小分子)和抗体(包括其片段(FAb 等));蛋白质和小分子,包括生物素/链霉抗生物素;酶和底物或抑制剂;其它蛋白质-蛋白质相互作用对;受体-配体;和碳水化合物及其结合配偶体。优选的结合配偶体对包括但不限于生物素(或亚氨基-生物素)和链霉抗生物素和地高辛。

在本发明的另一个实施方案中,第二标记是经化学修饰的部分。在该实施方案中,包含活性官能团的标记结合到有待标记的分子(通常是雄激素)上。可将官能团直接加到甾体环上或通过合适的连接基或蛋白质基团(例如血清白蛋白(包括其片段))间接加到甾体环上。随后(例

如在测定前后)用第一标记来标记该官能团。合适的官能团包括但不限于氨基、羧基、马来酰亚胺基、氧代基和巯基,其中特别优选氨基和巯基。例如,含氨基的第一标记可与包含氨基的第二标记相连接,例如使用本领域已知的连接基;例如,众所周知的同双官能或异双官能连接基(参见 1994 Pierce Chemical Company 目录,交联剂的技术部分,第 155-200 页,通过引用结合到本文中)。

本发明的方法和组合物也可使用标记酶。标记酶是指在标记酶底物存在下可发生反应而产生可检测产物的酶。本发明所用的合适标记酶包括但不限于辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和葡萄糖氧化酶。用于这类底物的方法是本领域众所周知的。标记酶的存在通常可表明,通过该酶催化的与标记酶底物的反应,产生可鉴别的产物。这类产物可以是不透明的,例如辣根过氧化物酶与四甲基联苯胺的反应,也可以具有各种颜色。已经开发出能产生荧光反应产物的其它标记酶底物,例如鲁米诺(得自 Pierce Chemical Co.)。用标记酶底物鉴定标记酶的方法是本领域众所周知的,可使用多种市售试剂盒。用于各种标记酶的实例和方法可参见 Savage 等, *Previews* 247:6-9 (1998), Young, J. *Virology Methods* 24:227-236 (1989), 所述各文献通过引用全部结合到本文中。

已经描述了检测标记酶和其它可检测标记的各种合适方法。参见 Harlow 和 Lane, 载于 *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988) 及其中引用的参考文献(夹心测定等)。例如,在一个实施方案中,可检测标记是生物素或 DNP,其中采用标准抗体检测方法检测生物素部分。或者,可检测标记是一种或多种放射性同位素,例如氘、氚或碳-14。一种说明性的放射性标记的雄激素化合物是(^3H -DHT)或氚化睾酮(^3H -T)。例如,一种具体的氚化睾酮化合物是睾酮-[1,2,6,7- ^3H] (得自 New England Nuclear, Beverly MA (USA))。用于本发明的使雄激素氚化的方法是已知的,包括例如常规同位素交换反应。其它合适的放射性同位素包括 ^{14}C 、 ^{125}I 和 ^{131}I 。

可通过例如抗体来间接检测可检测标记。也就是说,抗体可直接

检测雄激素化合物或者通过与雄激素化合物结合的标记来间接检测。标记通常是抗体的结合配偶体。在实施方案中使用这样的抗体的合适结合对包括但不限于地高辛配基/抗地高辛配基、二硝基苯基化合物(DNP)/抗 DNP、丹磺酰-X-抗丹磺酰、荧光素/抗荧光素、萤光黄/抗萤光黄,以及罗丹明/抗罗丹明、生物素/抗生物素(或生物素/链霉抗生物素)和钙调蛋白结合蛋白(CBP)/钙调蛋白。其它合适的结合对包括多肽,例如 FLAG-肽[Hopp 等, *BioTechnology*, 6:1204-1210 (1988)]; KT3 表位肽[Martin 等, *Science*, 255:192-194 (1992)]; 微管蛋白表位肽[Skinner 等, *J. Biol. Chem.*, 266:15163-15166 (1991)]; 和 T7 基因 10 蛋白肽标记[Lutz-Freyermuth 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6393-6397 (1990)]及其各自的抗体。

可用于检测性标记本发明的雄激素化合物的其它合适的“标记”包括多聚组氨酸(poly-his)或多聚组氨酸甘氨酸(poly-his-gly)标记和镍底物; 谷胱甘肽-S 转移酶标记及其抗体底物(得自 Pierce Chemical); 流感 HA 标记多肽及其抗体 12CA5 底物[Field 等, *Mol. Cell. Biol.*, 8:2159-2165 (1988)]; c-myc 标记及其 8F9、3C7、6E10、G4、B7 和 9E10 抗体底物[Evan 等, *Molecular and Cellular Biology*, 5:3610-3616 (1985)]; 和单纯疱疹病毒糖蛋白 D (gD)标记及其抗体底物[Paborsky 等, *Protein Engineering*, 3(6):547-553 (1990)]。当标记也为多肽时,通过重组方法产生标记-多肽的介绍如下。带有标记的蛋白质的制备方法是本领域众所周知的,这类制备方法所用的试剂盒是市售的(例如来自 Kodak 和 Sigma)。带有标记的蛋白质的实例包括但不限于 Flag-多肽和 His-多肽。制备和使用带标记的蛋白质的方法可参见例如 Winston 等, *Genes and Devel.* 13:270-283 (1999), 通过引用全部结合到本文中,以及上述试剂盒所提供的产品手册。

本发明的某些可检测雄激素化合物可经生物素化。靶分子和底物的生物素化是众所周知的,例如,大量生物素化试剂是已知的,包括胺活化剂和硫醇活化剂,用于蛋白质、核酸、碳水化合物、羧酸的生

物素化；参见 *Molecular Probes Catalog*, Haugland, 第 6 版, 第 4 章, 1996, 通过引用结合到本文中。生物素化底物可通过抗生物素或链霉抗生物素而与生物素化组分连接在一起。同样, 各种半抗原化试剂也是已知的(出处同上)。

用放射性同位素标记蛋白质的方法是本领域众所周知的。例如, 这类方法可参见 Ohta 等, *Molec. Cell* 3:535-541 (1999), 所述文献通过引用全部结合到本文中。

通过重组方法制备带有标记的蛋白质的方法是众所周知的, 制备这类蛋白质的试剂盒是市售的。例如, 这类试剂盒及其应用可参见 Joanne Crowe 等, *QIAexpress Handbook* from Qiagen, 通过引用结合到本文中。因此, 在一个实施方案中, 经重组表达的血清白蛋白具有一个或多个标记。可使用标准方法, 将这类经修饰的白蛋白直接或通过合适连接基与雄激素连接。

至于术语“带有可检测标记的雄激素化合物的释放”是指, 相对于合适对照而言(例如在某调节剂不存在时的释放), 在特定测定中, 由于存在该调节剂, 而在雄激素化合物的释放中检测到释放增加。相对于没有添加调节剂的对照而言, 优选释放至少高约 20%, 优选至少高约 50%, 更优选至少高约 80%、约 90%或约 95%或更高。在该实施方案中, 该调节剂是潜在的 mAR 激动剂, 该调节剂可以按照本发明进行分离、鉴定并进行进一步测定。

下文 A-E 段落描述了检测和定量检测调节剂(例如调节剂文库)调节(增加或降低) mAR 功能的能力的优选方法。

至于“mAR 功能”是受体调节(增加或降低)一种或多种以下功能的能力: 调节本文所限定的信号分子、PSA 分泌、调节钙流量和细胞骨架重组。优选地, 在与合适化合物调节剂(例如 DHT)接触后, 在 3 小时之内, 优选在约几分钟至约 1 小时之间, 更优选在约几分钟至 30 分钟之间, 对其功能进行监测。

A. 膜雄激素受体(mAR)结合

可定量检测带有可检测标记的雄激素的释放,例如以证实调节剂的激动剂活性和/或测定该活性的强度。因此,在一个实施方案中,以下具体的 mAR 结合测定可用于确定所述调节剂的 K_d 。

首先,将合适的表达 mAR 的细胞(例如 DU-145 细胞)在无血清培养基中大约培养 1-2 天。用该细胞进行以下一个或两个测定:(1) mAR 饱和分析,确定氚化 DHT 的 K_d ,或(2)竞争性结合测定,评价调节剂与 DHT 竞争性结合 mAR 的能力。在以下讨论中举例说明这类测定。

在无血清培养基中培养后,使 DU-145 细胞接触含有饱和量的带有可检测标记的 DHT (例如 ^3H -DHT)的培养基,其含量通常范围为 0.05nM 至约 20nM,其中含有或不含(总结合) 100 倍过量的未标记 DHT。对于竞争性测定,将含有约 0.1nM 至约 1nM ^3H -DHT 的细胞培养基和多种待测调节剂中的一种(浓度范围 10^{-10}M 至 10^{-5}M)加入到细胞中。优选每个样品一式三份。在 37°C 孵育约 5 小时后,优选约 3-4 小时后,将各浓度 ^3H -DHT 的总结合培养基取出一份,测定游离 ^3H -DHT 的含量。取出剩余培养基,洗涤细胞,去除任何未结合的调节剂,用曲通-X-100 (Triton X-100)裂解细胞。用标准闪烁计数器测定裂解物中结合 ^3H -DHT 的含量。常规测定任何非特异性结合。

