

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200380109564.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2006年3月8日

[11] 公开号 CN 1745299A

[22] 申请日 2003.12.12

[21] 申请号 200380109564.9

[30] 优先权

[32] 2002.12.12 [33] AU [31] 2002953327

[86] 国际申请 PCT/AU2003/001665 2003.12.12

[87] 国际公布 WO2004/053487 英 2004.6.24

[85] 进入国家阶段日期 2005.8.8

[71] 申请人 莫纳什大学

地址 澳大利亚维多利亚

[72] 发明人 S·梅勒 G·里斯布里奇

E·鲍尔 H·王 C·麦克利恩

J·佩德森 A·奥康纳

M·克兰菲尔德 N·格鲁姆

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所
代理人 程泳

权利要求书 6 页 说明书 72 页 序列表 1 页
附图 22 页

[54] 发明名称

针对以活化素 β c 水平的调节为特征的病症的
诊断、治疗方法和有用试剂

[57] 摘要

本发明一般性地涉及对以活化素表达水平的调节为特征的病症的发展或进展进行诊断、预报或监测的方法，和更具体的是，对以活化素 β 亚基表达水平的调节为特征的病症的发展或进展进行诊断、预报或监测的方法。本发明还进一步提供对以异常、不想要的或其他不恰当的活化素表达为特征的病症进行治疗或预防性治疗的方法，所述病症例如以活化素过量表达或表达不足，尤其是活化素 β 亚基过量表达或表达不足为特征的病症。本发明的内容更进一步地延伸到了本发明的方法所用的试剂。

1. 在哺乳动物中检测以活化素 β_c 水平或生物活性的调节为特征的病症的发作或易发作性的方法, 所述水平为相对于正常水平的调节, 所述方法包括在来源于所述哺乳动物的生物样本中对活化素 β_c 蛋白和/或基因表达的水平筛选。

2. 在哺乳动物中监测以活化素 β_c 水平或生物活性的调节为特征的病症的发作或进展的方法, 所述水平为相对于正常水平的调节, 所述方法包括在来源于所述哺乳动物的生物样本中对活化素 β_c 蛋白和/或基因表达的水平筛选。

3. 根据权利要求 1 或 2 的方法, 其中所述活化素 β_c 亚基为单体形式。

4. 根据权利要求 1 或 2 的方法, 其中所述活化素 β_c 亚基为二聚体形式。

5. 根据权利要求 4 的方法, 其中所述活化素 β_c 二聚体是活化素 AC ($\beta_A-\beta_C$), 活化素 BC ($\beta_B-\beta_C$), 活化素 C ($\beta_C-\beta_C$), 活化素 CD ($\beta_C-\beta_D$) 或活化素 CE ($\beta_C-\beta_E$) 中的一种或几种。

6. 根据权利要求 1-5 中任意一项的方法, 其中所述病症是胰腺, 脑和神经组织, 肾上腺, 甲状腺, 胃, 结肠, 膀胱, 子宫内膜, 乳腺, 淋巴结, 皮肤, 唾液腺, 骨, 鼻腔, 十二指肠, 胆囊, 子宫颈, 胸腺, 输卵管, 子宫, 扁桃腺, 脾, 阑尾, 精囊, 喉, 舌, 小肠, 直肠, 食管, 子宫肌层和软组织的病症。

7. 根据权利要求 6 的方法, 其中所述病症是恶性的瘤形成。

8. 根据权利要求 7 的方法, 其中所述恶性的瘤形成是胰腺, 脑和神经组织, 肾上腺, 甲状腺, 胃, 结肠, 膀胱, 子宫内膜, 乳腺, 淋巴结, 皮肤, 唾液腺, 骨, 鼻腔, 十二指肠, 胆囊, 子宫颈, 胸腺, 喉, 舌, 小肠, 直肠或食管的恶性的瘤形成, 精囊癌症, 脑癌症, 脾癌症或软组织癌症。

9. 根据权利要求 7 的方法, 其中所述病症是非恶性的瘤形成。

10. 根据权利要求9的方法, 其中所述非恶性的瘤形成是输卵管, 子宫, 扁桃腺, 脾, 阑尾, 精囊, 子宫肌层或软组织的瘤形成。

11. 根据权利要求6-10中任意一项的方法, 其中所述调节是活化素 β_c 亚基水平或生物活性的增加。

12. 根据权利要求6-10中任意一项的方法, 其中所述调节是活化素 β_c 亚基水平或生物活性的减少。

13. 根据权利要求11或12的方法, 其中生物样本选自血清, 组织提取物, 体液, 细胞培养基, 胞外介质, 上清液, 活检样品或切除的组织。

14. 根据权利要求1-13中任意一项的方法, 其中筛选分析涉及检测活化素 β_c 亚基并利用抗活化素 β_c 亚基的抗体来完成。

15. 根据权利要求1-13中任意一项的方法, 其中所述筛选分析涉及检测活化素 β_c 二聚体并利用抗活化素 β_c 亚基的抗体和抗活化素 β_A 、 β_B 、 β_C 、 β_D 或 β_E 亚基中一种或多种亚基的一种或多种抗体来完成。

16. 根据权利要求15的方法, 其中所述活化素 β_c 二聚体是活化素AC(β_A - β_C), 活化素BC(β_B - β_C), 活化素C(β_C - β_C), 活化素DC(β_D - β_C)或活化素EC(β_C - β_E)中的一种或几种。

17. 根据权利要求14-16中任意一项的方法, 其中所述抗体识别包含氨基酸序列: VPTARRPLSLLYDRDSNIVKTDIPDMVVEAC (SEQ ID NO: 1)的活化素 β_c 的表位或其等价物。

18. 在哺乳动物中检测以活化素 β_c 水平的调节为特征的病症的发作或易发作性, 或者监测其发作或进展的方法, 所述水平为相对于正常水平的调节, 所述方法包含:

(a) 使识别第一活化素 β 亚基的表位的第一抗体与来源于所述哺乳动物的生物学样本接触;

(b) 允许第一抗体结合到所述样本中的所述第一活化素 β 亚基;

(c) 清洗所述样本以充分除去未结合的物质;

(d) 将所述样本与识别第二活化素 β 亚基的表位的第二抗体接触, 其中第二抗体被标记试剂所标记; 和

(e) 检测标记试剂以鉴定所述样本中的活化素 β_c 亚基二聚体，其中所述第一或第二抗体识别活化素 β_c 亚基的表位。

19. 根据权利要求 18 的方法，其中所述活化素 β_c 二聚体是活化素 AC (β_A - β_c)，活化素 BC (β_B - β_c)，活化素 C (β_c - β_c)，活化素 CD (β_c - β_D) 或活化素 CE (β_c - β_E) 中的一种或几种。

20. 根据权利要求 18-19 中任意一项的方法，其中所述病症是胰腺，脑和神经组织，肾上腺，甲状腺，胃，结肠，膀胱，子宫内膜，乳腺，淋巴结，皮肤，唾液腺，骨，鼻腔，十二指肠，胆囊，子宫颈，胸腺，输卵管，子宫，扁桃腺，脾，阑尾，精囊，喉，舌，小肠，直肠，食管，子宫肌层和软组织的病症。

21. 根据权利要求 20 的方法，其中所述病症是恶性肿瘤。

22. 根据权利要求 21 的方法，其中所述恶性肿瘤是胰腺，脑和神经组织，肾上腺，甲状腺，胃，结肠，膀胱，子宫内膜，乳腺，淋巴结，皮肤，唾液腺，骨，鼻腔，十二指肠，胆囊，子宫颈，胸腺，喉，舌，小肠，直肠或食管的恶性肿瘤，精囊癌症，脑癌症，脾癌症或软组织癌症。

23. 根据权利要求 20 的方法，其中所述病症是非恶性肿瘤。

24. 根据权利要求 23 的方法，其中所述非恶性肿瘤是输卵管，子宫，扁桃腺，脾，阑尾，精囊，子宫肌层或软组织的非恶性肿瘤。

25. 根据权利要求 20-24 中任意一项的方法，其中所述调节是活化素 β_c 亚基水平或生物活性的增加。

26. 根据权利要求 20-24 中任意一项的方法，其中所述调节是活化素 β_c 亚基水平或生物活性的减少。

27. 根据权利要求 25 或 26 的方法，其中生物学样本选自血清，组织提取物，体液，细胞培养基，胞外介质，上清液，活检样品或切除的组织。

28. 根据权利要求 27 的方法，进一步包括将解离试剂加入样本以除去结合蛋白。

29. 根据权利要求 28 的方法，其中解离试剂选自 SDS，脱氧胆酸

钠和 Tween 20。

30. 用于权利要求 1-29 中任意一项的方法的组合物，所述组合物包含活化素 β_c 检测手段。

31. 根据权利要求 30 的组合物，其中所述组合物包含抗活化素 β_c 亚基表位的抗体和合适的稀释剂、赋形剂或载体。

32. 根据权利要求 31 的组合物，其中所述抗体识别包含氨基酸序列：VPTARRPLSLLYYDRDSNIVKTDIPDMVVEAC (SEQ ID NO :1) 的活化素 β_c 的表位或其等价物。

33. 一种诊断试剂盒，用于检测以活化素 β_c 亚基水平或生物活性的调节为特征的病症的发作或易发作性，或者监测其发作或进展，所述试剂盒包含了第一区室中的活化素 β_c 亚基蛋白和/或编码核酸检测手段，和第二区室中的用于促进所述检测手段的探测的试剂。

34. 根据权利要求 33 的试剂盒，其中所述检测手段为合适的稀释剂、赋形剂或载体与抗活化素 β_c 亚基表位的抗体。

35. 根据权利要求 34 的试剂盒，其中所述抗体识别包含氨基酸序列：VPTARRPLSLLYYDRDSNIVKTDIPDMVVEAC (SEQ ID NO :1) 的活化素 β_c 的表位或其等价物。

36. 用于权利要求 1-29 中任意一项的方法的根据权利要求 33-35 中任意一项的试剂盒。

37. 调节细胞异常生长的方法，所述方法包括活化素 β_c 亚基水平或生物活性的调节。

38. 根据权利要求 37 的方法，其中所述异常生长是恶性肿瘤。

39. 根据权利要求 38 的方法，其中所述恶性肿瘤是胰腺，脑和神经组织，肾上腺，甲状腺，胃，结肠，膀胱，子宫内膜，乳腺，淋巴结，皮肤，唾液腺，骨，鼻腔，十二指肠，胆囊，子宫颈，胸腺，喉，舌，小肠，直肠或食管的恶性肿瘤，精囊癌症，脑癌症，脾癌症或软组织癌症。

40. 根据权利要求 37 的方法，其中所述异常生长是非恶性肿瘤。

41. 根据权利要求 40 的方法，其中所述非恶性肿瘤是输卵管，子宫，

扁桃腺, 脾, 阑尾, 精囊, 子宫肌层或软组织的瘤。

42. 根据权利要求 37-41 中任意一项的方法, 其中活化素 β_c 亚基水平或生物活性向上调节至功能上的有效水平将诱导所述异常生长, 而活化素 β_c 亚基水平或生物活性向下调节至功能上的无效水平将抑制所述异常生长。

43. 根据权利要求 42 的方法, 进一步包括在足以诱导出活化素 β_c 亚基功能上的无效水平的条件和时间下, 对所述哺乳动物施用有效量的试剂。

44. 根据权利要求 37-41 中任意一项的方法, 其中活化素 β_c 亚基水平或生物活性向下调节至功能上的无效水平将诱导所述异常生长, 而活化素 β_c 亚基水平或生物活性向上调节至功能上的有效水平将抑制所述异常生长。

45. 根据权利要求 44 的方法, 进一步包括在足以诱导出活化素 β_c 亚基功能上的有效水平的条件和时间下, 对所述哺乳动物施用有效量的试剂。

46. 治疗性和/或预防性治疗以哺乳动物中活化素 β_c 亚基异常的、不想要的或不适当的水平或生物活性为特征的病症或该病症的易发展性的方法, 所述方法包含调节所述哺乳动物中活化素 β_c 亚基水平。

47. 根据权利要求 46 的方法, 其中所述活化素 β_c 亚基为单体形式。

48. 根据权利要求 46-47 中任意一项的方法, 其中所述病症是胰腺, 脑和神经组织, 肾上腺, 甲状腺, 胃, 结肠, 膀胱, 子宫内膜, 乳腺, 淋巴结, 皮肤, 唾液腺, 骨, 鼻腔, 十二指肠, 胆囊, 子宫颈, 胸腺, 输卵管, 子宫, 扁桃腺, 脾, 阑尾, 精囊, 喉, 舌, 小肠, 直肠, 食管, 子宫肌层和软组织的病症。

49. 根据权利要求 48 的方法, 其中所述病症是恶性肿瘤。

50. 根据权利要求 49 的方法, 其中所述恶性肿瘤是胰腺, 脑和神经组织, 肾上腺, 甲状腺, 胃, 结肠, 膀胱, 子宫内膜, 乳腺, 淋巴结, 皮肤, 唾液腺, 骨, 鼻腔, 十二指肠, 胆囊, 子宫颈, 胸腺, 喉, 舌, 小肠, 直肠或食管的恶性肿瘤, 精囊癌症, 脑癌症, 脾癌症或软组织癌