如有必要,可以用 LNCaP 等其它合适的细胞或者用表达 mAR 的其它合适的细胞进行所述测定。

i. mAR 饱和分析

对于饱和分析,将总结合与非特异性结合之间的差异标准化。可以通过标准 Scatchard 分析评价特异性 mAR 受体结合,以确定 ^3H -DHT 的 K_d 。可以理解,Scatchard 分析是根据饱和结合实验以求出结合常数(K_d)的线性化数据方法。可绘制特异性结合/游离放射性配体浓度(Y轴)对于特异性结合(X轴)的“第二”曲线图。参见例如 Robard, D. 载于 *Ligand Assay*, J. Langon 和 JJ. Clapp (编著) (Masson Publishing

U.S.A.), 第 45-99 页(1981)。

具体的目标调节剂的 K_d 小于约 1 微摩尔浓度, 优选介于约 0.01nM 至约 0.1 微摩尔浓度之间, 更优选介于约 0.1nM 至约 50nM 之间。

ii. mAR 竞争性分析

对于受体竞争性研究, 可以按照给定调节剂的剂量反应曲线范围内的 ^3H -DHT 含量(在调节剂不存在时的%对照), 将数据作图。在竞争性受体配体不存在时, 使用标准方法可定量测定抑制 50%的 ^3H -DHT 结合量的任何调节剂浓度(称为 IC_{50})。参见例如 Robard, D. (1981), 出处同上; 和 PCT/US2004/027483。当对于任何非特异性结合进行校正后, 可得到 IC_{50} 值。 IC_{50} 值在本文中定义为减少结合约 50% 所需的竞争性调节剂的浓度。

具体的目标调节剂的 IC_{50} 小于约 1 微摩尔浓度, 优选介于约 0.01nM 至约 0.1 微摩尔浓度之间, 更优选介于约 0.1nM 至约 20nM 之间。

B. 膜雄激素受体(mAR)信号分子的检测

正如所讨论的, 本发明的一个目的是检测 mAR 受体活性的调节剂。可在受体结合水平上或在这样的结合之后(称为 mAR 的“下游”活化), 检测这样的活性。已经报道了一些下游 mAR 信号分子, 包括黏着斑激酶(FAK)、磷脂酰肌醇-3 (PI-3)激酶、细胞分裂周期 42 (cdc42) 和 ras 相关 C3 肉毒杆菌毒素底物 1 (Rac 1) 分子中的至少一种和优选全部。对该特定途径的活化, 导致快速肌动蛋白细胞骨架重排(例如控制细胞增殖、分泌和运动)。参见 Papakonstanti, E. 等 (2003) *Mol. Endocrinology* 17:870。

最近, 肌动蛋白细胞骨架重组已经作为 mAR 活化的一个重要结果。参见 Papadopoulou, N.D. 等 (2004), 56th Meeting of HSBMB (Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology), 2004 年 11 月

25-27 日, Larissa, Greece。

在细胞膜的水平上开始非基因组雄激素效应。这表明例如特异性分泌和信号转导机制(不同于 iAR 下游那些)。雄激素膜结合位点(即 mAR)存在于 LNCaP 人前列腺细胞内。

根据本说明书,显而易见的是,可以通过使细胞接触睾酮-BSA 而激活 DU-145 细胞的 mAR。这样的接触明显地诱导肌动蛋白重塑,接着是细胞迁移、粘附和侵入的减少。也表明,这些效应是通过下游信号转导途径的活化而诱导的,所述途径的活化包括 Ras 同源基因家族成员 AB (RhoA/B)、Rho 相关卷曲螺旋激酶(ROCK)和含有 LIM-基序的激酶(LIMK2)中的至少一个和优选全部。该途径的活化诱导信号转导和肌动蛋白重组。该途径不是在 LNCaP 细胞内激活的。睾酮-BSA 诱导 LNCaP 和 DU145 细胞的细胞凋亡,这是由肌动蛋白细胞骨架重组所调节的效应。另外,与对照动物相比,接种 LNCaP 的裸鼠的体内实验表明,用睾酮-BSA (8mg/kg 体重)处理 1 个月导致 60% 肿瘤尺寸减小。用抗雄激素氟他胺不能观察到该结果。在对照动物中没有观察到明显的毒性效应。该实例表明, mAR 的活化可诱导前列腺癌细胞凋亡性消退。

因此,在本发明的一个实施方案中,上述调节剂检测方法之一或其组合还可包括检测 mAR 的信号分子下游的调节的步骤。“下游”是指特定分子处于负责 mAR 活化的生化途径中。优选的这类方法还包括,相对于合适对照(例如不加调节剂的对照)而言,检测信号分子水平的变化的步骤。对信号分子调节的检测步骤可包括例如测定至少一种以下活性(即增加或降低): 鸟嘌呤核苷酸结合或交换、激酶活性、鸟苷三磷酸酶活性、磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol)分解、二酰基甘油、肌醇三磷酸、肌动蛋白重组、报道基因表达和胞内钙水平。优选的激酶是黏着斑激酶(FAK)或磷脂酰肌醇-3 (PI-3)激酶。这样的方法还包括检测 FAK 与磷脂酰肌醇-3 (PI-3)激酶缔合的步骤。一种具体的鸟苷三磷酸酶是 Cdc42/Rac1。

已经报道了检测这些和其它信号分子中的某些信号分子的免疫学方法。参见 Papakonstanti, E.等(2003), 出处同上; 和 Papadopoulou, N.D.等(2004); 出处同上。通常, 这些方法包括已建立的免疫沉淀、激酶和免疫印迹类检测模式。

C. mAR 对胞内钙的调节

已经报道, 睾酮结合对 mAR 的总效应是快速的, 在几秒钟之内就可增加胞内钙。参见 Kampa 等(2004), 出处同上; 和 Kampa 和 Castanas (2006), 出处同上。已经报道, 这样的增加对 G 蛋白受体拮抗剂、百日咳毒素敏感, 表明 G-蛋白偶联受体。这在缺乏 AR 的细胞中也可观察到, 并且不受抗雄激素(例如醋酸环丙孕酮或氟他胺)的影响。这表明了其中有非经典受体介导作用。另见 Gong 等(1995) *Endocrinology* 136: 2172。

因此, 在一个实施方案中, 上述检测 mAR 调节的方法之一或其组合可与检测和任选定量检测胞内钙增加的常规试验结合使用。合适的试验实例可参见例如 Kampa 等(2004), 出处同上。其它合适试验通常使用钙探针、钙探针的抗体、钙离子载体和钙螯合剂中的至少一种, 来检测胞内钙的变化。参见 Sigma-Aldrich Catalogue Book, 题目是 *Cell Signaling & Neuroscience* (2002-2003), 尤其是第 482-498 页, 有关使用这类材料来检测和测定钙水平的公开内容。示例性的方式包括使用 Arsenazo III、Fluo 3、Fluo-3am、Fura2, 作为胞内钙增加(或减少)的可检测指示剂。

因此, 在一个实施方案中, 在 mAR 接触一种或多种调节剂后, 检测合适的细胞、细胞系或组织样品(例如 DU-145 或 LnCaP 细胞)的胞内钙水平。相对于合适对照(例如在没有调节剂的条件下孵育)而言, 胞内钙水平的任何提高都可作为 mAR 调节剂的标志。通过上述标准测定之一或其组合的测定, 相对于没有调节剂的对照而言, 优选的调节剂将会提高胞内钙水平至少约 20%、优选至少约 50%、更优选至少

约 90%、95%、100%至约 300%、500%、至约 1000%。

D. 前列腺特异性抗原(PSA)的调节

已经报道,对 mAR 的刺激伴有 PSA 的分泌。参见 Kampa, M 等(2002), 出处同上。具体地讲,在用细胞松弛素 B 预处理后,可抑制分泌。因此,上述检测 mAR 调节剂的方法之一或其组合还可包括对测定中所用细胞、细胞系或组织所分泌的 PSA 水平变化的检测试验。在一个实施方案中,这样的试验还包括,相对于合适对照(例如不加入调节剂)而言,检测由细胞、细胞系或组织样品表达的任何 PSA 的步骤。合适的细胞、细胞系和组织样品已知或怀疑表达 mAR、iAR 或这两者。

检测 PSA 的具体方法依赖于常规免疫学方法。在一个实施方案中,通过使所分泌的 PSA 接触能特异性结合 PSA 的抗 PSA 单克隆抗体,来测定 PSA。可用各种可接受的模式来进行这类测定,例如通过使用直接检测或夹心测定模式。已报道对 PSA 具有反应性的各种合适抗体可得自 ATCC。

相对于没有调节剂的合适对照测定而言,按照上述 PSA 测定的具体目标调节剂将会提高 PSA 分泌水平至少约 20%、优选至少约 50%、更优选至少约 90%、95%、100%至约 200%或 300%。优选用合适免疫试剂之一或其组合(例如已知能结合 PSA 的单克隆抗体或多克隆抗体),来测定 PSA。