症。

51. 根据权利要求 48 的方法，其中所述病症是非恶性肿瘤。

52. 根据权利要求 51 的方法，其中所述非恶性肿瘤是输卵管，子宫，扁桃腺，脾，阑尾，精囊，子宫肌层或软组织的瘤。

53. 根据权利要求 46-52 中任意一项的方法，其中所述活化素 β_c 亚基水平向下调节至功能上的无效水平将抑制所述的异常细胞生长。

54. 根据权利要求 53 的方法，所述方法包含在足以诱导出活化素 β_c 亚基功能上的无效水平的条件和时间下，施用有效量的试剂。

55. 根据权利要求 46-52 中任意一项的方法，其中所述活化素 β_c 亚基水平向上调节至功能上的有效水平将抑制所述的异常细胞生长。

56. 根据权利要求 55 的方法，所述方法包含在足以诱导出活化素 β_c 亚基功能上的有效水平的条件和时间下，施用有效量的试剂。

57. 根据权利要求 54 的方法，其中所述试剂是抗活化素 β_c 亚基的抗体。

58. 根据权利要求 57 的方法，其中所述抗体识别包含氨基酸序列：VPTARRPLSLLYYDRDSNIVKTDIPDMVVEAC (SEQ ID NO : 1) 的活化素 β_c 的表位或其等价物。

59. 可调节活化素 β_c 亚基功能上有效水平的试剂在制备药物中的应用，所述药物用于治疗以活化素 β_c 亚基异常的、不想要的或不适当的水平为特征的病症。

60. 根据权利要求 59 的应用，其中所述病症是异常细胞生长。

61. 根据权利要求 60 的应用，其中活化素 β_c 亚基向下调节至功能上的无效水平将抑制所述异常生长。

62. 根据权利要求 60 的应用，其中活化素 β_c 亚基向上调节至功能上的有效水平将抑制所述异常生长。

63. 药物组合物，其包含可调节活化素 β_c 亚基的功能上有效水平的试剂，还包含一种或多种药学上可接受的载体和/或稀释剂。

64. 用于权利要求 37-58 中任意一项的方法中的权利要求 63 的组合物。

针对以活化素 β_c 水平的调节为特征的病症的 诊断、治疗方法和有用试剂

发明领域

本发明一般性地涉及对以活化素表达水平的调节为特征的病症的发展或进展进行诊断、预报或监测的方法，和更具体的是，对以活化素 β_c 亚基表达水平的调节为特征的病症的发展或进展进行诊断、预报或监测的方法。本发明还进一步提供对以异常、不想要的或其他不恰当的活化素表达为特征的病症进行治疗或预防性治疗的方法，所述病症例如以活化素过量表达或表达不足，尤其是活化素 β_c 亚基过量表达或表达不足为特征的病症。本发明的内容更进一步地延伸到了本发明的方法所用的试剂。

发明背景

本说明书中作者所参考的出版物的书目细节在说明书结尾按字母顺序集中在一起。

本说明书所参考的任何以前的技术没有也不应当作为关于该项现有技术澳大利亚形成了公知常识的一部分的认可或任何形式的暗示。

活化素是TGF- β 超家族的成员，该超家族作为许多器官和组织的有力的生长和分化因子而充当多重角色。活化素是活化素 β 亚基如组成活化素二聚体配体的 β_A 、 β_B 、 β_C 、 β_D 或 β_E 的同型或异型二聚体。活化素家族包括以保守半胱氨酸结(cysteine-knot)基序为特征的二硫键连接的二聚蛋白质。活化素A(β_A - β_A)最初从作为FSH分泌刺激物的卵巢滤泡液中分离。然而，现在已经认识到活化素如活化素A(β_A - β_A)、活化素B(β_B - β_B)和活化素AB(β_A - β_B)具有一系列生物活性，包括非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)胚胎中的中胚叶诱导，

免疫抑制, 骨的生长, 神经细胞存活, 伤口复原, 胰、肾和心脏中的肿瘤发生和组织分化 (Luisi 等, 2001. *Eur J Endocrinol* 145: 225-36, McDowell 等, 1999. *Semin Cell Dev Biol* 10: 311-7, de Kretser 等, 1999. *J Endocrinol* 161: 195-8, Hubner 等, 1999. *Histol Histopathol* 14: 295-304)。某些活化素家族成员似乎涉及分化和对增殖的调控。涉及这些过程的活化素二聚体配体的例子包括活化素 A ($\beta_A-\beta_A$)、活化素 B ($\beta_B-\beta_B$) 和异型二聚体活化素 AB ($\beta_A-\beta_B$)。更近些时候, 形成活化素 β 亚基新亚类的活化素 β_C 亚基以及活化素 β_D 和 β_E 亚基得到了鉴别。活化素 $\beta_C-\beta_C$ 形成活化素 C 同型二聚体 (Kron 等, 1998, *J Virol Methods* 72: 9-14)。

活化素 β_C 亚基从小鼠 (Lau 等, 1996, *Biochim Biophys Acta* 1307: 145-8) 和人肝脏中 (Hotten G 等, 1995, *Biochem Biophys Res Commun* 206: 608-13) 被克隆。活化素 β_D 从非洲爪蟾 (*Xenopus*) 中克隆。 β_D cDNA 的微注射诱导了中胚叶诱导, 然而没有哺乳类的等同物被确定 (Oda 等, 1995, *Biochem Biophys Res Commun* 210: 581-8)。活化素 β_E 亚基从小鼠肝脏中克隆, 被发现在大鼠肝脏和肺中表达 (O'Bryan 等, 2000, *J Mol Endocrinol* 24: 409-18)。Zhang 和其他学者证明了大鼠部分肝切除手术之后 β_A 和 β_C mRNA 调节之间的差别, 提议活化素 β_C 是肝脏抑素 (Esquela 等, 1997, *Biochem Biophys Res Commun* 235: 553-6, Zhang 等, 1997, *Endocr J* 44: 759-64)。然而, 没有确定活化素 D ($\beta_D-\beta_D$ 同型二聚体) 或 E ($\beta_E-\beta_E$ 同型二聚体) 的生物学角色。

类似地, 活化素 β_C 亚基或活化素 C 都没有牵涉到任何上面提及的生物学过程。此外, 活化素 β_C 或活化素 C ($\beta_C-\beta_C$) 没有被确定任何生物学活性, 例如, Groome 等 (2001, *J. Mol. Cell. Endo.* 180: 73-77) 指出“活化素 C 连续地无法显示生物活性”, Lau 等 (2000, *Mol Cell Biol*, 20(16): 6127-37) 陈述“活化素 β_C 不是胚胎发育或肝脏功能所必需”和 Chang 等 (2001, *Mol Cell Endocrinol.* Jun 30; 180 (1-2): 39-46) 陈述活化素 β_C “不是肝脏生长、分化和再生所必需”。

活化素 β_c 亚基在文献中频繁地被指为“肝脏特异性活化素”。Fang 等描述了成年小鼠中作为“独特的肝限定性模式”的活化素 β_c 表达 (Fang J 等, 1997, *Biochem Biophys Res Commun.* 231 (3): 655-61)。此外, Lau 等陈述了在哺乳动物肝脏中活化素 β_c 显现出高度限定性的组织表达模式 (Lau 等, 2000, *同上*)。而 Schmitt 等发现“抑制素/活化素 β_c 基因在成年小鼠肝脏中优势性地表达”和肝脏中的表达水平是“特异的和占优势的” (Schmitt 等, 1996, *Genomics* 32: 358-66)。此外, Chang 等描述了活化素 β_c “主要在成体肝脏中表达”和具有“高度限定的组织特异性表达模式” (Chang 等, 2001, *Mol Cell Endocrinol.* Jun 30; 180 (1-2): 39-46)。Kron 等陈述“ β_c 亚基唯一性地在肝组织中表达” (Kron 等, 1998, *同上*)。

通过配体结合诱导类型 I 和 II 跨膜丝氨酸/苏氨酸激酶受体的异聚性受体复合物形成, 启动活化素的信号转导。活化素结合到 ActRII 或 IIB, 导致对类型 I 受体 ActRI 的募集和磷酸化, 因此启动下游信号蛋白-Smad (Sma-和 Mad-相关的) 蛋白的磷酸化。随着磷酸化, Smad2 和 3 (受体调节的 Smad) 与 Smad4 (co-Smad) 形成异聚性复合物, 并从细胞质移动位置到细胞核 (Lebrun 等, 1999, *Mol Endocrinol* 13: 15-23; Wrana 和 Attisano, 2000, *Cytokine Growth Factor Rev* 11: 5-13; Pangas 等, 2000, *Trends Endocrinol Metab* 11: 309-314)。Smad 蛋白与转录因子或 DNA 结合元件的相互作用调节了合适的基因表达。例如, 在非洲爪蟾中, DNA 结合的转录因子即分叉头活化素信号转导子-1 (FAST-1) 结合到 Smad2 和 Smad4 复合物上以激活非洲爪蟾 *Mix. 2* 启动子的活化素反应元件 (ARE) (Chen 等, 1996 *Nature* 383: 691-6; Chen 等, 1997, *Nature* 389: 85-9)。不清楚活化素 β_c 和 β_e 亚基是否通过上面的活化素受体而转导信号或它们是否有自己的受体。

关于活化素 β_c 亚基蛋白在组织或器官中的存在、意义或功能, 几乎没有什么已知。此外, 关于活化素二聚体形成和活化素二聚体形成的调节, 几乎没有什么已知, 尤其是, 活化素 β_A 、 β_B 、 β_C 、

β_D 或 β_E 亚基二聚体化或其组合的调节。

因此，活化素 C 和/或活化素 β_C 亚基在当前已知的单体或二聚体形式的活化素亚基分子的功能性的前后关系中的角色有必要阐明。这将使现有的诊断与治疗性治疗方案的精巧化和新方案的发展都成为可能。

在作为本发明先导的工作中已经确定，相对于单体或二聚体形式的正常水平，活化素 β_C 亚基的变化的水平与瘤形成状态的发作相联系。因此，这些发现现在促进了涉及诊断和/或监测以活化素 β_C 亚基水平的调节为特征的疾病状态例如瘤形成状态的分析法的发展。此外，现在也提供了治疗性或预防性治疗这些病症的方法。

发明概述

在说明书和随后的权利要求全文中，除非上下文另外需要，词语“包含”和其变体应理解为对某一被陈述的实体或步骤或者实体或步骤的群体的包括，但不是对任何其它实体或步骤或者实体或步骤的群体的排除。

正如这里所用的，术语“来源于”应被用于指明来自于指定种类的特定的实体或实体的群体，但并非一定由指定来源直接得到。

本说明书包含用程序 PatentIn Version 3.1 制得的核苷酸序列信息，在书目之后呈现。通过数字指示器 < 210 > 和随后的序列标识符（例如 < 210 > 1, < 210 > 2, 等）在序列表中鉴别每一氨基酸序列。序列（蛋白质等）的长度、类型和每一氨基酸序列的生物体来源由数字指示器区域 < 211 >, < 212 > 和 < 213 > 中分别提供的信息指明。说明书中提到的氨基酸序列通过标识 SEQ ID NO: 和随后的序列标识符（例如，SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, 等）鉴别。说明书中提到的序列标识符与被序列标识符紧随其后的序列表中数字指示器区域 < 400 > 提供的信息（例如 < 400 > 1, < 400 > 2 等）相关联。也就是说，说明书中详述的 SEQ ID NO: 1 与序列表中 < 400 > 1 所示的序列相关。

本发明的一个方面涉及在哺乳动物中检测以活化素 β_C 水平或生

物活性的调节为特征的病症的发作或易发作性的方法，所述水平相对于正常水平被调节了，所述方法包含在来源于所述哺乳动物的生物样本中对活化素 β_c 蛋白和/或基因表达的水平筛选。

本发明的又一方面涉及在哺乳动物中检测以活化素 β_c 水平或生物活性相对于正常水平的增加或减少为特征的病症的发作或易发作性的方法，所述方法包含在来源于所述哺乳动物的生物样本中对活化素 β_c 蛋白和/或基因表达的水平筛选。

本发明的又一方面涉及在哺乳动物中监测以活化素 β_c 水平或生物活性的调节为特征的病症的发作或进展的方法，所述水平相对于正常水平被调节了，所述方法包含在来源于所述哺乳动物的生物样本中对活化素 β_c 蛋白和/或基因表达的水平筛选。

本发明的又一方面涉及在哺乳动物中监测以活化素 β_c 水平或生物活性相对于正常水平的增加或减少为特征的病症的发作或进展的方法，所述方法包含在来源于所述哺乳动物的生物样本中对活化素 β_c 蛋白和/或基因表达的水平筛选。

更进一步地，这里提供了在哺乳动物中检测以活化素 β_c 水平的调节为特征的病症的发作或易发作性的方法，所述水平相对于正常水平被调节了，所述方法包含：

- (a) 将识别第一活化素 β 亚基的表位的第一抗体与来源于所述哺乳动物的生物学样本接触；
- (b) 允许第一抗体结合到所述样本中的所述第一活化素 β 亚基；
- (c) 清洗所述样本以充分除去未结合的物质；
- (d) 将所述样本与识别第二活化素 β 亚基的表位的第二抗体接触，其中第二抗体被标记试剂所标记；和
- (e) 探测标记试剂以鉴别所述样本中的活化素 β_c 亚基二聚体，其中第一或第二抗体识别活化素 β_c 亚基的表位。

本发明的一个方面涉及根据此前描述的方法用于探测以活化素 β_c 水平或生物活性的调节为特征的病症的发作或易发作性的组合物，所

述组合物包含活化素 β_c 检测手段。

本发明进一步地提供了用于检测以活化素 β_c 水平或生物活性的调节为特征的病症的发作或易发作性的组合物，其中所述组合物包含抗活化素 β_c 亚基的表位的抗体与合适的稀释剂、赋形剂或载体。

本发明另一方面提供了用于检测以活化素 β_c 亚基水平或生物活性的调节为特征的病症的发作或易发作性的诊断试剂盒，所述试剂盒包含了第一区室中的活化素 β_c 亚基蛋白和/或编码核酸检测手段，和第二区室中的对促进以所述检测手段进行的检测有益的试剂。更多的区室也可被包括在内，例如以包括促进生物样本的采集和储存的手段。

本发明的另一方面涉及调节细胞异常生长的方法，所述方法包含活化素 β_c 亚基水平或生物活性的调节。

更特别地，本发明涉及调节细胞异常生长的方法，所述方法包含活化素 β_c 亚基水平或生物活性的调节，其中活化素 β_c 亚基水平或生物活性向上调节至功能上的有效水平将诱导所述异常生长，而活化素 β_c 亚基水平或生物活性向下调节至功能上的无效水平将抑制所述异常生长。

甚至更特别地，本发明涉及调节细胞生长的方法，所述方法包含活化素 β_c 亚基水平或生物活性的调节，其中活化素 β_c 亚基水平或生物活性向下调节至功能上的无效水平诱导所述细胞生长，而活化素 β_c 亚基水平或生物活性向上调节至功能上的有效水平将抑制所述细胞生长。

仍然更进一步地，这里提供了在哺乳动物中向下调节赘生性细胞的生长的方法，所述方法包含在足以诱导出活化素 β_c 亚基功能上的无效水平的条件下，对所述哺乳动物以有效量的试剂施用一段时间。

仍然更进一步地，这里提供了在哺乳动物中向下调节赘生性细胞的生长的方法，所述方法包含在足以诱导出活化素 β_c 亚基功能上的有效水平的条件下，对所述哺乳动物以有效量的试剂施用一段时间。

本发明涉及治疗性和/或预防性治疗以哺乳动物中活化素 β_c 异常的、不想要的或其它不适当的水平或生物活性为特征的病症或该病症

的易发展性的方法,所述方法包含调节所述哺乳动物中活化素 β_c 亚基水平。

本发明优选涉及治疗和/或预防性治疗瘤形成状态或形成瘤的病证的易发展性的方法,所述方法包含活化素 β_c 亚基水平或生物活性的调节,其中所述活化素 β_c 亚基水平向下调节至功能上的无效水平将抑制异常的细胞生长。

本发明优选涉及治疗和/或预防性治疗形成瘤的病证或形成瘤的病证的易发展性的方法,所述方法包含活化素 β_c 亚基水平或生物活性的调节,其中所述活化素 β_c 亚基水平向上调节至功能上的有效水平将抑制异常的细胞生长。

本发明的又一方面涉及某一试剂在制备对以活化素 β_c 亚基异常的、不想要的或其它不适当的水平为特征的病症进行治疗的药物中的应用,所述试剂可调节活化素 β_c 亚基的功能上的有效水平。

本发明的又一方面涉及此前所述试剂在制备用于调节细胞异常生长的药物中的应用,其中活化素 β_c 亚基向下调节至功能上的无效水平将抑制异常生长。

本发明的又一方面涉及此前所述试剂在制备用于调节细胞异常生长的药物中的应用,其中活化素 β_c 亚基向上调节至功能上的有效水平将抑制异常生长。

仍然更进一步地,本发明涉及包含前文定义的调节剂和一种或多种药学上可接受的载体和/或稀释剂的药物组合物。

附图简述

图1显示在人肾上腺和甲状腺中及伴随这些器官中癌症发展的活化素 β_c 亚基蛋白的免疫定位。插图显示完整组织切片的低倍观察结果。

(A) 肾上腺皮质显示活化素 β_c 亚基蛋白的分离的核(箭)着色模

式。弱阳性和强阳性（箭头）细胞质着色也在肾上腺髓质中观察到。(B)来自肾上腺皮质癌患者的组织主要显示强的核（箭头）活化素 β_c 亚基免疫定位，然而细胞质（箭头）着色也被观察到。(C)甲状腺滤泡显示断断续续的活化素 β_c 亚基蛋白免疫定位。突出地，滤泡上皮细胞显示无活化素 β_c 亚基着色（箭），然而部分上皮细胞具有细胞质定位（箭头）。(D)相反地，甲状腺轻微浸润滤泡癌患者在细胞质中显示强活化素 β_c 亚基着色（箭）。(E)此外，甲状腺乳头状癌患者强免疫定位于核（箭），而细胞质中相对较弱（箭头）。

图 2 显示在正常的人消化组织（胃，直肠，结肠）中和伴随腺癌发展的活化素 β_c 亚基蛋白的免疫定位。插图显示完整组织切片的低倍观察结果。

(A, B) 活化素 β_c 亚基蛋白定位于人胃上皮细胞（箭），然而着色模式不定。平滑肌细胞和巨噬细胞显示可变的着色。(C)中度分化的胃腺癌患者中，观察到细胞质优先着色（箭）模式。(D)相反地，分化不足的胃腺癌患者显示出强烈的核（箭）着色，和相对较弱的细胞质（箭头）着色。(E)类似地，在已有淋巴结转移的胃腺癌患者中，观察到强核着色（箭）。(F)良性结肠显示出在部分分泌性上皮细胞（箭）和胃平滑肌细胞中的强活化素 β_c 亚基蛋白免疫定位。核着色观察结果断断续续。(G)来自结肠腺癌患者的组织显示强核（箭）和细胞质（箭头）着色。(H)正常直肠显示上皮细胞表层同时具有细胞质和核着色。(I)直肠腺癌显示核（箭）和细胞质（箭头）都有着色，然而这并非在所有肿瘤细胞中都观察到。

图 3 显示在正常的膀胱，皮肤，乳腺，淋巴结中和伴随这些组织中癌症发展的活化素 β_c 亚基蛋白的免疫定位。插图显示完整组织切片的低倍观察结果。

(A)膀胱变移上皮细胞中,活化素 β _c亚基蛋白免疫定位于细胞质和部分核。平滑肌细胞也显示断断续续的阳性着色。(B)分化不足的膀胱癌在这些肿瘤细胞的核有强免疫定位,然而细胞质也显示阳性着色。(C)皮肤的活化素 β _c亚基免疫定位于角质化细胞的细胞质,也定位于核,毛囊,和血管。(D)来自皮肤鳞状细胞癌患者的组织中,活化素 β _c亚基蛋白强免疫定位于肿瘤细胞的核,然而细胞质也是阳性。(E)正常乳腺上皮细胞具有活化素 β _c亚基蛋白的免疫定位。肌上皮细胞显示阳性(箭)和阴性着色(箭头),然而分泌性上皮细胞显示强细胞质定位(星号)。(F)相反地,乳腺残留渗透管(breast residual infiltrating duct)癌症患者显示强烈的核着色,也有细胞质的定位。(G)乳腺渗透小叶性(breast infiltrating lobular)癌症组织也突出显示与弱细胞质着色相关联的核定位。(H)来自乳腺乳头状癌症患者的组织显示强烈的核和细胞质着色。(I)正常淋巴结组织中,活化素 β _c亚基蛋白免疫定位于环绕淋巴细胞的基质组织(箭)。然而淋巴细胞本身是活化素 β _c亚基阴性(箭头)。(J)来自淋巴瘤患者的组织显示强核着色,然而不是所有核都是阳性。部分肿瘤细胞显示细胞质免疫定位。

图4显示在正常的人唾液腺,骨,鼻腔中和伴随这些组织中癌症发展的活化素 β _c亚基蛋白的免疫定位。插图显示完整组织切片的低倍观察结果。

(A)唾液腺中,在管(箭),浆细胞(箭头),粘液细胞(星号)和此器官的神经中观察到活化素 β _c亚基蛋白的细胞质定位。(B)腮腺Warthin肿瘤患者中,在肿瘤细胞中观察到细胞质和部分核着色。(C)来自下颌下腺癌患者的组织中,活化素 β _c亚基蛋白免疫定位于这些肿瘤细胞的细胞质和核。(D)来自低级软骨肉瘤患者的组织中,活化素 β _c亚基蛋白显示软骨细胞的集中核定位。(E)相反地,来自骨肉瘤患者的组织显示了细胞质中突出的阳性着色,然而也有部分核着色。(F)

强烈的细胞质和核着色都在骨巨大细胞肿瘤患者中观察到。(G)来自正常鼻腔的组织显示活化素 β_c 亚基免疫定位于鼻黏膜上皮细胞。具体定位于基底细胞(上皮细胞的增殖区域),更突出定位于分泌性上皮细胞。(H)在来自鼻腔内翻性乳头状瘤患者的组织中,细胞质和核定位在肿瘤细胞被观察到。

图5显示在正常人胃和十二指肠中和伴随这些组织中癌症发展的活化素 β_c 亚基蛋白的免疫定位。插图显示完整组织切片的低倍观察结果。

正常胃组织中,活化素 β_c 亚基蛋白免疫定位于腺体和平滑肌,然而此定位断断续续地兼有阳性和阴性着色。(A)在正常组织中,腺体显示核和细胞质的免疫定位,但着色不是均一的。(B)胃腔中,免疫定位显示于黏膜和肌肉层,但不是所有细胞都是阳性。例如,胃表面显示细胞质定位。(C)十二指肠活化素 β_c 亚基蛋白免疫定位于黏膜和平滑肌细胞层。不是所有细胞类型都是阳性,定位不是均一的。在胃腔表面分泌细胞中,部分细胞显示活化素 β_c 亚基定位于细胞质,而其它细胞在黏膜深层具有核着色。(D)来自中度分化胃腺癌患者的组织显示突出的细胞质活化素 β_c 亚基免疫定位。(E)相反地,核和细胞质免疫定位在分化不足的胃腺癌患者中观察到。(F)核着色也在胃指环状细胞癌患者中观察到,此外也有基质着色。(G)来自胃淋巴瘤的组织在肿瘤细胞和基质细胞核中显示出类似的着色模式。(H)已有淋巴结转移的胃癌,显示出断断续续的核、细胞质和基质定位。

图6显示在正常人胆囊和膀胱中以及这些组织中癌症发展后的活化素 β_c 亚基蛋白的免疫定位。插图显示完整组织切片的低倍观察结果。

(A) 正常胆囊中, 基底和分泌性细胞有活化素 β_c 亚基定位。核和细胞质着色都在上皮细胞层中观察到。也观察到平滑肌的定位。(B) 类似地, 来自胆囊腺癌患者的组织 显示出肿瘤细胞中的核和细胞质着色。此外, 邻近肿瘤细胞的平滑肌(星号; 插图)显示强活化素 β_c 亚基蛋白定位。(C) 来自膀胱的组织中, 变移上皮细胞有突出的细胞质模式的活化素 β_c 亚基蛋白免疫定位, 然而部分细胞的确显示核免疫定位。(D) 来自高级的膀胱变移细胞癌患者的组织, 在这些肿瘤细胞中有细胞质和核模式的活化素 β_c 亚基免疫定位。(E) 此外, 分化不足的癌症细胞具有强细胞质和强核着色。

图 7 显示在正常肾上腺和子宫颈中和伴随这些组织中癌症发展的活化素 β_c 亚基蛋白的免疫定位。插图显示完整组织切片的低倍观察结果。

(A) 肾上腺皮质中, 活化素 β_c 亚基蛋白在细胞质中观察到, 然而根据弱和强着色区域, 此定位可变。此外, 偶尔观察到核定位。(B) 来自肾上腺皮质癌患者的组织显示强细胞质和核着色。(C) 子宫颈显示部分核着色, 然而不是所有细胞都是阳性。鳞状发育异常中, 细胞质和核都具有活化素 β_c 亚基免疫定位。(D) 来自子宫颈鳞状细胞癌患者的组织中, 活化素 β_c 亚基蛋白免疫定位于肿瘤细胞的细胞质 (箭头)。部分肿瘤细胞也显示突出的核 (箭头) 定位。

图 8 显示在正常胰腺和食道中和伴随这些组织中癌症发展的活化素 β_c 亚基蛋白的免疫定位。插图显示完整组织切片的低倍观察结果。

(A) 胰腺中, 活化素 β_c 亚基蛋白强免疫定位于腺泡细胞分泌颗粒 (箭头), 而岛细胞弱很多 (箭)。(B) 来自胰腺癌患者的组织在肿瘤细胞中显示出更强的活化素 β_c 亚基定位。细胞质和核着色都在肿瘤细胞中

观察到。(C)食道中,在血管和部分平滑肌中的活化素 β_c 亚基免疫定位被观察到。然而,与部分零星的核阳性细胞不同,上皮层为阴性。(D)来自鳞状细胞癌患者的组织中,活化素 β_c 亚基蛋白强定位于肿瘤细胞的细胞质中。

图 9 显示在正常人甲状腺和胸腺中和伴随这些组织中癌症发展的活化素 β_c 亚基蛋白的免疫定位。插图显示完整组织切片的低倍观察结果。

(E)正常甲状腺中,活化素 β_c 亚基蛋白断断续续地定位于甲状腺滤泡的上皮细胞,而腺体主要是阴性。阳性细胞也许同时具有细胞质和核着色。(F)相反地,来自甲状腺轻微浸润滤泡癌患者的组织在肿瘤细胞的细胞质中显示强定位。(G)正常胸腺中,淋巴细胞为活化素 β_c 亚基阴性(箭头),然而胸腺上皮细胞(箭)显示细胞质着色和弱核着色。基质细胞(星号)也是阳性。(H)在来自胸腺瘤患者的组织中,肿瘤细胞显示活化素 β_c 亚基蛋白的强细胞质定位。恶性淋巴细胞保持了活化素 β_c 亚基蛋白阴性。