E. 膜雄激素受体(mAR)对细胞凋亡的调节

已经报道, mAR 的活化在体外和体内都会导致前列腺癌细胞的凋亡性消退。Hatzoglou, A.等(2005); 出处同上。因此,上述检测 mAR 调节的方法之一或其组合还可包括检测测定所用的细胞、细胞系或组织中细胞凋亡水平变化的步骤。因此,在一个实施方案中,调节剂的检测方法还包括检测能表达 mAR 的细胞、细胞系或组织样品中的细

胞死亡(细胞凋亡)的步骤。相对于合适对照(例如在没有调节剂条件下进行的测定)而言,优选本发明的调节剂增加测定所用的细胞、细胞系和组织中的细胞凋亡水平。

已经报道了检测和定量检测细胞凋亡的各种合适的测定,包括免疫测定、染料介导的测定和细胞计数测定。参见 Hatzoglou, A.等(2005); 出处同上。已经公开了其它合适的测定,例如 Sigma-Aldrich Catalogue Book, 题目是 *Cell Signaling & Neuroscience* (2002-2003), 特别是第 17-98 页。因此,在本发明的一个实施方案中,可通过测定膜联蛋白、可检测小分子以及凋亡或促凋亡蛋白中的至少一种,来检测细胞凋亡。其实例包括 BCL-2、BCL-X、胱冬蛋白酶 9、Apaf-1 等。

优选的本发明实践包括进行一个或多个与所需细胞、细胞系或组织样品的接触步骤,所述细胞、细胞系或组织样品已知或怀疑表达 mAR。因此,在一个实施方案中,本发明包括用于检测合适的 mAR 受体配体的方法,其中例如 DU-145 细胞用作 mAR 的来源。或者, LNCaP 或前列腺组织用作 mAR 的来源。根据所选的测定模式,可以完整细胞或组织或亚细胞部分(通常是膜部分)形式来提供 mAR。

根据上述细胞凋亡测定,相对于合适对照测定(例如没有调节剂的对照测定)而言,具体目标调节剂将会提高细胞死亡水平至少约 20%、优选至少约 50%、更优选至少约 90%、95%、100%至约 200% 或 300%。

下文 F-G 段落描述了用于检测和定量检测一种或多种调节剂(例如调节剂文库)调节(增加或降低)AR 的能力的示例性方法。

F. 检测 AR 调节的对照测定(体外)

正如所讨论的,在本发明的许多实施方案中,进行对照测定之一或其组合,来检测和任选定量检测调节剂增加或降低 AR 功能的能力,这是有用的。在一个实施方案中,使合适的 AR 表达细胞、细胞系或组织样品接触调节剂,以鉴定其活性,如果有的话。已经报道,许多

体内组织(例如雄性生殖组织(包括前列腺和附件组织)、雌性生殖组织、某些 CNS 组织以及某些骨细胞和肌肉细胞)表达 AR。认为 AR 通常对内源雄激素配体睾酮和 5- α -二氢睾酮敏感。公认 AR 由 3 个功能结构域组成: 配体结合结构域、DNA 结合结构域和氨基端结构域。参见例如 Caplan 等(1995) *J. Biol. Chem.* 270: 5251; Fliss 等(1999) *J. Biol. Chem.* 274: 34045; 和 Fang 等(1996) *J. Biol. Chem.* 271:28697; 及其中引用的参考文献。

与 AR 缔合(例如 AR 受体配体)并模拟天然 AR 配体的效应的调节剂在本文称为“AR 激动剂”, 而抑制天然配体效应的化合物则称为“AR 拮抗剂”。优选的本发明调节剂作为 AR 激动剂或拮抗剂没有或几乎没有活性, 当用本文公开的对照测定之一或其组合进行检测时。

已报道能表达 AR 的各种细胞系得自 ATCC (Manassas, VA (USA)), 例如 RBA、TRAMP-C2、DDT1 MF-2、RWPE-2 等。也已报道 MDA (MDA-MB-453) 细胞能表达内源 AR。参见 PCT/US2005/029592 及其中公开的参考文献。MDA 细胞在以下实施方案中特别优选: 在所述实施方案中, 对照测定是调节剂对 MDA AR 亲和力的放射性配体置换测定。参见 PCT/US2005/029592, 第 54-56 页。表达 AR 的另一种细胞系是 LNCaP。

一种重组人雄激素受体(hAR)可用于某些对照测定。在一个实施方案中, 在表达 hAR 的细胞上进行竞争性结合分析。这类细胞是已知的, 包括例如杆状病毒/Sf9 产生的 hAR 细胞及其提取物。或者, 可以使用已知能表达 AR 的其他细胞、细胞系和组织, 例如 MDA 细胞。参见 Sambrook 等, 载于 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第 2 版, 1989); 和 Ausubel 等(1989), *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 有关进行标准重组技术的讨论。

一旦获得能表达 AR (或 hAR)的合适细胞、细胞系或组织, 在不同浓度的调节剂存在或不存在的条件下, 在固定浓度的 ^3H -DHT 示踪

剂的存在下,进行结合。参见 Chang 等(1984) *J. Steroid Biochem.* 20: 11, 有关测定的一般性公开内容。简而言之,在 AR 或 hAR 提取物存在和不存在的条件下,将逐渐下降的调节剂浓度与例如羟基磷灰石(hydroxyapatite)和约 1nM ^3H -DHT 一起在 4°C 孵育约 1 小时。然后,洗涤结合反应物,除去过量标记。在化合物存在条件下测定 AR 或 hAR 结合的 ^3H -DHT 水平(竞争性结合),并与没有调节剂的结合(最大结合)进行比较。参见 Chang 等(1992) *PNAS* 89: 5546。对 hAR 的调节剂结合亲和性表示为最大结合的一半被抑制时的调节剂浓度(IC₅₀)。

已经报道了不同核酸,例如编码人雄激素受体的 cDNA。参见 Chang, CS. (1988) *Science* 240: 324。另见 National Library of Medicine (GENBANK)中有关其它合适序列,尤其是检索号 NM_001011645 下的那些。

本发明的具体调节剂在这些测定中没有活性或几乎没有活性。优选这样的调节剂表现出的 IC₅₀ 超过约 10 至约 1000 微摩尔浓度或更高。

i. 对雄激素应答元件(ARE)活化的检测

在某些对照实施方案中,在通常不表达受体的细胞(例如 COS 或 CV-1 细胞)中表达异源 AR (例如 hAR)是有用的。优选通过应用重组核酸技术进行瞬时表达 AR,从而表达 hAR。在一个方法中,在允许表达异源 AR 的条件下培养细胞,并接触具有调节 AR 潜力的化合物。监测 AR 的调控,可检测转染质粒构建体的活性变化,所述构建体包含可检测雄激素应答元件(ARE)。说明性的 ARE 包括雄激素应答基因启动子、雄激素应答基因增强子等。在监测“下游”ARE 活性的方法中,可以检测与 AR 结合的结合剂。

在 PCT/US2004/027483 (WO 2005/018573)所概述的一个方法中,按照以下文献所公开的材料与方法,转染合适的细胞(COS 或 CV-1): Berger 等, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* (1992) 41: 733。所用的构建体包含 pShAR (表达 AR)、MTV-LUC、pRS- β -GAL 和 pGEM (填充 DNA)。

受体质粒 pRShAR 含有处于 SV-40 启动子的组成型控制之下的人 AR。参见 Simental 等, *J. Biol. Chem.* (1991) 266:510。报道基因构建体 MTV-LUC 含有编码处于小鼠乳腺肿瘤病毒(MTV)长末端重复序列控制之下的萤火虫萤光素酶(LUC)的 cDNA, 该重复序列是包含雄激素应答元件的条件型启动子。参见 Berger 等, 出处同上。另外, 也可包含编码大肠杆菌 β -半乳糖苷酶组成型表达的 pRS β -GAL, 作为内部对照。

转染后, 从转染细胞中除去培养基, 洗涤细胞。然后向细胞中加入含有本发明调节剂的培养基。可以使用任何可接受的调节剂浓度, 例如 10^{-12} M 至 10^{-5} M 的范围。将细胞在培养基中孵育约 2-3 天、优选约 2 天之后, 洗涤细胞, 用曲通 X-100 (Triton X-100)或另一合适的去污剂裂解细胞, 用标准方法测定 LUC 和 β -GAL 活性。有关该具体测定的更多公开内容, 包括应用 AR 拮抗剂(2-OH-氟他胺)和 AR 激动剂(DHT)的阳性对照, 可参见 PCT/US2004/027483 专利申请。

本文提到的“MTV-ARE 测定”是指 PCT/US2004/027483 申请中公开的测定。当与一个或多个合适的对照进行比较(例如相对于测定中的 DHT 活性而言)时, 本发明优选的调节剂在 MTV-ARE 测定中表现出没有或几乎没有活性。

另见 Panomic, Inc. (6519 Dumbarton Circle, Fremont CA (USA))中有关报道基因构建体(载体)的一览表, 所述构建体也可用于检测和任选定量检测 ARE 活性(例如 pAR-LUC 就是一个这样的载体)。使用这样的载体的说明书可得自该公司。

G. 检测 AR 调节的对照测定(体内)

对于本发明的某些用途, 研究调节剂在体内调节 AR 的潜力是有用的。重要的是, 使用一种调节剂(或调节剂文库)进行多种检测测定(例如体外和/或体内测定的组合), 将会提高检测的选择性和灵敏度。

这样的广谱试验提供额外的优势。因此, 例如, 本发明的体外测

定可有效进行多种分析,因此能提高鉴别具有潜在治疗活性的调节剂的效率和概率。这在需要试验大量调节剂时尤其有用。例如可以通过标准合成方法,制备潜在 mAR 结合配体和其它调节剂的文库,包括组合型化学操作,然后按照本发明进行试验。

因此,在一个实施方案中,上述方法之一或其组合还包括检测 iAR 在体内的任何活化的步骤。已经描述了检测 AR 调节的合适方法。参见例如 PCT/IB2005/002592 (WO 2006/024931); PCT/US2004/038859 (WO 2005/052118); PCT/2004/027483 (WO 2005/018573); PCT/2005/013775 (WO 2005/105091); PCT/US2005/029592 (WO 2006/026196); 和 PCT/IB2005/002592 (WO 2006/024931)中的一篇或多篇参考文献;及其中公开的参考文献。

在一个具体的实施方案中,在 PCT/US2005/029592 所公开的体内前列腺测定中对本发明的调节剂进行了试验。简而言之,年轻的性成熟大鼠接受了睾丸切除术(ORX)。皮下或口服给予大鼠一剂调节剂,例如约 0.1 微克/kg 至约 100 微克/kg、每日约 1-2 次,持续 1-2 周。此后,给前列腺腹侧部分和精囊分别称重。通过标准方法,评价所述调节剂抑制 ORX 所诱导的这些组织的损失程度。

因此,在一个实施方案中,上述体内方法还包括,在试验哺乳动物中,相对于合适对照而言,选择具有至少一种以下特性的调节剂:(1)前列腺重量没有或几乎没有增加;(2)体重没有或几乎没有增加;(3)体脂肪没有或几乎没有降低;和(4)骨密度没有或几乎没有增加。在本发明的实例中,该方法还可包括选择具有至少一种以上特性(作为所述调节剂存在的另一标志)的调节剂。

本文提到的“没有或几乎没有”信号或活性的检测,当用于描述合适对照中的结果之一或其组合时,是指在该测定中小于约 20%的 DHT 活性,优选在测定中小于约 10%的 DHT 活性,更优选小于约 5%、小于约 3%或小于约 1%的 DHT 活性。在上述对照测定之一或其组合中,本发明优选的调节剂将会表现出没有或几乎没有调节 AR 的能力。

本发明高度优选的调节剂是例如 mAR 受体配体, 其在 F 和 G 部分所描述的一个或多个对照测定中表现出无可检测的活性。相比之下, 这样的优选调节剂在以上 A-E 部分所描述的一个或多个测定中将会表现出基本活性。

具体对照测定的优选实践有时需要以分级分离、合成或半合成方式提供 mAR 和 iAR 中的至少一种。例如, 在一个实施方案中, iAR 呈合成脂质体组合物的形式。已经报道了制备所述组合物的方法。其它受体的实施方案包括提供病毒诱导出芽的膜, 其含有 iAR。参见 WO0102551 和 Mirzabekov 等, 2000。

本发明是灵活多变的, 可用于各种测定模式。因此, 在测试调节剂对调节 mAR 的能力的一个实施方案中, 来自细胞、细胞系或组织样品的亚细胞部分已知或怀疑表达 mAR 和/或 iAR。因此, 在一个实施方案中, 可以用能表达 iAR 的细胞的亚细胞部分, 优选细胞膜、细胞质或细胞核部分, 进行本文所述的对照测定。

可以使用一个或多个以下检测步骤, 来进行用于检测 mAR 和 iAR 调节的测定之一或其组合: 标记置换、表面等离子共振、荧光共振能量转移、荧光猝灭、荧光偏振、发光、化学发光、荧光、吸收和闪烁计数。对具体检测方式的选择取决于常规变量, 例如所选择的带有可检测标记的雄激素和所需测定灵敏度的程度。

H. 调节剂来源

本发明可用于检测和任选鉴定各种各样的调节剂。优选的调节剂包括肽、类肽、多肽、抗体或其抗原结合片段、脂质、碳水化合物、核酸、小分子; 或它们的组合。本文所用的术语“小分子”是指分子量小于 3000 道尔顿、优选小于 2000 或 1500、还更优选小于 1000、最优选小于 600 道尔顿的化合物。“有机小分子”是含碳小分子。

各种各样的集合都可以从中选出本发明的调节剂。试验所用的具体调节剂可包括在合成或天然化合物的大文库中。大量方法目前可用

于随机和直接合成基于糖、肽和核酸的化合物。合成化合物文库是市售的,得自多个公司,包括 Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, UK), Comgenex (Princeton, N.J.), Brandon Associates (Merrimack, N.H.) 和 Microsource (New Milford, Conn.)。稀有化学文库得自 Aldrich (Milwaukee, Wis.)。组合文库是可行的,可以制备之。或者,以细菌、真菌、植物和动物提取物形式存在的天然化合物文库可得自例如 Pan Laboratories (Bothell, Wash.)或 MycoSearch (NC), 或者可通过本领域众所周知的方法容易地制备。另外,通过常规化学、物理和生化方法,可容易地对天然和合成产生的文库和化合物进行修饰。

潜在调节剂的其它来源包括各种单体和低聚体黄烷醇、尤其是儿茶素、表儿茶素及其衍生物。参见 Nifli, A-P 等(2005) *Exp. Cell Res.* 309: 329。潜在调节剂的其他来源包括某些阿片类。参见 Kampa, M.等(2004) *Exp. Cell Res.* 294: 234。

或者,对于优先的 mAR 结合,可测试所述结合 AR 的小分子之一或其组合。参见例如 PCT/IB2005/002592 (WO 2006/024931); PCT/US2004/038859 (WO 2005/052118); PCT/2004/027483 (WO 2005/018573); PCT/2005/013775 (WO 2005/105091); PCT/US2005/029592 (WO 2006/026196); 和 PCT/IB2005/002592 (WO 2006/024931)。

在各种化学类型中可找到对本发明有用的调节剂。有用的化合物可以是有机化合物,即小的有机化合物。小的有机化合物的分子量大于 50、但小于约 2,500 道尔顿,优选小于约 750、更优选小于约 350 道尔顿。示例性的种类包括杂环、肽、糖类、甾体等。可以修饰化合物,以增强其功效、稳定性、药物相容性等。调节剂的结构鉴定可用于鉴定、产生或筛选额外的调节剂。例如,当鉴定出肽类调节剂时,就可以各种方式修饰它们以增强其稳定性,例如使用非天然氨基酸(例如 D-氨基酸、尤其是 D-丙氨酸),通过使氨基端或羧基端官能化,例如对于氨基,酰基化或烷基化,而对于羧基,则酯化或酰胺化等。

可按本发明进行试验的额外调节剂包括结合在甾酮环的一个或多个碳原子上的血清白蛋白分子,所述碳原子例如甾酮的 3'碳(例如 T-3-BSA)或甾酮的 17'碳(例如 T-17-BSA)。在一个实施方案中,血清白蛋白通过合适连接基(例如结合在甾酮的 3'碳上的脞连接基)被甾体环间隔开。参见 Goeij, AF 等(1986) *J. Steroid Biochem.* 24: 1017。可以理解,其它化合物可以是有用的调节剂,例如与血清白蛋白(BSA 或人血清白蛋白(HSA))片段结合的甾酮。优选的片段包括具有至少 50%、优选至少约 70%、更优选至少约 90%、约 95%至约 99%血清白蛋白氨基酸序列的那些序列。合适的片段可具有连续或非连续缺失。

至于“牛血清白蛋白”或 BSA 是指由 Swiss-Prot entry P02769 代表的氨基酸序列,包括优选的片段及其等位变异体。至于“人血清白蛋白”或 HSA 是指由 Swiss-Prot entry P02768 代表的氨基酸序列,包括优选的片段及其等位变异体。因此,前述血清白蛋白序列的等位变异体可用于制备本发明的调节剂(这类变异体的优选片段也包括在内)。

对于初次筛选,有用的待测调节剂浓度为约 10 微摩尔浓度至约 100 微摩尔浓度以上(即 1mM、10mM、100mM 乃至 1M),但也可以是 1nM 以上、1pM 以上或 1fM 以上。初次筛选的浓度可用作上限,和另外 9 个浓度一起使用,其中通过降低初次筛选浓度至半对数区间(例如对于另外 9 个浓度)来确定其它浓度,用于第二次筛选或绘制浓度曲线。

术语“蛋白质”和“多肽”可互换使用,是指至少有两个共价连接的氨基酸,其包括蛋白质、多肽、寡肽和肽。蛋白质可以由天然氨基酸和肽键构成,或可以具有合成的肽模拟结构。因此,本文所用的“氨基酸”或“肽残基”是指天然和合成的氨基酸。例如,认为高苯丙氨酸、瓜氨酸和正亮氨酸都是氨基酸,均适用于本发明的目的。“氨基酸”也包括亚氨基酸残基,例如脯氨酸和羟脯氨酸。侧链可以是(R)或(S)构型。在优选的实施方案中,氨基酸呈(S)或 L-构型。如果使用