图 10 显示活化素 β_c 亚基蛋白在人子宫肌层,良性子宫和输卵管中的免疫定位。插图显示完整组织切片的低倍观察结果。

(A)子宫肌层中,活化素 β_c 亚基蛋白的免疫定位弱或是阴性。(B)来自子宫肌瘤患者的组织显示平滑肌细胞中的阳性着色。部分核着色也被观察到。(C)输卵管中,活化素 β_c 亚基蛋白免疫定位于分泌性细胞,也出现了部分断断续续的核着色。

图 11 显示活化素 β_c 亚基蛋白在正常人扁桃腺,精囊,脾和阑尾中的免疫定位。插图显示完整组织切片的低倍观察结果。

(A)扁桃腺中, 活化素 β_c 亚基蛋白定位于基质细胞(箭)而不是淋巴细胞(箭头)。(B)脾中, 血管呈强阳性(箭), 而淋巴样聚集物(lymphoid aggregations)(箭头)是阴性。(C)精囊的分泌性上皮细胞显示活化素 β_c 亚基的细胞质(箭头)和核(箭头)着色。平滑肌细胞也是阳性。(D)阑尾中的分泌性上皮细胞, 活化素 β_c 亚基蛋白强免疫定位于细胞质(箭头), 然而部分核着色(箭)也被观察到。

图 12 显示活化素 β_c 亚基蛋白在正常和病态的人脑中的免疫定位。插图显示完整组织切片的低倍观察结果。

(A)在来自成胶质细胞瘤患者的组织中, 良性区域显示星形细胞在细胞质(箭)中具有活化素 β_c 亚基蛋白强免疫定位。反应性星形细胞也是阳性。(B)在同样患者中, 血脑屏障(箭)也有活化素 β_c 亚基的强定位。(C)成胶质细胞瘤肿瘤细胞的细胞质(箭)对活化素 β_c 亚基蛋白呈阳性。(D)来自脑膜瘤患者的组织也在肿瘤细胞细胞质中具有活化素 β_c 亚基蛋白强定位。(E)人脑灰质显示神经元细胞中的阳性着色。活化素 β_c 亚基蛋白免疫定位于人脑的白质(F), 小脑(G)和垂体腺(H)。

图 13 显示活化素 β_c 亚基蛋白在绵羊与野生型和转基因型小鼠的正常脑中的免疫定位, 其中转基因小鼠表达引起神经变性疾病的人Cu, Zn超氧化物歧化酶突变。

转基因型(A)和野生型(B)小鼠脑显示活化素 β_c 亚基定位于小脑。分子层强烈显示活化素 β_c 亚基蛋白(箭), 颗粒层显示着色更少(星号), 而Purkinje细胞(箭头)是阴性。(C)绵羊垂体腺的内分泌细胞(箭)具有活化素 β_c 亚基蛋白的免疫定位。(D)在绵羊脑视前区中, 具有轴突突起的神经元细胞(箭)具有活化素 β_c 亚基定位。(E)在绵羊视丘下部神经元细胞中(箭), 显示活化素 β_c 亚基蛋白的定

位。

图 14 显示活化素 β 。亚基蛋白在恶性人皮肤，喉，舌，小肠与阑尾和软组织疾病中的免疫定位。

(A) 来自黑素瘤患者的组织显示活化素 β 。亚基定位于肿瘤细胞细胞质和核。(B) 阑尾假粘液瘤患者中观察到细胞质和部分核着色。(C) 软组织的神经纤维瘤病患者的组织中，活化素 β 。亚基蛋白免疫定位于细胞质和部分核。(D) 喉鳞状细胞癌患者组织显示细胞质和部分核着色。(E) 类似地，舌鳞状细胞癌免疫定位活化素 β 。亚基蛋白于细胞质，也有部分集中的核着色。(F) 小肠恶性基质肿瘤患者的组织显示出强活化素 β 。亚基蛋白定位。(G) 正常小肠中，非均一化的活化素 β 。亚基定位在上皮细胞中被观察到。

图 15 显示活化素 β 。亚基蛋白在良性乳腺组织、管内癌、浸润型小叶癌和管癌患者组织中的免疫定位。(A) 强活化素 β 。亚基定位，在管内癌症(高级)细胞的细胞质中观察到。(B) 低水平活化素 β 。亚基着色在同一患者的良性乳腺组织的基质细胞中看到。(C) 活化素 β 。亚基蛋白定位于恶性细胞的细胞质，浸润型小叶癌中观察到断断续续的核着色 (BRE 2 级)。(D) 在浸润型管癌症 (BRE 2 级) 的肿瘤细胞中没有观察到活化素 β 。亚基的定位。

图 16 显示结肠癌患者中的活化素 β 。亚基蛋白免疫定位。(A) 分化不足的结肠腺癌患者组织在肿瘤细胞细胞质中具有强免疫定位活化素 β 。亚基。(B) 同一患者良性组织的邻近区域在结肠表面上皮细胞和周围间质中具有更弱的活化素 β 。亚基免疫定位。(C) 中度分化的结肠腺癌患者中，活化素 β 。亚基断断续续的免疫定位于肿瘤细胞，邻近良性细胞在表面上皮细胞和部分间质中显示弱活化素 β 。亚基蛋白着色(D)。(E) 来自适度良好分化腺癌患者组织的恶性区域在肿瘤细胞中

没有免疫定位活化素 β_c 亚基。(F) 同一患者该组织的非恶性区域在基质细胞中显示部分弱活化素 β_c 亚基定位。

图 17 显示胃癌患者中的活化素 β_c 亚基蛋白免疫定位。(A) 良好分化的胃腺癌患者中, 活化素 β_c 亚基蛋白没有在肿瘤细胞中探测到, 然而弱着色在基质和邻近非恶性区域的上皮细胞中被观察到(B)。(C) 来自分化不足的肠型胃腺癌患者的肿瘤细胞, 活化素 β_c 亚基蛋白断断续续地免疫定位于肿瘤细胞的核中。(D) 指环状胃腺癌患者组织中, 肿瘤细胞核具有突出的活化素 β_c 亚基蛋白免疫定位, 然而部分细胞质着色被观察到。(E) 具有集中的指环状细胞并位于胃食管连接处的分化不足的胃腺癌患者组织, 具有肿瘤细胞中的活化素 β_c 亚基蛋白强定位, 然而邻近的正常食管黏膜为活化素 β_c 亚基阴性 (F)。

图 18 显示具有脑内转移黑素瘤患者的脑组织中的活化素 β_c 亚基蛋白免疫定位。

(A) 转移黑素瘤细胞显示活化素 β_c 亚基蛋白的强细胞质免疫定位。(B) 相反地, 具有转移到脑的黑素瘤的另一患者, 肿瘤细胞中没有活化素 β_c 亚基蛋白。

图 19 显示活化素 β_c 亚基蛋白在原发型脑肿瘤患者组织; 脑膜瘤和神经鞘瘤中的免疫定位。脑膜瘤来源于脑膜细胞。神经鞘瘤来源于 Schwann 细胞。(A) 活化素 β_c 亚基蛋白强免疫定位于脑膜瘤细胞细胞质。特别地, 该患者也显示强细胞膜免疫定位。(B) 神经鞘瘤强定位活化素 β_c 亚基蛋白于肿瘤细胞的细胞质。更高级 (WHO 2 级) 脑膜瘤患者在这些高级区域中同时具有活化素 β_c 亚基蛋白强细胞质着色 (C) 和强度稍弱的细胞质着色的区域 (D)。

图 20 显示膀胱癌患者组织中的活化素 β_c 亚基蛋白免疫定位。

(A) 变移细胞癌 (高级) 患者的肿瘤细胞弱免疫定位活化素 β_c 亚基蛋白于细胞质。(B) 另一高级变移细胞癌患者的肿瘤细胞, 活化素 β_c 亚基蛋白断断续续地免疫定位于细胞质和核。

图 21 显示甲状腺癌患者组织中的活化素 β_c 亚基蛋白的免疫定位。(A) 髓癌患者良性甲状腺滤泡中, 活化素 β_c 亚基蛋白断断续续地定位于滤泡上皮细胞的细胞质。(B) 同一髓癌患者的邻近肿瘤细胞, 肿瘤细胞中的强细胞质着色被观察到。(C) 甲状腺滤泡癌患者, 肿瘤细胞免疫定位活化素 β_c 亚基于细胞质。(D) 甲状腺乳头状癌显示肿瘤细胞中的集中着色, 部分但不是所有细胞具有活化素 β_c 亚基蛋白的免疫定位。

图 22 显示对活化素 β_c 亚基蛋白二聚体表达进行的 Western blot 分析。蛋白用 15% SDS-PAGE 胶分离。道 1: 正常人类患者 A, 1.67 ul 血清。道 2: 正常患者 A, 3.33 ul 血清。道 3: 正常人类患者 B, 3.33 ul 血清。道 1, 2 和 3 中, 约 20 kDa 的强条带 (箭) 被探测到, 说明大致大小分别为 20 和 21 kDa 的活化素 C ($\beta_c - \beta_c$) 或者活化素 BC ($\beta_b - \beta_c$) 的存在。道 3 也有大小约 23 kDa (箭) 的弱条带, 这也许说明大致大小为 23 kDa 的活化素 AC ($\beta_a - \beta_c$) 的存在。

发明详述

本发明部分基于令人惊讶的测定结果, 即无论二聚体或单体形式的活化素 β_c 亚基相对于正常水平的水平变化指示了某种病理状态尤其是瘤形成状态的发作。更具体地来说, 已确定许多组织中的活化素 β_c 水平和生物活性显示出与疾病或病症的发作或建立相关联的变化。它作为组织和细胞功能及细胞特征的变化指标而发挥作用。因此, 该相关性促进了用于瘤形成的简单而灵敏的测试法的发展, 尤其是该测试在对瘤形成状态的诊断、预告或监测中 useful。也促进了关于治疗以异常特别是无法控制的细胞生长为特征的病症的治疗和预防性方法

的理性设计。

因此,本发明的一个方面涉及在哺乳动物中探测以活化素 β_c 水平或生物活性的调节为特征的病症的发作或易发作性的方法,所述水平相对于正常水平被调节,所述方法包含在来源于所述哺乳动物的生物样本中对活化素 β_c 蛋白和/或基因表达的水平筛选。

“活化素 β_c ”的提法应被理解为表示活化素 β_c 的所有形式及其片段、衍生物、突变体或变体。“活化素 β_c ”也可互换性地指“活化素 β_c 亚基”。它也应理解为包括任何异构体,这些异构体也许来源于活化素 β_c 的 mRNA 或突变体的可变拼接或其多态性形式。“活化素 β_c ”的提法不打算有所限制而应被理解为包括了活化素 β_c 所有形式,这里的所有形式包括被活化素 β_c 亚基基因编码的任何蛋白质,可能产生的任何亚基多肽例如前体形式,和无论以单体、多聚体或融合蛋白存在的任何活化素 β_c 蛋白。活化素 β_c 的多聚体蛋白形式包括例如同型二聚体活化素 C(β_c - β_c)或异型二聚体活化素 AC(β_A - β_c),活化素 BC(β_B - β_c),活化素 CD(β_c - β_D)或活化素 CE(β_c - β_E)蛋白。因此,应理解可以筛选单体,同型二聚体或异型二聚体形式的活化素 β_c 。

本发明不受限于任一理论或作用模式,活化素 β_c 具有类似于其他活化素和其它 TGF β 超家族成员的结构。活化素结构依赖于半胱氨酸在每一亚基中数目和空间分布的保守性,及形成特征性的半胱氨酸结的两个亚基间的二硫键连接。其他类似点涉及二聚体形成,生物活性肽在活化素亚基分子前体 C 端区域中的定位和类似的细胞内信号机制。人活化素 β_c ,相对于其它 TGF- β 超家族成员,显示出具有 9 个保守半胱氨酸和巨大前体分子的典型结构,所述巨大前体分子包含被认为是分泌信号序列的 N 端疏水性氨基酸核心(Hotten G 等, 1995, 同上)。小鼠活化素 β_c 也包含 9 个保守半胱氨酸和可能作为信号肽的 N 端疏水性氨基酸(Schmitt 等, 1996, 同上)。

本发明不受限于任一理论或作用模式,已确定活化素 β_c 水平相对于正常活化素 β_c 水平的变化(也就是增加或减少)是病理状态发作的指标。因此,此定论促进了基于对活化素 β_c 相对于正常水平的向上或

向下调节的筛选的诊断性和预后技术的发展。

更具体来说，本发明涉及在哺乳动物中探测以活化素 β_c 水平或生物活性相对于正常水平的增加为特征的病症的发作或易发作性的方法，所述方法包含在来源于所述哺乳动物的生物样本中对活化素 β_c 蛋白和/或基因表达的水平筛选。

就另一具体方面而言，本发明涉及在哺乳动物中探测以活化素 β_c 水平或生物活性相对于正常水平的减少为特征的病症的发作或易发作性的方法，所述方法包含在来源于所述哺乳动物的生物样本中对活化素 β_c 蛋白和/或基因表达的水平筛选。

提法“以活化素 β_c 水平或生物活性的调节为特征的病症”应理解为表示任何以活化素 β_c 单体或二聚体水平的调节尤其是增加为特征的病症。应当理解的是，活化素 β_c 水平的变化也许是病理状态发作的原因或者结果。