非天然存在的侧链时,可以使用非氨基酸取代基,例如以防止或延迟体内降解。含有非天然氨基酸的蛋白质可以是合成的,或者在某些情况下可以经重组制备;参见 van Hest 等, *FEBS Lett* 428:(1-2) 68-70, 1998 年 5 月 22 日和 Tang 等, *Abstr. Pap Am. Chem. S218: U138 Part 2*, 1999 年 8 月 22 日,这两篇文献都通过引用结合到本文中。

本文所用的术语“可检测步骤”、“可检测”等是指可以检测的步骤,例如通过测量第二信使或检测修饰(例如磷酸化)蛋白质而直接检测的步骤,或者例如通过监测该步骤的下游效应而间接检测的步骤。例如,腺苷酸环化酶的活化导致产生 cAMP。可通过例如在测定中监测 cAMP 的产生而直接检测腺苷酸环化酶的活性,或者通过检测 cAMP 的实际水平而间接检测腺苷酸环化酶的活性。其它可检测步骤包括检测钙流量、细胞凋亡、PSA 分泌和细胞骨架重组。

本文所用的术语“变化”、“差异”、“减少”或“增加”,当用于例如结合或信号转导活性,或 PSA 分泌、细胞凋亡和/或钙流量时,是指各自活性至少增加或降低 10%。

G. 高通量筛选测定

正如所讨论的,本发明的范围内包括使用一种或多种带有可检测标记的雄激素,用于:(1)测定表达 mAR 的细胞;和(2)筛选 mAR 结合受体配体和其它调节剂。可以容易地修改这样的筛选,用于高通量或超高通量模式。如上所述,通过使用荧光化合物、发光化合物、发磷光化合物或化学发光化合物来直接或间接地标记雄激素,可以完成对本发明实施方案的实施。

当使用荧光标记的雄激素时,可以使用不同荧光监测系统之一或其组合。它们包括例如 FACS 系统。优选使用 FACS 系统或用于高通量筛选的系统,例如 96 孔或更大的微量滴定板。在荧光材料上进行测定的方法是众所周知的,可参见例如 Lakowicz, J. R., *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, New York: Plenum Press (1983); Herman, B.,

Resonance energy transfer microscopy, 载于: *Fluorescence Microscopy of Living Cell in Culture*, B 部分, *Methods in Cell Biology*, 第 30 卷, Taylor, D. L. & Wang, Y. -L. 主编, San Diego: Academic Press (1989), 第 219-243 页; Turro, N. J., *Modern Molecular Photochemistry*, Menlo Park: Benjamin/Cummings Publishing Col, Inc. (1978), 第 296-361 页。各种 FACS 系统是本领域已知的, 可用于本发明的方法(参见例如 WO99/54494, 1999 年 4 月 16 日申请; 美国申请号 20,010,006,787, 2001 年 7 月 5 日申请, 都通过引用结合到本文中)。

例如, 在调节剂存在下, mAR 阳性细胞的荧光标记雄激素的明显损失表明调节剂具有与 mAR 结合的潜力。用标准高通量和超高通量扫描方法, 可以容易地得到这样的方法结果。如有必要, 这样的方法可以与一种或多种本文公开的合适对照测定一起进行(例如基本上平行进行), 这样的对照也可在高通量和超高通量平台上进行。

根据本发明的一个实施方案, 可用荧光计测定样品的荧光。一般而言, 来自具有第一波长的激发源的激发辐射通过激发光学系统。激发光学系统使激发辐射能激发样品。作为回应, 样品中的荧光蛋白发射辐射, 其波长不同于激发波长。然后由收集光学系统收集来自样品的发射光。仪器可包括温度控制器, 在扫描时将样品控制在特定温度内。根据一个实施方案, 多轴平移台(translation stage)移动一个装有多种样品的微量滴定板, 以便将不同的待暴露孔进行定位。可以通过适当编程的数字计算机, 管理多轴平移台、温度控制器、自动聚焦部件以及与图像和数据收集相关的电子设备。计算机也可将测定期间所收集的数据转化成另一种模式, 用于展示。

在另一个实施方案中, 用流式细胞术来检测荧光。也可以使用检测荧光的其它方法, 例如量子点方法(参见例如 Goldman 等, *J. Am. Chem. Soc.* (2002) 124:6378-82; Pathak 等 *J. Am. Chem. Soc.* (2001) 123:4103-4; 和 Remade 等, *Proc. Natl. Sci. USA* (2000) 18:553-8, 各自通过引用结合到本文中)。

另见 Olah, MM 等(2004) *Current Drug Discov. Technology*, 3: 211; deLong 等(2005)载于: *J. Chromatogr. B. Analyt. Biomed. Life Science*, 829: 1; 和 Liu B.等(2005) *Am. J. Pharmacogenomics* 4: 263, 关于进行高通量和相关筛选测定的一般性公开内容。

除非另有说明, 否则本文所说的睾酮-BSA 缀合物(包括各种缩写形式)是指以下具体化合物: 睾酮 3-(O-羧甲基)肼:BSA。

本文所提及的所有文件都通过引用全部结合到本文中。以下非限制性实例是用于说明本发明的。

参考实施例

本参考实施例再现了 Kampa, M 等(2002) *FASEB J.* 16:1429, 表明氟化睾酮饱和和置换结合在表达 mAR (LNaCP)的细胞的细胞膜上。

参考图 1A-B, 表明 ^3H -睾酮在 LNCaP 细胞膜上的饱和结合(1A)和置换结合(1B)。(A)饱和结合。按照 Kampa, M.等(2002), 出处同上, 制备细胞膜, 终浓度为 2mg/ml。在 1000 倍过量的未标记雄激素(DHT)存在或不存在的条件下, 将所得细胞膜与 6 种浓度(2-50nM)的 ^3H -睾酮在 4°C 孵育过夜。该图显示 Scatchard 坐标中的数据分析。该图表明了一式三份的典型实验结果。(1B)置换结合: 将细胞膜(200 微克)仅与约 5nM ^3H -睾酮(Bo)一起孵育; 或者在 10^{-12} - 10^{-6}M 范围的指定浓度的未标记甾体(DHT、雌二醇、黄体酮)存在下, 将细胞膜(200 微克)与约 5nM ^3H -睾酮(Bo)一起孵育。通过加入 5 微摩尔浓度 DHT, 测定非特异性结合。该图(重复 3 次不同实验的平均值)表明在指定浓度的 DHT (Bs)存在下的特异性结合与 DHT (Bo)、Bs/Bo 不存在下的特异性结合的比率。

已经报道, 在前列腺癌细胞系(Kampa 等 2002)、以及人前列腺肿瘤中鉴定的雄激素的功能性 mAR 在癌细胞中高度表达(Stathopoulos 等, 2003)。这些结合位点受到睾酮-BSA (一种不渗透的睾酮类似物)的活化, 表现出能诱导快速肌动蛋白细胞骨架重组构并在几分钟内增加

前列腺特异性抗原(PSA)的分泌。已经鉴定了调节肌动蛋白重组的分子机制的特异性非基因组信号级联(Papakonstanti 等, 2003)。另外, 在新近的一项研究中, BSA 偶联的睾酮表现出能诱导 a) iAR-阴性 DU145 或 iAR 阳性 LNCaP 人前列腺癌细胞的细胞凋亡, 和 b) 前列腺癌细胞在体外和体内的消退(Hatzoglou 等, 2005)。这些发现表明, mAR 活化剂是前列腺癌凋亡性消退的重要工具。然而, 对于所观察到的肌动蛋白重分配的控制和细胞凋亡的诱导的分子机制并没有完全了解。

如下所示, 使用 iAR-阴性 DU145 前列腺癌细胞系, 表现出能表达活性 mAR (Hatzoglou 等, 2005), 以详细研究肌动蛋白细胞骨架重组与细胞凋亡间的串扰。研究了睾酮-BSA 处理后的调节肌动蛋白重组和诱导 DU145 细胞凋亡反应的分子机制, 表明在前列腺癌细胞凋亡性消退中肌动蛋白细胞骨架重排的重要调节作用。

实施例 1: 在 DU145 细胞中, 睾酮-BSA 快速诱导强效肌动蛋白聚合

公认在 LNCaP 人前列腺癌细胞中 mAR 位点的活化在几分钟内就达到肌动蛋白细胞骨架的明显重排, 正如强效肌动蛋白聚合和微丝重组所表明的那样(Kampa 等 2002)。使用非渗透性睾酮类似物以及胞内雄激素受体(iAR)的特异性抑制剂或拮抗剂, 我们提供的强有力证据表明, 在 LNCaP 细胞中, 通过 mAR 的活化诱导出这一现象。为了提供人前列腺癌细胞中的 mAR 活化与肌动蛋白细胞骨架间串扰的最终实验证据, 我们在 iAR-阴性、但 mAR-阳性 DU145 细胞中研究了睾酮-BSA 是否可影响肌动蛋白细胞骨架动力学。正如根据图 2A-B 所计算的, 将细胞与 10^{-7} M 睾酮-BSA 缀合物一起孵育, 导致曲通可溶性(单体)与曲通不溶性(丝状)肌动蛋白的比率明显降低, 达 45%。这些定量结果得到了在睾酮-BSA (testo-BSA)处理的 DU145 细胞中进行的肌动蛋白细胞骨架的共焦激光扫描显微分析的充分支持。的确, 微丝结构的完整亚膜重分配在 10 分钟内变得明显起来, 并持续至少 2 小时, 如图 3A-C 所示。根据这些结果, 我们可以下这样的结论: 在前列腺

癌细胞中，由雄激素对 mAR 的活化诱导快速而强效的肌动蛋白细胞骨架重分配，独立于表达或依赖于胞内雄激素受体。

实施例 2: 肌动蛋白重组构是睾酮-BSA 诱导 DU145 细胞凋亡反应所需要的

有报道表明，睾酮-BSA 对 mAR 的活化导致 LNCaP 和 DU145 前列腺癌细胞系中明显的细胞凋亡诱导。为了分析当 mAR 活化时，肌动蛋白细胞骨架重组构与细胞凋亡之间可能的串扰，在阻断肌动蛋白重组构的特定调节剂的存在下，我们研究了 DU145 细胞的凋亡反应。用细胞松弛素 B (10^{-6} M) 或类鬼笔环肽(phalloidin) (10^{-6} M) 与细胞一起孵育(以防肌动蛋白重分配)，表明对用睾酮-BSA 处理的 DU145 细胞的凋亡反应的明显抑制(图 4)。FACS 分析完全支持这些观察结果。从这些结果，可得到的结论是肌动蛋白的重分配是必要步骤，这可调节信号转导事件，在睾酮膜结合位点活化时，导致 DU145 前列腺癌细胞的凋亡反应。这一假说与以前公布的数据一致，表明肌动蛋白重组构是重要的信号转导步骤，调节 NF κ B 易位和转录性调节 TNF α 诱导的抗凋亡反应(Papakonstanti 和 Stournaras, *Mol Biol Cell*, 2004)。

实施例 3: DU145 细胞中 mAR 的活化不能诱导 FAK/PI-3K/Rac1 途径

在 LNCaP 细胞中 mAR 的活化显示出能诱导包括 FAK/PI-3K/Cdc42/Rac1 的快速非基因组信号转导途径并导致肌动蛋白重组构(Papakonstanti 等, *Mol Endocrinol* 2003)。令人吃惊的是，在 iAR-阴性 DU145 细胞中，似乎该途径并不参与介导快速非基因组肌动蛋白信号转导。的确，如图 5A-B 所示，在 DU145 细胞中，FAK 进行了组成型磷酸化。当细胞与睾酮-BSA 一起孵育时，没有文献表明明显的额外 FAK 磷酸化，也没有下游信号分子 PI-3K 和 Rac1 的活化。与这些结果一致的是，将 DU145 细胞与特异性 PI-3K 抑制剂渥曼青霉素一起孵育，不影响睾酮处理所引起的肌动蛋白聚合，这表明 PI-3K

信号转导并不参与这些细胞中的睾酮诱导的快速肌动蛋白重组。这些发现表明存在着调节快速肌动蛋白重组的替代的非基因组信号转导级联，如图 2A-B 所示。

实施例 4: DU145 细胞中 mAR 的活化诱导快速 RhoA 和 ROCK 活化

为了在 DU145 细胞中寻找介导非基因组睾酮信号转导的替代机制，我们分析了 Rho-GTP 酶的可能的快速活化。的确，在调节这些肌动蛋白重组过程的信号转导效应物中，最好理解的是 Rho 家族的小 GTP 酶。从经典上看，质膜受体通常通过磷酸化来激活特异性鸟嘌呤交换因子(GEF)，这导致随后给 Rho GTP 酶加载 GTP。活性 Rho GTP 酶持续向 Rho 卷曲螺旋激酶 1 (ROCK1)和/或 p21 激活的激酶 1 (Pak1) 进行信号传递。活化的 Pak1 和 ROCK1 分别使 Lim-激酶 1 和 2 (Limk1 和 Limk2)磷酸化并激活。Limk1 和 Limk2 是密切相关的蛋白质，由两个 N-端 Lim 结构域和一个 C-端激酶结构域组成。Lim 结构域是细胞质蛋白质中常见的蛋白质结合基序，所述基序与肌动蛋白细胞骨架相互作用。最后，Limk1 和 Limk2 使肌动蛋白-解聚蛋白质(例如肌动蛋白丝切蛋白(cofilin))和肌动蛋白-解聚因子(ADF)磷酸化，使之失活并因而允许肌动蛋白发生聚合。如图 6A-B 所示，用 10^{-7} M 睾酮-BSA 处理 DU145 细胞，导致非常快速(3 分钟之内)活化 RhoA，并在 30 分钟后，持续最大活化达 2 小时。为了进一步分析 RhoA 活化的下游效应物，经睾酮-BSA 激活的 DU145 细胞用特异性 ROCK 抑制剂 Y27632 进行了处理，使用 G/总肌动蛋白比率，定量测定肌动蛋白重分配。如图 6B 所示，在 Y27632 存在下，完全抑制了睾酮诱导的快速肌动蛋白聚合，表明在 DU145 细胞中，在 mAR 活化的非基因组信号转导中，ROCK 是 RhoA 效应物。

实施例 5: 对 Rho/ROCK 信号转导级联的抑制阻止了肌动蛋白重组和细胞凋亡的诱导

如图 4 所示, 在 mAR 活化时, 肌动蛋白重分配看来是必需步骤, 控制信号转导事件, 导致 DU145 前列腺癌细胞的凋亡反应。为了进一步研究这一现象, 我们分析了在阻断新鉴定的信号转导级联的抑制剂存在下 DU145 细胞的凋亡反应, 其导致肌动蛋白重组。令人感兴趣的是, 将 DU145 细胞与 Y27632 一起孵育, 导致在睾酮-BSA 处理时的促凋亡细胞反应消失, 如图 6A-B 所示。综合该图的结果表明, 对 Rho/ROCK 信号转导级联的抑制, 阻止了肌动蛋白重组和细胞凋亡的诱导。这些结果支持了以下假说: 肌动蛋白重分配在控制 mAR 激活的 DU145 细胞的凋亡反应中是关键性的调节因子。另一方面, 将细胞与渥曼青霉素一起孵育, 对睾酮-BSA 诱导的凋亡反应没有影响, 支持了以下证据: PI-3K 信号转导不参与 iAR-阴性 DU145 细胞的凋亡细胞反应。

以下材料、方法和科技文献将会有助于对本发明的理解。

材料

RPMI 1640 和胎牛血清(FBS)来自 Gibco-BRL (MD, USA)。罗丹明-鬼笔环肽和 Slow Fade Antifade 试剂盒来自 Molecular Probes, Inc. (Eugene, OR)。

ECL 蛋白质印迹试剂盒得自 Amersham (Arlington Heights, IL, USA)。睾酮-3-(O-羧甲基)肼-BSA (称为睾酮-BSA)得自 Sigma (St.Louis, MO)。将睾酮-BSA 溶于培养基中, 浓度是各实验指定浓度的 10 倍。然后, 在室温下, 将母液用活性炭溶液(30mg/ml)和葡聚糖(0.03mg/ml)处理 30 分钟, 以 3000xg 离心 15 分钟, 再通过 0.22 μ m 滤器过滤, 除去任何潜在污染物以及游离甾体。然后, 经处理的睾酮-BSA 用于所有研究。所有其它化学品得自常规市售来源, 都是最纯级别。

细胞与培养条件

研究了从转移性脑癌中分离的 DU145 人前列腺癌细胞(DMSZ, Braunschweig, Germany)的第 2 代至第 9 代。在 37°C, 在空气中含 5%

CO₂的增湿气氛下,将细胞培养在 RPMI 1640 培养基(添加了 10%加热灭活的胎牛血清)中。它们每周进行一次传代培养,在任何实验之前,孵育在无血清培养基中达 24 小时。

可溶性和不溶性肌动蛋白的免疫印迹分析

用 10⁻⁷M 睾酮-BSA 处理后,将细胞在冰上、在 0.5ml 曲通提取缓冲液(0.3%曲通 X-100、5mM Tris-HCl、2mM EGTA、300mM 蔗糖、400μM PMSF、10μM 亮抑酶肽、2μM 鬼笔环肽, pH7.4)中孵育 5 分钟。用等量的 6%高氯酸(PCA)沉淀出曲通可溶性蛋白。用 1ml 3% PCA 沉淀出曲通不溶性部分。用 LKB 电泳仪(LKB, Bromma, Sweden),将等体积的各部分进行 SDS 电泳,将蛋白质转移到硝酸纤维素膜上。然后将膜与单克隆抗肌动蛋白抗体一起孵育,再与合适标记的第二抗体一起孵育。用增强型化学发光系统使印迹显色,通过基于 PC 的图像分析(Image Analysis, Inc., Ontario, Canada)对条带强度进行了定量测定。