不以任何方式对本发明加以限制，疾病或病症也许包括胰腺，脑和神经组织，肾上腺，甲状腺，胃，结肠，膀胱，子宫内膜，乳腺，淋巴结，皮肤，唾液腺，骨，鼻腔，十二指肠，胆囊，子宫颈，胸腺，输卵管，子宫，扁桃腺，脾，阑尾，精囊，喉，舌，小肠，直肠，食管，子宫肌层和软组织的疾病或病症。

在这方面，活化素 β_c 亚基蛋白在下列器官的人体组织（正常、良性和恶性肿瘤）中令人惊讶地被发现了：肾上腺，甲状腺，胃，结肠，直肠，膀胱，皮肤，乳腺，淋巴结，人唾液腺，骨，鼻腔，十二指肠，胆囊，子宫颈，胰腺，食管，甲状腺，胸腺，脑，喉，舌，和小肠。

活化素 β_c 亚基蛋白也被申请人在下列器官的人体组织（正常或患病）中探测到：子宫肌层，子宫，输卵管，扁桃腺，精囊，脾，软组织和阑尾。申请人也在正常人血清样本中探测到活化素AC和其它包含 β_c 亚基蛋白的二聚体。

β_c 的存在和正常与肿瘤组织模式之间的区别指明了细胞或组织的病态或状态改变或细胞和组织特征的改变。

由于活化素 β_c 亚基在文献中被频繁地指为“肝脏专一性活化素”，这些结果就是令人吃惊的。Fang 等. 1997, *Biochem Biophys Res Commun.* 231 (3). 655-61 描述了活化素 β_c 在成年小鼠中以“独特的肝脏限定性模式”表达 (Fang J 等, 1997, *Biochem Biophys Res Commun.* 231 (3): 655-61)。此外, Lau 等陈述了活化素 β_c 在哺乳动物肝脏中显示“高度限定性的组织表达模式” (Lau 等, 2000. *Mol Cell Biol.* 20 (16): 6127-37) 而 Schmitt 等发现“抑制素/活化素 β_c 基因在成年小鼠肝脏中突出地表达”和肝脏中的表达水平是“专一的和很高的” (Schmitt 等, 1996, *Genomics* 32: 358-66)。此外, Chang 等描述了活化素 β_c 是“主要在成体肝脏中表达”和具有“高度限定性的组织专一性表达模式” (Chang 等, 2001, *Mol Cell Endocrinol.* Jun 30; 180 (1-2): 39-46)。Kron 等也陈述了“ β_c 亚基只在肝脏组织中表达” (Kron 等, 1998, *J Virol Methods* 72: 9-14)。

所述病症优选是瘤形成状态。

更优选地, 所述瘤形成状态是胰腺, 脑和神经组织, 肾上腺, 甲状腺, 胃, 结肠, 膀胱, 子宫内膜, 乳腺, 淋巴结, 皮肤, 唾液腺, 骨, 鼻腔, 十二指肠, 胆囊, 子宫颈, 胸腺, 输卵管, 子宫, 扁桃腺, 脾, 阑尾, 精囊, 喉, 舌, 小肠, 直肠, 食管, 子宫肌层和软组织的恶性瘤形成, 或者输卵管, 子宫, 扁桃腺, 脾, 阑尾, 精囊, 子宫肌层和软组织的非恶性瘤形成。

最优选地, 所述活化素 β_c 水平或是增加或是减少。

因此, 本发明优选性地提供在哺乳动物中探测瘤的发作或易发作性的方法, 所述方法包含在来源于所述哺乳动物的生物样本中对活化素 β_c 蛋白和/或基因表达的水平或生物活性的筛选, 其中活化素 β_c 蛋白和/或基因表达相对于正常水平的水平增加是所述瘤的发作或易发作性的指标。

提法“瘤”应被理解为表示赘生性细胞的受限 (encapsulated) 或不受限的生长。提法“赘生性细胞”应被理解为显现异常生长的细

胞。术语“生长”应被按其最广泛的意义来理解，包括增殖。

在上下文中的短语“异常生长”旨在表示相对于正常细胞生长而显现出细胞分裂速率增加、细胞分裂数目增加、细胞分裂时间长度增加，细胞分裂时间频率增加或不受控制的增殖中的一种或几种的细胞生长。不以任何方式对本发明加以限制，术语“瘤形成”的普通医学含义指作为正常生长控制响应丧失的结果的“新细胞生长”，例如形成赘生性细胞生长。“增生”指正经历异常高生长速率的细胞。然而，正如在此所用的，术语“瘤形成”和“增生”可互换性使用，而普遍指正经历异常细胞生长速率的细胞。瘤形成和增生包括良性或前恶性或恶性的“肿瘤”。术语“瘤”应被理解为指损伤、肿瘤或其它包在囊内或不包在囊内的细胞团或包括赘生性细胞的其它生长形式。

本发明上下文中的术语“瘤”应被理解为包括所有类型的癌性生长或癌变过程，转移组织或与浸润的组织病理学类型或状态无关的恶性转化细胞、组织或器官。

赘生性细胞包含来源于任何组织的任何细胞类型，例如上皮或非上皮细胞的瘤。虽然本发明优选性涉及对恶性瘤的诊断，对非恶性瘤的诊断和/或监测并没有被排除在外。在此对术语“恶性瘤”和“癌症”的引用应被理解为可互换性的。

所述瘤优选为肾上腺，甲状腺，胃，结肠，直肠，膀胱，皮肤，乳腺，淋巴结，人唾液腺，骨，鼻腔，十二指肠，胆囊，子宫颈，胰腺，食管，thyroid，胸腺，脑，喉，舌，小肠，子宫肌层，子宫，输卵管，扁桃腺，精囊，脾，软组织或阑尾的瘤。

在此所用的术语“哺乳动物”包括人、灵长类、家畜动物（例如马、牛、绵羊、猪、驴）、实验室试验动物（例如小鼠、大鼠、豚鼠）、陪伴动物（如狗、猫）和被俘的野生动物（如袋鼠、鹿、狐狸）。优选的哺乳动物是人或实验室试验动物。更优选的哺乳动物是人。

提法“生物学样本”应被理解为指来源于生物体的任何细胞或组织样本。细胞也许是单细胞、培养细胞或组织的部分。考虑到这点，生物学样本也许来自于任何如上面详细说明的人类或非人类的哺乳动

物。应当被进一步理解的是，提法“生物体”包括胚胎和胎儿。

生物学样本也许是来自生物体材料的任何样本。这包括生物体中自然存在的样本例如哺乳动物中的组织和体液（例如淋巴标本、被切除的组织、组织抽提物、血液、淋巴液、粪便、支气管分泌物、或细胞培养基之类的活检标本）和引入到生物体内而后被清除的样本例如肺灌洗后从肺抽提出或肠灌洗后从结肠抽提出的盐溶液。它也包括来源于生物体但已经在体外保存的细胞例如细胞系，或从生物体去除后被操作或处理过例如永生化的或遗传学修改的细胞或组织。

根据本发明方法进行试验的生物学样本也许直接试验，也许在试验之前需要某些形式的处理。例如，活检样本在试验前也许需要均质化。例如，在含有细胞物质的样本中，也许需要抽提或暴露存在于细胞物质中的核酸物质，以促进对核酸物质进行的关于其 mRNA 表达的分析。在另一例子中，一旦生物学样本包含了高度多样化的细胞群体，也许就需要挑出特别关注的亚群。

对于什么类型样本最适合根据在此公开的方法进行的试验的选择依赖于被检测的病症的性质。例如，如果瘤形成状态是淋巴瘤，淋巴结活检或血液或骨髓样本将很可能为试验提供合适的组织来源。也需要考虑的有，是否正在监测的是赘生性细胞的最初来源，或者转移灶或其它形式的从监测起点开始的瘤形成扩散是否存在。考虑到这点，也许需要收集和试验来自任一生物体的大量不同样本。

虽然本发明方法通过分析分离的生物样本来完成最为方便，但也应被理解的是，分析“来源于”哺乳动物的样本的提法包括在体内分析样本。

本发明依据这样的发现进行预测，即活化素 β_c 在形成瘤的组织中的表达水平相对于正常组织有所改变。考虑到这点，本领域技术人员将明白，可以筛选活化素 β_c 在蛋白质或编码核酸分子水平上的变化。在没有明确指明的情况下，这里的所谓筛选“活化素 β_c ”水平应被理解为包括指对活化素 β_c 蛋白或者其编码性的初始 RNA 转录产物或者 mRNA 的筛选。因此，应当理解的是，本发明涉及活化素 β_c 相对于该

分子正常水平的相关性。“正常”水平是在某一生物样本的活化素 β_c 蛋白或编码核酸分子的水平，该生物样本是对应于没有发展出所讨论的病症或不易于发展所述病症的个体的被分析样本。“正常”水平也包括被进行分析的组织的非恶性区域的活化素 β_c 水平。后一分析方法是根据正常分析的相关的分析形式，被测试的试验水平分别来自于单一个体的病态和试验用组织。然而，本发明的方法也应被理解为包括不相关的分析方式，例如反映从健康个体而不是所讨论的患者中得到的单独或集中性结果的相对于标准结果的试验结果的分析。所述“正常水平”也许是不连续的水平或某一水平范围。显现出比正常范围更高或更低活化素 β_c 水平的个体通常被看作已经经历病症的发作或具有病症易发作性。考虑到此，应被理解的是，活化素 β_c 水平可通过定量或定性的读出器被评估或监测。所指的水平也可能在活化素 β_c 分子个体形式（如被不同处理的形式）之间变化。

因此，术语“增加”、“减少”和“调节”指相对于正常所指水平（或正常所指水平范围）或从讨论的患者中测得的更早结果的活化素 β_c 水平或生物活性的增加或减少，这后一点在对患者的持续监测中尤其重要，正如在此后所描述的。

虽然优选的方法是探测活化素 β_c 水平的变化以诊断（某一优选实施方案中）瘤的发作或易发作性，但活化素 β_c 水平相反变化的探测也许需要一定的环境条件。例如，在外科手术如乳房肿瘤切除术而不是乳房切除术被完成时，也许寻求对于乳房疾病状态改善的检测方法，和它在对患者进行治疗性治疗过程中与进一步的肿瘤发展相连的预后性应用。作为替代，具有瘤形成状态的症状或具有遗传性或环境性地容易出现瘤形成状态发展的体质的患者也可被监测。在另一例子中，一旦活检或其它已进行的试验和其分析已经显示了易出现瘤形成状态的体质，也许就寻求监测系统性的或恰当选出的活化素 β_c 定位水平，以作为转移灶发展或消退的指示。因此，本发明的这方面使得监测瘤形成状态的进展或容易出现那种病症的体质成为可能。应当被理解的是，根据本发明的这一方面，相对于一个或更多以前得到的结果的活

活化素 β_c 水平将很可能如此前所述地被评估。

本发明的方法可因此用作针对那些被认为具有瘤发展风险的个体的一次性检测或持续监测法，或者针对涉及抑制或减缓瘤发展的治疗或防御性治疗体系的有效性的监测法。在这些情况中，对在任何一类或多类生物样本中的活化素 β_c 表达的调节的反映是个体状态或当前采用的治疗或防御性体系的有效性的有价值的指标。因此，本发明的方法应被理解为延伸到了监测活化素 β_c 水平相对于它们的正常水平（如在此以前定义的）或相对于从所述个体测得的一种或多种更早些时候的活化素 β_c 水平，在个体中的增加或减少。

因此，本发明的另一方面涉及在哺乳动物中监测以活化素 β_c 水平或生物活性的调节为特征的病症的发作或进展的方法，所述水平相对于正常水平被调节了，所述方法包含在来源于所述哺乳动物的生物样本中对活化素 β_c 蛋白和/或基因表达的水平筛选。

就具体的一个方面而言，本发明涉及在哺乳动物中监测以活化素 β_c 水平或生物活性相对于正常水平的增加为特征的病症的发作或进展的方法，所述方法包含在来源于所述哺乳动物的生物样本中对活化素 β_c 蛋白和/或基因表达的水平筛选。

另一方面，本发明涉及在哺乳动物中监测以活化素 β_c 水平或生物活性相对于正常水平的减少为特征的病症的发作或进展的方法，所述方法包含在来源于所述哺乳动物的生物样本中对活化素 β_c 蛋白和/或基因表达的水平筛选。

所述病症优选为恶性或非恶性的瘤。

更具体地，这里提供了在哺乳动物中监测瘤的发作或进展的方法，所述方法包含在来源于所述哺乳动物的生物样本中对活化素 β_c 蛋白和/或基因表达的水平筛选，其中活化素 β_c 蛋白和/或基因表达水平相对于活化素 β_c 正常水平的增加是所述瘤的发作或进展的指标。

优选地，所述瘤形成状态是胰腺，脑和神经组织，肾上腺，甲状腺，胃，结肠，膀胱，子宫内膜，乳腺，淋巴结，皮肤，唾液腺，骨，鼻腔，十二指肠，胆囊，子宫颈，胸腺，输卵管，子宫，扁桃

腺, 脾, 阑尾, 精囊, 喉, 舌, 小肠, 直肠, 食管, 子宫肌层和软组织的恶性肿瘤形成, 或者输卵管, 子宫, 扁桃腺, 脾, 阑尾, 精囊, 子宫肌层和软组织的非恶性肿瘤形成。

本发明的方法具有广泛分布的应用, 包括但不限于对于以活化素 β_c 水平相对于正常水平的改变为特征的瘤或任何病症的诊断性或预后性分析。

筛选活化素 β_c 水平在个体或源自它们的生物样本中的变化可通过任何合适的方法而实现, 这些合适的方法为本领域技术人员所熟知, 例如但不限于:

(i) 体内 探测活化素 β_c 。在施用可以揭示活化素 β_c mRNA 或蛋白表达产物在前列腺组织中已改变的表达水平的影像探针或试剂后, 可以使用分子影像技术。

分子影像 (Moore, A., Basilion, J., Chiocca, E., 和 Weissleder, R., *BBA*, 1402: 239-249, 1988; Weissleder, R., Moore, A., Ph.D., Mahmood-Bhorade, U., Benveniste, H., Chiocca, E.A., Basilion, J.P. *Nature Medicine*, 6 : 351-355, 2000) 是与现在运用"正统的"诊断影像技术例如 X-射线, 计算机断层成像(CT), MRI, 正电子发射断层成像 (PET) 或内窥镜技术可以看到的大特征 (macro-features) 相关联的分子表达的体内影像。历史上, 在正常或增生性良性组织背景中探测恶性肿瘤细胞常常基于组织间物理性质的差异, 而这些差异经常较小, 导致低反差分辨率。表达谱 (profiling) 的应用将确定来自于恶性转化的癌症和正常组织间的“分子性质”的差异。

(ii) 在细胞中通过荧光原位杂交 (FISH), 或在细胞抽提物中通过例如定量逆转录酶聚合酶链式反应 (Quantitative Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) (QRT-PCR) 或对竞争性 RT-PCR 产物的流式细胞计鉴定 (Flow cytometric qualification) (Wedemeyer, N., Potter, T., Wetzlich, S. 和 Gohde, W. *Clinical Chemistry* 48 : 9 1398-1405, 2002) 或阵列技术之类的技术, 可以探

测 mRNA 表达的向上调节。

例如,被标记的编码活化素 β_c 的聚核苷酸可以被用作从前列腺得到的 RNA 抽提物的 Northern blot 中的探针。优选地,从动物中抽提的核酸在核酸扩增反应例如 RT-PCR、实时 PCR 或 SAGE 中,与对应于编码活化素 β_c 的聚核苷酸或其侧翼序列的正义和反义序列的寡聚核苷酸引物一起应用。多种自动固相探测技术也适合。例如,非常大规模固定性引物阵列 (very large scale immobilized primer arrays) (VLSIPS™), 正如例如 Fodor 等, 1991 和 Kazal 等, 1996 所描述的, 被用于对核酸的探测。上述遗传学技术为本领域人员所熟知。

例如,为探测活化素 β_c 的编码性 RNA 转录物,从猜想包含活化素 β_c RNA 的细胞样本例如从人前列腺癌组织中分离的总 RNA 中分离 RNA。可通过本领域熟知的方法例如使用 TRIZOL™ 试剂 (GIBCO-BRL/Life Technologies, Gaithersburg, Md.) 分离 RNA。寡-dT, 或随机序列寡核苷酸, 以及序列专一的寡核苷酸可被用作逆转录酶反应中的引物, 以从分离的 RNA 中制备第一链 cDNAs (first-strand cDNAs)。合成的第一链 cDNAs 然后用序列专一的寡核苷酸在 PCR 反应中扩增, 以制得扩增产物。

"聚合酶链式反应" 或 "PCR" 指预先选定的核酸、RNA 和/或 DNA 片段以 U. S. Patent No. 4,683,195 所述方式扩增的方法或技术。一般地,关注区域末端或区域外的序列被用来设计寡核苷酸引物。这些引物与将被扩增的模板链相对链的序列一致或类似。PCR 可用来扩增从细胞总 RNA 转录来的专一 RNA 序列和 cDNA。一般地,参看 Mullis 等, 1987; Erlich, 1989。因此,通过 PCR 的专一核酸序列扩增依赖于具有保守核苷酸序列的寡核苷酸或"引物", 其中保守序列由相关基因或蛋白序列的比对例如对比哺乳动物活化素 β_c 基因的序列推出。例如,一种引物被制备成预计与编码活化素 β_c 的 cDNA 分子反义链退火,

而另一引物被制备成预计与正义链退火。

为探测扩增产物，反应混合物代表性地被提交给琼脂糖胶电泳或其它方便的分离技术，专一扩增的活化素 β_c DNA的相对浓度被测得。例如，扩增DNA中的活化素 β_c 也许可应用以专一寡核苷酸探针进行的Southern杂交，或者与已知分子量的标准DNA进行电泳迁移性比较而探测。扩增后的活化素 β_c DNA的分离、纯化和表征可通过从胶上去除或洗脱片段而完成（例如，参看Lawn等，1981；Goeddel等，1980），将扩增产物克隆进合适载体如pCRII载体（Invitrogen）的克隆位点，对克隆插入物测序，将该DNA序列和已知的活化素 β_c 序列进行比较。活化素 β_c mRNA和cDNA的相对数量被测定。

(iii)在细胞抽提物或血液或其它合适的生物样本中对已改变的活化素 β_c 蛋白水平或者定性或者定量的测量，例如通过免疫分析，采用免疫反应分子如抗体去探测 β_c 异型或同型二聚体或者 β_c 单体亚基。

在某一实例中，可以寻求探测活化素 β_c -免疫反应性分子复合物的形成。例如，根据本发明的具有报告分子与其相连的抗体也可在免疫分析中被利用。此免疫分析包括但不限于本领域技术人员所熟知的放射免疫分析（RIAs），酶连免疫吸附分析（ELISAs），免疫层析技术（ICTs）和Western blotting。例如，可以参考"Current Protocols in immunology"，1994，其公开了多种可根据本发明而被应用的免疫分析。免疫分析可包括竞争性分析。应被理解的是，本发明包括定性和定量的免疫分析。

合适的免疫分析技术已被描述，例如，在U. S. Patent Nos. 4,016,043, 4,424,279和4,018,653中。这些包括非竞争性类型的单位点和双位点分析，也包括传统的竞争性结合分析。这些分析也包括标记的抗原-结合分子对靶抗原的直接结合。此案中的抗原是活化素

β_c 或其片段。

双位点分析尤其适合在本发明应用。存在有许多这些分析的变形形式，所有这些形式都倾向于被包括在本发明中。简要而言，典型的正向分析中，未标记的抗原-结合分子例如未标记抗体被固定在固体基质上，将被测试的样本送入与被固着的分子接触。培育一段合适的时间即允许抗体-抗原复合物形成所需的充足的时间后，另一抗原-结合分子（能产生探测性信号的报告分子所标记的专一抗抗原的合适的第二抗体）随后被加入，培育一段时间，即允许另一抗体-抗原-标记抗体的复合物形成所需的充分的时间。任何未反应的物质被清洗，抗原的存在通过对报告分子所产生信号进行的观察而确定。结果或者是通过对可视信号的简单观察而定性，或者是通过与含有已知数量抗原的对照样本比较而定量。正向分析的变形形式包括同时分析，在该分析中，样本和标记抗体被同时加到被固着的抗体中。这些技术为本领域技术人员所熟知，包括对其作显而易见的轻微改变。

在典型正向分析中，对抗原或其抗原性部分具有专一性的第一抗体共价或者被动地固着于固体表面。固体表面的代表是玻璃或聚合物，最普遍应用的聚合物是纤维素，聚丙烯酰胺，尼龙，聚苯乙烯，聚氯乙烯或聚丙烯。固体的支持物也许是试管、珠子、微量培养板的盘片（discs of microplates）或其它任何适合于进行免疫分析的表面。结合的过程在本领域中众所周知，通常由共价交联结合或物理吸附组成，聚合物-抗体复合物在测试样本的制备中被清洗。测试样本的等份物然后被加到固相并培育，培育时间为在合适条件下允许任何给出的抗原与抗体结合所需要的充分的时间。培育时段之后，抗原-抗体复合物被清洗和干燥，并与专一抗抗原的一部分的第二抗体一起培育。第二抗体一般带有与其相连的用于指示第二抗体和抗原结合的报告分子。由相连的报告分子所确定的结合的标记抗体的数量，与被固定的第一抗体上固着的抗原的数量成比例。

替代性方法包括在生物学样本中固定抗原，然后将固定的抗原暴露于用或不用报告分子标记的专一抗体。根据靶的数量和报告分子信号强度，固着的抗原也可被抗体的直接标记所探测。替代性地，被标记的专一抗第一抗体的第二抗体暴露于靶-第一抗体复合物以形成靶-第一抗体-第二抗体的三体复合物。复合物通过报告分子发射出的信号探测。

根据前述将会意识到与抗原结合分子相连的报告分子也许包括下列：

- (a) 报告分子直接附着于抗体；
- (b) 报告分子间接附着于抗体；即，报告分子附着于随后与抗体结合的另一分析试剂；和
- (c) 附着于抗体随后的反应产物。

报告分子也许选自色素原，催化剂，酶，荧光染料，化学发光分子，顺磁离子，镧系离子例如铕(Eu^{34})，放射性同位素，包括其它核标记和直接可视性标记。

在直接可视性标记的案例中，也许可应用胶状的金属或非金属颗粒，染色颗粒，酶或底物，有机聚合物，乳胶颗粒，脂质体，或其它包含有信号产生物质的小泡和类似物。

大量适合用作报告分子的酶在 U. S. Patent Nos. U. S. 4,366,241, U. S. 4,843,000, 和 U. S. 4,849,338 中公开。本发明中有用的合适的酶包括碱性磷酸酶，辣根过氧化物酶，荧光素酶， β -半乳糖苷酶，葡萄糖氧化酶，溶菌酶，苹果酸脱氢酶和类似物。酶也许单独使用，也许与溶液中的第二种酶结合使用。

合适的荧光染料包括，但不限于，异硫氰酸荧光素 (FITC)，四甲基若丹明异硫氰酸 (TRITC)，R-藻红素 (RPE)，和 Texas Red. 其它示例性的荧光染料包括那些被 Dower 等，International Publication No. W093/06121 所讨论的。也可以参考 U. S. Patent Nos. 5,573,909 (Singer 等)，5,326,692 (Brinkley 等) 中描述的荧光染料。替代性地，可以参考 U. S. Patent Nos. 5,227,487; 5,274,113; 5,405,975; 5,433,896; 5,442,045; 5,451,663; 5,453,517; 5,459,276; 5,516,864; 5,648,270 和 5,723,218 中描述的荧光染料。

在酶免疫分析的案例中，酶被接合到第二抗体，一般通过戊二醛或高碘酸盐的方式。然而，正如易于被认识到的，存在大量多种的技术人员容易获得的接合技术。与专一性酶一起应用的底物一般被选出以在对应酶水解后产生可测到的颜色改变。合适的酶的实例如前所述。也可能采用产生荧光产物的荧光底物，而不是上面记录的色素原底物。在所有案例中，酶-标记抗体被加到第一抗体-抗原复合物中，使它们结合，然后洗去过量的试剂。含有合适底物的溶液然后被加入到抗体-抗原-抗体的复合物中。底物将和与第二抗体连接的酶反应，发出定性的可视信号（它也许可进一步被定量，通常用分光光度法），以指示在样本中出现的抗原的数量。

或者，荧光化合物例如荧光黄，若丹明和镧系，铕 (EU)，可被化学偶联到抗体，而不改变它们的结合能力。当被特定波长的光照射而激活时，荧光染料标记的抗体吸收光能，诱导分子中的可激发的状态，然后发射出光学显微镜可探测到的可视的特征颜色的光。荧光标记抗体被允许结合到第一抗体-抗原复合物。清洗掉未固着的试剂后，保留的三体复合物然后暴露于适当波长的光。观察到的荧光指出关注的抗原的存在。免疫荧光测定分析 (IFMA) 已在本领域中很好地建立起来，对本方法尤其有用。然而，其它报告分子，例如放射性同位素，化学发光或生物发光分子也可被采用。

(iv) aptamers 在筛选核酸分子或表达产物中的应用

(v) 基于除了上述点 (iii) 详述的那些方法之外的任何合适的功能测试、酶测试或免疫性测试，测定变化的蛋白表达

应当被理解的是，除筛选活化素 β_c 亚基蛋白水平或 mRNA 表达水平外，也许也需要测定 β_c 亚基是以单体还是二聚体形式存在，如果是二聚体，那么还需要测定它所形成的二聚体的性质。因此，本发明延伸到在所用的筛选方法中引入附加步骤，附加步骤涉及筛选活化素 β_A 、 β_B 、 β_D 或 β_E 亚基的一种或更多。此分析可与涉及活化素 β_c 的分析同时或随后完成。进一步地，涉及另外的非 β_c 亚基中的一种是否出现的分析可采用在此之前描述的技术来完成。

活化素 β_c 亚基的生物活性可根据活化素 β_c 亚基诱导或减少活化素二聚体形成的能力而被测定。二聚体形成可通过使用抗活化素 β_c 亚基的抗体对活化素 β_c 亚基的存在的确定的测量。

如上面详细叙述的，任何合适的技术可被用于探测活化素 β_c 或它的编码核酸分子。被选用的技术将很大程度上测定需要进行分析的生物样本的类型。这类测定在本领域技术人员所熟知的范围内。

在尤其优选的实施方案中，本发明的探测性分析利用基于抗体的方法而完成。

在某一实施例中，所述探测可涉及活化素 β 亚基二聚体分子。

因此，这里提供了在哺乳动物中探测以活化素 β_c 水平的调节为特征的病症的发作或易发作性的方法，所述水平相对于正常水平被调

节了, 所述方法包含:

(a) 将识别第一活化素 β 亚基的表位的第一抗体与来源于所述哺乳动物的生物学样本接触

(b) 允许第一抗体在所述样本中结合到所述第一活化素 β 亚基

(c) 清洗所述样本以充分除去未固着的物质

(d) 将所述样本与识别第二活化素 β 亚基的表位的第二抗体接触, 其中第二抗体被标记试剂所标记; 和

(e) 探测标记试剂以鉴别所述样本中的活化素 β_c 亚基二聚体, 其中第一或第二抗体识别活化素 β_c 亚基的表位。

所述病症优选为瘤形成状态, 所述调节优选为活化素 β_c 亚基水平的增加。

优选的是, 被探测的活化素 β_c 二聚体选自活化素 AC ($\beta_A - \beta_c$), 活化素 BC ($\beta_B - \beta_c$), 活化素 C ($\beta_c - \beta_c$), 活化素 CD ($\beta_c - \beta_D$) 或活化素 CE ($\beta_c - \beta_E$). 将被探测的活化素 β_c 二聚体最优选活化素 AC ($\beta_A - \beta_c$). 在此方法中, 优选第一抗体识别活化素 β_c 亚基的表位。

优选的是, 第二抗体识别活化素 β_A 或 β_B 亚基的表位。更优选的是, 第二抗体识别活化素 β_A 亚基的表位。优选的是, 步骤 (e) 包括对细胞或生物学样本中的活化素 β_c 二聚体进行定量。此方法的步骤可按照前面所描述的探测活化素 β_c 亚基方式来完成。

然而, 应当被理解的是, 这里并没有限制, 同时, 本发明延伸到对活化素 β_c 亚基进行单独检测, 无论是单体或二聚体形式。

在本发明的诊断方法中, 被提交的主体优选哺乳动物, 包括但不限于人类。提交的生物学样本优选血清, 组织培养上清物, 精浆, 细

胞裂解物，组织匀浆，生物体液，脑脊液或精液。生物学样本可以是组织或细胞的条件培养基的裂解物，尤其是将被诊断的疾病或病症是细胞性的时。如果被诊断的疾病或病症涉及生殖疾病或病症，那么生物学样本也许包括卵泡液、精液或精浆。

依照此优选的实施方案使用的术语"抗体"按最广泛的意思使用，具体涵盖了单克隆抗体，多克隆抗体，多特异性抗体（例如双特异性抗体）和抗体片段，只要它们特异结合到靶抗原上。抗体也许可从商业来源获得。

在此所用的术语"单克隆抗体"指从基本同型抗体群中得到的抗体，即构成该群体的单个抗体都是相同的，除了少量可能存在的天然突变。单克隆抗体高度专一地抗单一抗原位点。此外，与传统的典型的包含了抗不同决定簇（表位）的不同抗体的（多克隆）抗体制备物相反，每一单克隆抗体抗在抗原上的单一决定簇。术语"单克隆的"指从充分同型抗体群中得到的抗体的这种特征，而不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如，依照本发明应用的单克隆抗体可通过杂交瘤方法从噬菌体抗体库中分离而制得，或通过重组DNA方法制得。单克隆抗体也可从商业来源获得。

因此，合适的专一抗活化素 β_c 的抗体可包括，但不限于，多克隆、单克隆、嵌合地、单链、Fab片段和Fab表达库。为制备抗活化素 β_c 蛋白的单克隆抗体，任何在培养连续细胞系中提供抗体分子生产的技术都可应用。这类技术包括，但不限于，最初由Kohler和Milstein (Kohler G, Milstein C 1975, Nature 256: 495-7) 发展出的杂交瘤技术，trioma技术，人B-细胞杂交瘤技术 (Kozbar 1983 Immunology Today 4: 72) 和产生人单克隆抗体的EBV杂交瘤技术 (Cole 1985 Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy. In. Alan R. Liss, Inc: 77-96)。

本领域中熟知的多种程序可被用于生产抗活化素 β_c 蛋白的多克隆抗体。为生产抗体，多种宿主动物可通过注射活化素 β_c 蛋白而免疫化，这类宿主动物包括，但不限于，兔子、小鼠、大鼠等。根据宿主的种类，多种佐剂包括，但不限于，弗氏佐剂(完全和不完全的)，无机胶如氢氧化铝，表面活性物质如溶血卵磷脂、多聚醇、聚阴离子、肽、油乳剂、二硝基酚，和潜在有用的人佐剂如卡介苗(BCG)，和短小棒状杆菌(*corynebacterium parvum*)，可被用于增加免疫性反应。

特异结合到活化素 β_c 的合适的抗体能以不同方式引入细胞，包括，例如将抗体微注射到细胞(Morgan和Roth, 1988, Immunol Today 9: 84-8)或将编码所需要的抗体的杂交瘤 mRNA 转化到细胞中(Burke和Warren, 1984, Cell 36: 847-56)。

抗体片段可通过本领域中熟知的技术产生。例如，这类片段包括但不限于，F(ab')₂片段(可通过抗体分子的胃蛋白酶消化产生)、Fab'片段(可通过还原F(ab')₂片段的二硫键连接而产生)、Fab片段(可通过将抗体分子用木瓜蛋白酶和还原剂处理产生)和Fv片段。

在进一步的技术中，专一抗活化素 β_c 蛋白的重组抗体可工程化和在许多种细胞类型中异位地表达，以结合到活化素 β_c ，也以便阻断活化素 β_c 的二聚体化。

根据本发明的抗体的制备和应用可通过使用本领域中熟知的技术而实现，包括多种抗体标记技术和应用。合适的抗体标记包括，但不限于，放射性核苷酸，酶，底物，辅因子，抑制剂，荧光剂，化学发光剂，磁性颗粒和类似物。抗体也可在加入标记之前被处理，例如通过生物素化。

在此使用的术语"标记"指直接或间接接合或融合到试剂例如抗体的化合物或组合物，促进了它所接合或融合的物体被探测出。标记本身也许是可探测性的(例如放射性同位素标记或荧光标记)，或者在酶标记的案例中，也许催化了底物化合物或组合物的可探测的变化。标记也可包括在随后的步骤中加入标记例如生物素的步骤，然后用链霉抗生物素-碱性磷酸酶标记。

抗体的标记可直接或间接实现。众所周知的接合方法可用于将标记与抗体接触。优选的是，标记之后，未固着的标记使用本领域技术人员所熟知的纯化程序从标记的抗体中除去。抗体也可被分解以提供免疫球蛋白片段例如 IgG 或 IgM 片段。这些抗体片段可应用本领域人员所熟知的方法被分离，包括对 IgG 使用重组蛋白 G 或对 IgM 使用免疫沉淀。

最优选的是，活化素 β_c 单体或包括 β_c 的二聚体通过抗体被探测，其中抗体识别活化素 β_c 亚基表位。优选的是，抗体可以识别活化素 β_c 的单体或二聚体形式。更优选的是，抗体识别活化素 β_c 的表位，所述表位包含氨基酸序列 VPTARRPLSLLYYDRDSNIVKTDIPDMVVEAC (SEQ ID NO:1) 或其等价物。优选抗体是单克隆抗体。优选的是，抗体专一抗活化素 β_c 亚基。更优选的是，抗体专一抗人活化素 β_c 亚基。抗体也许是用活化素 β_c 亚基产生的小鼠单克隆抗体。最优选的是，抗体不与活化素 β_A 、 β_B 或 β_E 肽段交叉反应。

优选的是，活化素 β_c 抗体以基于 ELISA 的方法应用于本发明的诊断方法。

在最优选的实施方案中，本发明涉及探测活化素 AC (活化素 β_A - β_c 二聚体) 的水平。在本发明的此优选方面的上下文中，和在此采用的基于抗体的优选方法方面，所选的基于抗体的筛选分析方法采用了

抗活化素 β_c 亚基表位的第一抗体和抗活化素 β_A 亚基表位的第二抗体。

在最优选实施方案中，在此描述的诊断方法包括确定存在于待测试的生物学样本中的活化素 β_c 单体或二聚体的数量的步骤。

生物学样本也可在将样本与第一抗体接触前被预处理。例如，样本也许用合适的稀释剂如组织培养基和/或 PBS 稀释。在将样本与第一抗体接触前，样本也许优选性地与 SDS 混合加热而变性。生物学样本也许优选性地被氧化处理。更优选的是，样本中的活化素 β_c 亚基被氧化，以使活化素 β_c 亚基中的甲硫氨酸被氧化。合适的氧化剂如 H_2O_2 也可被加入生物学样本以氧化活化素 β_c 亚基中的甲硫氨酸。

在优选的实施方案中，方法包括在样本中加入解离试剂以除去结合蛋白的附加步骤。解离试剂优选在步骤 (a) 前加入。除去的结合蛋白优选选自滤泡素抑制素 (follistatin), BMP 或 α -2 巨球蛋白。SDS 也可作为除去结合蛋白如滤泡素抑制素, BMPs 或 α -2 巨球蛋白等的解离试剂而优选被加入到样本中。然而，其它解离试剂包括 McFarlane 等, 1996 *Eur J Endocrinol* 134: 481-9 中发表的那些作为有用的解离试剂被描述的脱氧胆酸钠, Tween 20, SDS。结合蛋白如滤泡素抑制素以高亲和性结合到活化素 A, B 的 β 亚基, 以低亲和性结合到抑制素 A 和 B。滤泡素抑制素也可结合到活化素 β_c 亚基。因此, 优选使用解离步骤去除结合蛋白。

在方法的步骤 (b) 中, 第一抗体被允许结合到样本中的第一活化素 β 亚基。这可通过将第一抗体和生物学样本在合适的条件下培育而优选实现。例如, 可以应用合适的培养基, 包括 BSA 和/或 PBS, 优选应用不含活化素的血清。最优选的是, 样本在潮湿环境下培育过夜。

在方法的步骤 (c) 中, 样本被清洗以充分除去样本中任何未固着的物质。样本在任何合适的清洗溶液中清洗, 清洗溶液优选包括水或 PBS。样本优选被清洗, 以便标记抗体特异结合到靶活化素亚基。

在方法的步骤 (d) 中, 样本与识别第二活化素 β 亚基表位的第二抗体接触。第二抗体优选识别活化素 β_A 、 β_B 、 β_C 、 β_D 或 β_E 亚基的表位。更优选的是, 第二抗体识别活化素 β_A 亚基表位。第二抗体也许是单克隆或多克隆抗体, 可通过前面讨论的方法产生。

第二抗体需要被标记试剂标记。根据本发明的抗体的制备和应用可通过使用本领域中熟知的技术而实现, 包括多种抗体标记技术和应用。合适的抗体标记包括, 但不限于, 放射性核苷酸, 酶, 底物, 辅因子, 抑制剂, 荧光剂, 化学发光剂, 磁性颗粒和类似物。在加入标记前, 抗体也可被处理例如通过生物素化。

被标记试剂标记的第二抗体, 正如在此之前所描述的, 典型地被表示为"标记抗体", 而在颜色探测方法中优选使用。第二抗体也许固着于标记试剂例如生物素, 其中对标记的探测通过带色的酶反应产物来完成。其它标记优选包括使用被碱性磷酸酶直接标记的活化素 β 亚基抗体。

在方法的步骤 (e) 中, 结合于标记的第二抗体的活化素二聚体被探测。探测方法依赖于用于标记第二抗体的标记试剂和其后的链霉抗生物素碱性磷酸酶的加入。探测优选包括对来自试剂盒试剂的颜色探测。例如, 颜色也许通过使用标准微板阅读器而读出。对活化素 AC 水平或生物活性的计算基于已知数量活化素 AC 的标准曲线。例如, 牛滤泡液和人重组或纯化的活化素 AC 蛋白可被用作活化素 AC 分析的标准物。优选的是, 步骤 (e) 包括对生物学样本中的活化素 β_C 二聚体的定量。

在替代性实施方案中，方法也许以相反方式（交换俘获物和标记抗体）完成。例如，活化素 β_A 抗体也许被涂在板上，而活化素 β_C 抗体也许被标记。然而，由于活化素 A ($\beta_A - \beta_A$) 在一定样本中的高含量将导致分析灵敏度降低，这一方法并不太优选。

然而本发明的另一方面涉及用于探测以活化素 β_C 水平或生物活性的调节为特征的病症的发作或易发作性的组合物，与此前所述的方法一致，所述组合物包含活化素 β_C 探测手段。

更优选的是，本发明提供了用于探测以活化素 β_C 水平或生物活性的调节为特征的病症的发作或易发作性的组合物，其中所述组合物包含抗活化素 β_C 亚基的表位的抗体与合适的稀释剂、赋形剂或载体。

所述病症优选为瘤形成状态。

仍更优选的是，所述抗体可以在活化素 β_C 亚基的单体或二聚体形式的环境中识别活化素 β_C 亚基。最优选的是，所述抗体抗活化素 β_C 的表位，该表位包含氨基酸序列：VPTARRPLSLLYDRDSNIVKTDIPDMVVEAC (SEQ ID NO :1)。

在此之前描述的组合物优选包括与活化素 β_C 亚基探测手段尤其是被应用的抗体相容的合适的稀释剂，赋形剂或载体。可接受的载体、赋形剂或稀释剂也许包括水，盐溶液，BSA，Triton X-100。优选的组合物是消毒过的水溶液。组合物也可包含缓冲剂，稀释剂和其它合适的添加剂。组合物也可包括与识别活化素 β_C 亚基表位的抗体相容的其它附属成分，例如标记试剂或染料。

本发明的又一方面提供了用于探测以活化素 β_C 亚基水平或生物

活性的调节为特征的病症的发作或易发作性的诊断试剂盒，所述试剂盒包含了第一区室中的活化素 β_c 亚基蛋白和/或编码核酸探测手段，和第二区室中的对促进以所述探测手段进行的探测有益的试剂。更多的区室也可被包括在内，例如以包括促进生物样本的采集和储存的手段。