共焦激光扫描显微镜检术

用罗丹明-鬼笔环肽给经 10⁻⁷M 睾酮-BSA 处理的 DU145 细胞分别着色 1 小时和 2 小时,进行了丝状(F)-肌动蛋白的直接荧光显微镜检。用共焦激光扫描模块(Leica Lasertechnik, Heidelberg, Germany)分析了样品。

细胞凋亡的定量测定

按照制造商使用指南,将 *APOPercentage* 细胞凋亡测定(Biocolour Ltd., Belfast, N. Ireland)用于定量测定细胞凋亡。该试剂盒使用的染料将经历膜“触发”事件的凋亡细胞染成红色,当磷脂酰丝氨酸易位到外小叶时。在倒置显微镜下很容易观察到细胞凋亡。对于细胞凋亡的定量检测,标记细胞内的染料含量随后可释放到溶液中,用滤色片微量板比色计(Dynatech MicroElisa reader Chantilly, VA)在 550nm 波长(参考滤片 620nm)处测定浓度。

另见 Etienne-Manneville, S.和 Hall, A. (2002) *Nature* **420**(6916), 629-35; Schmidt, A.和 Hall, A. (2002) *Gene Dev* **16**(13), 1587-609; Amano, M., Fukata, Y.和 Kaibuchi, K. (2000) *Exp Cell Res* **261**(1), 44-51; Jaffer, Z. M.和 Chernoff, J. (2002) *Int J Biochem Cell Biol* **34**(7), 713-7; Amano, T., Tanabe, K., Eto, T., Narumiya, S.和 Mizuno, K. (2001) *Biochem J* **354**(Pt 1), 149-59; Edwards, D. C., Sanders, L. C., Bokoch, G. M.和 Gill, G. N. (1999) *Nat Cell Biol* **1**(5), 253-9; Maekawa, M., Ishizaki, T., Boku, S., Watanabe, N., Fujita, A., Iwamatsu, A., Obinata, T., Ohashi, K., Mizuno, K.和 Narumiya, S. (1999) *Science* **285**(5429), 895-8; Ohashi, K., Nagata, K., Maekawa, M., Ishizaki, T., Narumiya, S.和 Mizuno, K. (2000) *J Biol Chem* **275**(5), 3577-82; Sumi, T., Matsumoto, K.和 Nakamura, T. (2001) *J Biol Chem* **276**(1), 670-6; Bach, I. (2000) *Mech Dev* **91**(1-2), 5-17; 和 Arber, S., Barbayannis, F. A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C. A., Bernard, O.和 Caroni, P. (1998) *Nature* **393**(6687), 805-9.

本文所引用的所有参考文献的公开内容都通过引用结合到本文中。参考优选的实施方案，详细描述了本发明。然而，可以理解，本领域技术人员根据本说明书可以在本发明的精神和范围之内进行修改和改进。

参考资料的结合

本申请所引用的所有参考文献(包括文献、已公告的专利、已公布的专利申请和同时待审的专利申请)的内容都通过引用全部结合到本文中。

等同实施方案

本领域技术人员将会理解或只使用常规实验就能够确定本发明具体实施方案的许多等同实施方案。这些等同实施方案包含在所附权利要求书之内。

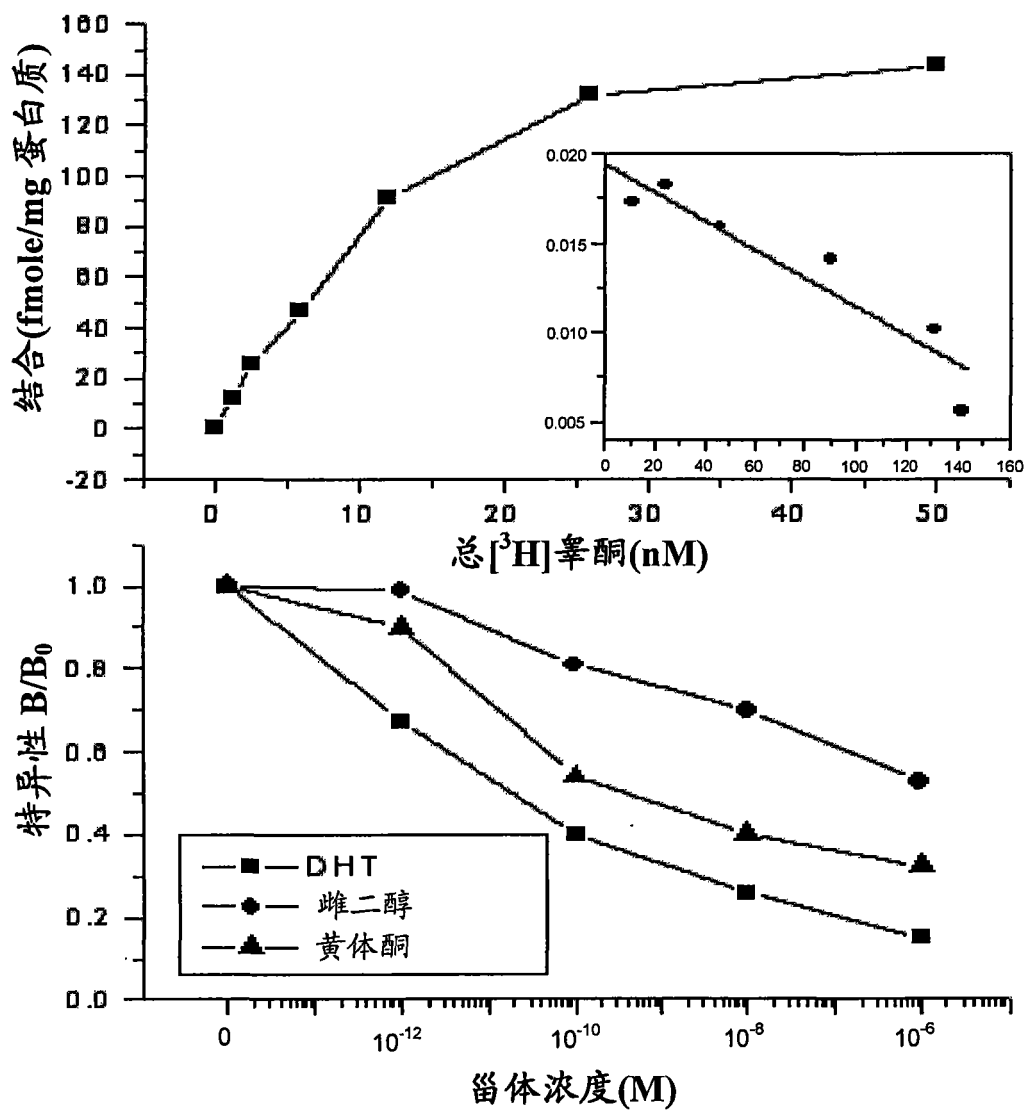


图 1A-1B

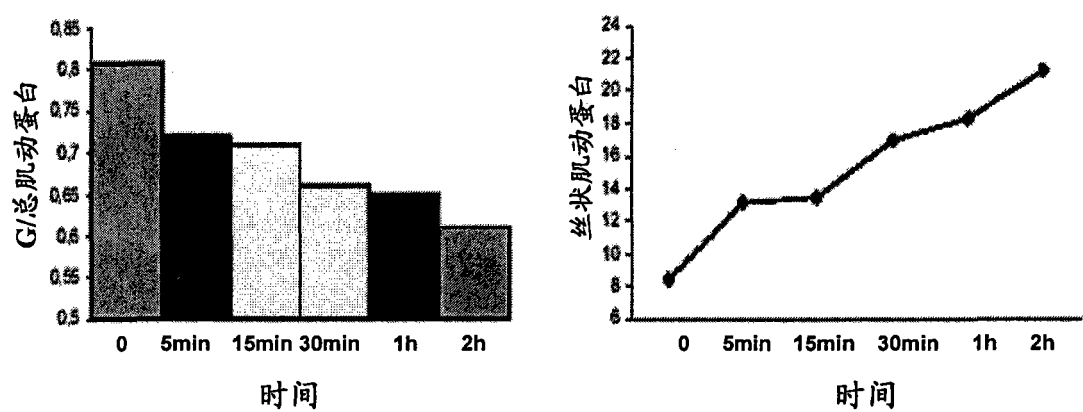


图 2. 经姜酮处理后，DU-145 细胞中单体和聚合肌动蛋白的修饰。将 3.5mm 平皿的无血清培养基中培养的 DU-145 细胞与 10^{-7} M 姜酮-BSA 一起孵育不同时间。亚细胞分级分离后，通过定量免疫印迹分析测定单体和总肌动蛋白。图 A 显示 G/总肌动蛋白的比率在 2 小时内下降。在图 B 中，聚合效应反映了丝状肌动蛋白值的增加。

图 2A-B

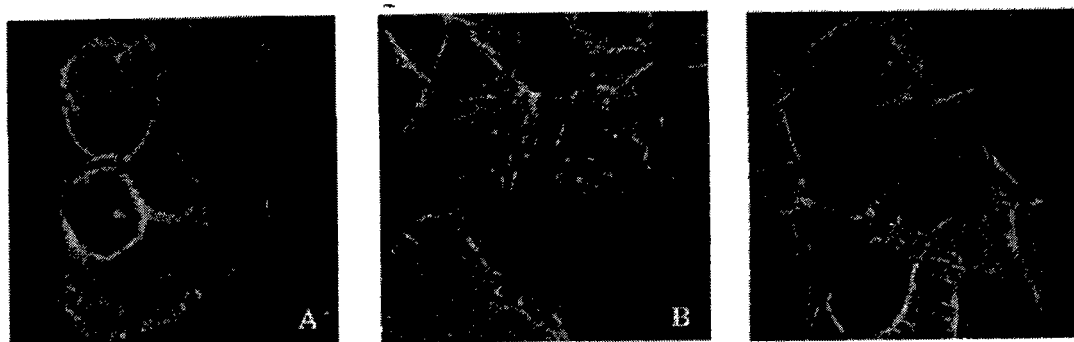


图 3. 雄激素对肌动蛋白细胞骨架组构效应的形态学分析。通过罗丹明-鬼笔环肽染色来测定肌动蛋白丝的重分配。共焦激光扫描显微镜分析(放大倍数 $\times 63$): (A) DU145 未处理细胞(7 个部分平均), (B) DU145 细胞用睾酮-BSA 处理 1 小时(5 个部分平均), (C) DU145 细胞用睾酮-BSA 处理 2 小时(7 个部分平均)。

图 3A-C

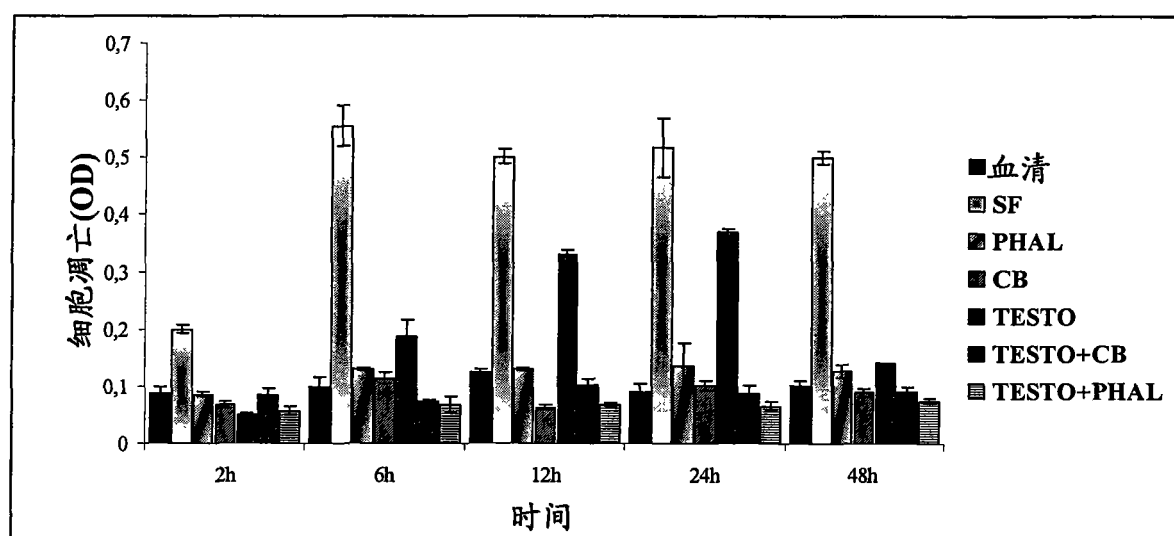


图 4

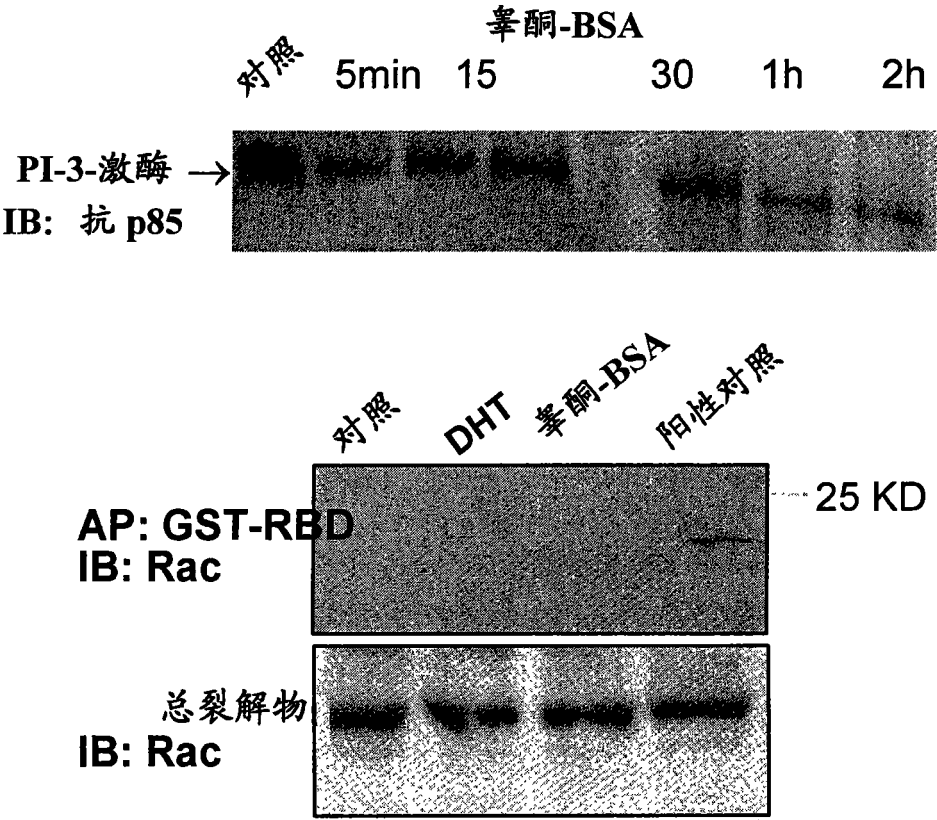


图 5A-5B

RhoA/ROCK在DU-145细胞中用睾酮-BSA处理后被激活

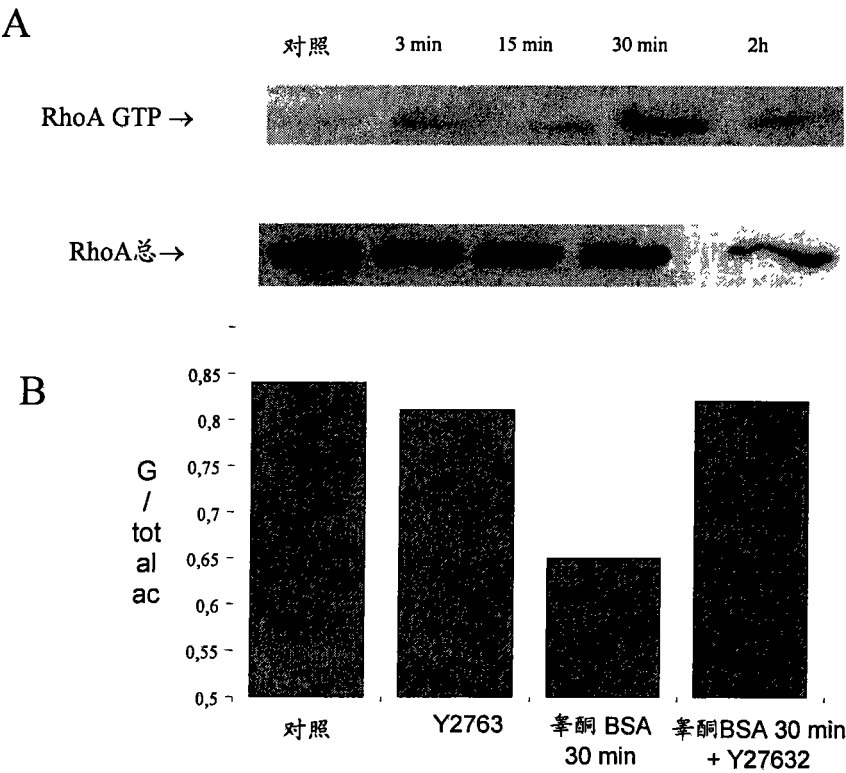


图 6A-6B

专利名称(译)	膜雄激素受体(mAR)调节剂的检测方法		
公开(公告)号	CN101460846A	公开(公告)日	2009-06-17
申请号	CN200780020213.9	申请日	2007-03-30
[标]发明人	N贝科普洛斯 K阿列维佐普洛斯 RL布查南 C斯图尔纳拉斯		
发明人	N·贝科普洛斯 K·阿列维佐普洛斯 R·L·布查南 C·斯图尔纳拉斯		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/566		
代理人(译)	刘冬 李连涛		
优先权	20060100207 2006-04-03 GR 60/788878 2006-04-03 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

公开了能调节膜雄激素受体(mAR)的调节剂的检测方法。在一个实施方案中，本发明提供用于检测和任选鉴别mAR结合配体的方法。相对于结合经典胞内雄激素受体(iAR或AR)而言，本发明的一个测定方法检测能选择性结合mAR的结合剂。本发明具有广泛用途，包括提供优先结合mAR的化学实体的文库的筛选方法。