优选的所述探测手段是正如在此之前所描述的抗体。

本发明的试剂盒中，可以包括前面所述的第一抗体和第二抗体。第一抗体优选识别活化素 β_c 亚基表位。第二抗体识别活化素 β_A 、 β_B 、 β_C 、 β_D 或 β_E 亚基表位。更优选的是，第二抗体识别活化素 β_A 亚基表位。优选的是，第一或第二抗体是可以识别活化素 β_c 的单体和二聚体形式的纯化的抗体。更优选的是，抗体包含下列氨基酸序列的活化素 β_c 表位：VPTARRPLSLLYDRDSNIVKTDIPDMVVEAC (SEQ ID NO: 1)。

本发明不受限于任一理论或作用模式，有观点认为活化素 β_c 亚基可与非活化素 β_c 亚基二聚体化，以抑制活化素A，活化素B，活化素AB或其它活化素二聚体的形成。因此，对活化素 β_c 亚基水平或生物活性的调节提供了调节这些活化素二聚体生物活性的方法。因此，在相关的方面，本发明的发现现在促进了对于涉及治疗和/或预防性治疗此前所述的病症特别是瘤形式状态的方法学的合理设计。这些方法基于这样的理念，即向下调节活化素 β_c 水平下调了包含活化素 β_c 的二聚体的形成，继而上调了非活化素 β_c 亚基二聚体如活化素A，活化素B或活化素AB二聚体的水平。

非活化素 β_c 二聚体形成的上调是否有益将依赖于所讨论的病症的本质。正如在此之前所描述的，活化素 β_c 水平的增加指示了瘤形成的发作，人们将寻求在治疗性治疗方案中减少活化素 β_c 水平，以使非活化素 β_c 二聚体水平正常化。相反的方法可在活化素 β_c 水平的降低

与所讨论的病症的发作相关联的情况下应用。所述病症优选为异常的细胞生长。

因此，本发明的另一方面涉及调节细胞异常生长的方法，所述方法包含活化素 β_c 亚基水平或生物活性的调节。

所述活化素 β_c 亚基水平或生物活性优选在细胞内调节。

应当被理解的是，活化素 β_c 亚基水平的调节可通过调节单体或二聚体活化素 β_c 亚基水平而实现。

在某一优选的实施方案中，本发明涉及调节细胞异常生长的方法，所述方法包含调节活化素 β_c 亚基的水平或生物活性，其中向上调节活化素 β_c 亚基水平或生物活性至功能上无效的水平将诱导所述异常生长，向下调节活化素 β_c 亚基水平或生物活性至功能上无效的水平将抑制所述异常生长。

在另一优选实施方案中，本发明涉及调节细胞异常生长的方法，所述方法包含调节活化素 β_c 亚基的水平或生物活性，其中向下调节活化素 β_c 亚基水平或生物活性至功能上有效的水平将诱导所述异常生长，向上调节活化素 β_c 亚基水平或生物活性至功能上无效的水平将抑制所述异常生长。

更特别地，本发明涉及调节赘生性细胞生长的方法，所述方法包含调节活化素 β_c 亚基的水平或生物活性，其中向上调节活化素 β_c 亚基水平或生物活性至功能上有效的水平将诱导形成瘤的生长，向下调节活化素 β_c 亚基水平或生物活性至功能上无效的水平将抑制所述形成瘤的生长。

提法"异常生长"和"赘生性细胞"应被理解为具有相同的含义，如在此之前所述的。

所述瘤形成状态优选为胰腺，脑和神经组织，肾上腺，甲状腺，胃，结肠，膀胱，子宫内膜，乳腺，淋巴结，皮肤，唾液腺，骨，鼻腔，十二指肠，胆囊，子宫颈，胸腺，输卵管，子宫，扁桃腺，脾，阑尾，精囊，喉，舌，小肠，直肠，食管，子宫肌层和软组织的恶性瘤形成，或者输卵管，子宫，扁桃腺，脾，阑尾，精囊，子宫肌层和软组织的非恶性瘤形成。

提法“活化素 β_c ”应被理解成与在此之前的定义相同的意思，但另外包括表示其同源物。所述活化素 β_c 优选如在此之前所定义的活化素 β_c 亚基。

提法"调节"应被理解为表示向上调节或向下调节所提到的细胞生长。因此，提法"向下调节"细胞生长应被理解为表示防止、减少（例如减缓）或抑制细胞生长的一个或多个方面，而提法"向上调节"应被理解为具有相反意思。虽然有鉴于此，优选的方法是向下调节赘生性细胞的生长或具有此倾向的细胞转进瘤形成状态，但是本发明也延伸到向上调节细胞生长，它也许在某些情况下需要。例如，也许寻求利用本发明的方法在体外诱导赘生性细胞表型，以使筛选其它潜在的治疗方法。

依照某一优选的方面，本发明因此优选性地提供向下调节赘生性细胞生长的方法，所述方法包含向下调节活化素 β_c 亚基水平或生物活性至功能上无效的水平。

在此的提法，达到活化素 β_c 亚基的"功能上有效水平"或"功能上

无效水平", 应被理解为表示达到可实现调节细胞生长的活化素 β_c 亚基水平, 而无论是向上调节或向下调节。在这方面, 使用常规方法确定活化素 β_c 亚基表达的阈值水平在本领域普通技术人员的技术范围之内, 其中活化素 β_c 亚基表达高于或低于所述阈值可以调节细胞生长。依照在此提供的公开内容, 这些水平优选相对于正常水平进行评估。

应当被理解的是, 提法"有效水平"表示至少部分实现所期望的反应所需要的水平。根据被处理的细胞群和/或个体的分类, 或其健康和生理状态, 所期望的向上或向下调节的程度, 所用组合物的配方, 医学条件的评估和其它相关因素, 数值会有变化。因此, 可以预计此水平可随个体条件而改变, 因而具有较宽的范围, 它可通过常规试验而确定。

活化素 β_c 亚基水平或生物活性的调节可通过任何包括但不限于下列的方式实现:

- (i) 调节活化素 β_c 亚基绝对水平, 以致更多或更少的活化素 β_c 亚基出现在细胞环境中。
- (ii) 激动或拮抗活化素 β_c 亚基蛋白功能活性, 以致活化素 β_c 亚基的功能有效性增加或减少。例如, 增加活化素 β_c 亚基半衰期可实现活化素 β_c 亚基功能有效水平的增加, 而没有实质性地迫使活化素 β_c 亚基的绝对浓度增加。类似地, 对活化素 β_c 亚基的部分拮抗作用可使所述活化素 β_c 亚基功能有效性降低, 虽然不是完全消除。

因此, 对于向下调节活化素 β_c 亚基功能而不必然地向下调节活化素 β_c 亚基绝对浓度, 这里提供了一种方法。

关于实现向上或向下调节活化素 β_c 亚基，实现这一目标的方法为本领域技术人员所熟知，其包括，但不限于：

- (i) 将编码活化素 β_c 亚基的核酸分子引入细胞，以向上调节所述细胞表达活化素 β_c 亚基的能力
- (ii) 在细胞中引入调节基因的转录和/或翻译的蛋白的或非蛋白的分子，其中此基因也许是活化素 β_c 亚基基因或其功能的部分或某些其它直接或间接调节活化素 β_c 亚基基因表达的基因或基因区域（例如 启动子区域）
- (iii) 在细胞中引入活化素 β_c 亚基表达产物。
- (iv) 引入蛋白的或非蛋白的分子，作为活化素 β_c 亚基表达产物的拮抗物。
- (v) 引入蛋白的或非蛋白的分子，作为活化素 β_c 亚基表达产物的激动物。

上述的蛋白的分子可来自于任何合适的来源，例如天然、重组或合成来源，包括按照例如天然产物筛选的方法而鉴别出的融合蛋白或分子。提法“非蛋白的分子”也许，例如，指核酸分子，或也许来自天然来源例如天然产物筛选的分子，或化学合成的分子。本发明涉及活化素 β_c 亚基表达产物的类似物或可充作激动剂或拮抗剂的小分子。化学激动剂也许不是必然来源于活化素 β_c 亚基表达产物，但也许具有了一定的构象类似之处。替代性地，化学激动剂也许被特异性设计成满足一定的生理化学性质。拮抗剂也许是可以阻断、抑制或防止活化素 β_c 亚基行使其正常生物学功能的任何化合物。拮抗剂包括单克隆抗体和防止活化素 β_c 亚基基因或 mRNA 在哺乳动物细胞中的转录或翻译

的反义核酸。利用抗原, RNA, 核糖体, DNA 酶, aptamers, 抗体或适合在共抑制中应用的分子, 可实现表达调节。活化素 β 。合适的反义寡核苷酸序列 (单链 DNA 片段) 可通过它们抑制活化素 β 。表达的能力而创造出或鉴别出。给定蛋白的反义寡核苷酸的产生在例如, Stein 和 Cohen, 1988 (Cancer Res 48: 2659-68) 和 van der Krol 等, 1988 (Biotechniques 6: 958-976) 中被描述。

上述点 (i) - (v) 中引用的蛋白的和非蛋白的分子在此集中表示为 "调节剂"。一旦寻求减少活化素 β 。亚基水平或生物活性, 所述调节剂优选为抗体。

此前所定义的调节剂的筛选可通过几种合适的方法中的任一种而实现, 这些方法包括, 但绝不限于将包含活化素 β 。亚基基因或功能等价物或其衍生物的细胞与试剂相接触, 筛选对活化素 β 。亚基蛋白产生或功能活性的调节, 或者对编码活化素 β 。亚基的核酸分子的表达的调节, 或者对活化素 β 。亚基的细胞下游靶的活性或表达的调节。对此类调节的探测可利用技术如 Western blotting、电泳迁移率变化分析和/或活化素 β 。亚基活性的报告分子如荧光素酶, CAT 和类似物的读出而实现。

应当被理解的是, 活化素 β 。亚基基因或功能等价物或其衍生物可在作为测试主体的细胞中自然产生, 或者它可被转染进宿主以实现测试目的。进一步地, 自然产生或转染的基因也许组成性地表达——继而提供了筛选在核酸或表达产物水平下调活化素 β 。亚基表达的试剂的有用模型, 或者该基因需要被活化——从而提供了筛选上调活化素 β 。亚基表达的试剂的有用模型。进一步地, 一旦活化素 β 。亚基核酸分子将被转染进细胞, 那种分子也许就包含完整的活化素 β 。亚基基因, 或者它也许只包含基因的一部分例如调节活化素 β 。亚基产物表达的部分。例如活化素 β 。亚基启动子区域可被转染进待测试的细胞。考虑

到此，只利用启动子时，对启动子活性的调节的探测可以实现，例如，通过将启动子连接于报告基因。例如，启动子可被连接到荧光素酶或CAT报告分子，通过分别调节荧光强度或CAT报告分子活性，探测出所述基因表达的调节。在另一实施例中，探测对象可以是活化素 β_c 亚基的下游调节靶，而不是活化素 β_c 亚基本身。另一实施例包括活化素 β_c 亚基结合位点连接到最小报告子上。活化素 β_c 亚基活性的调节可通过筛选细胞生长的调节而探测。这是活化素 β_c 亚基表达的调节本身不是探测对象的间接系统的实施例。更适合的是，监测被活化素 β_c 亚基调节的下游活性的调节。

这些方法提供完成高通量筛选推定的调节剂的机制，例如包含合成、重组、化学和自然文库的蛋白的或非蛋白的试剂。这些方法也将促进对与活化素 β_c 亚基核酸分子或表达产物本身结合，或调节上游分子表达（上游分子随后调节活化素 β_c 亚基表达或表达产物活性）的试剂的探测。因此，这些方法提供探测直接或间接调节活化素 β_c 亚基表达和/或活性的试剂的机制。

依照本发明的方法而利用的试剂可采用任何合适的形式。例如，蛋白试剂也许多种程度地糖基化或非糖基化、磷酸化或去磷酸化，和/或也许包含一套被应用，连接，固着或与蛋白相连的其它分子，例如氨基酸，脂类，糖类或其它肽段，多肽或蛋白。类似地，非蛋白的分子主体也可采用任何合适的形式。在此描述的蛋白试剂和非蛋白试剂都可被连接，固着，或与任何其它蛋白的或非蛋白的分子相连。例如，在本发明的一个实施方案中，所述试剂与允许靶向于被定位区域的分子相连。

蛋白的或非蛋白的分子主体也许直接或间接发挥作用，以调节活化素 β_c 亚基的表达或活化素 β_c 亚基表达产物的活性。如果它与活化素 β_c 亚基核酸分子或表达产物相连，所述分子直接发挥作用以分别调

节表达或活性。如果它与活化素 β _c亚基核酸分子或表达产物之外的其它分子相连，所述分子间接发挥作用，这些其它分子直接或间接分别调节活化素 β _c亚基核酸分子或表达产物的表达或活性。因此，本发明的方法包括通过诱导调节步骤的级联而对活化素 β _c亚基核酸分子表达或表达产物进行活性的调节。

术语"表达"指核酸分子的转录和翻译。提法"表达产物"指从核酸分子转录和翻译产生出的产物。提法"调节"应被理解为表示向上调节或向下调节。

在此描述的分子的“衍生物”（例如活化素 β _c亚基或其它蛋白或非蛋白试剂）包括自然或非自然来源的片段、局部（part）、部分或变体。非自然来源包括，例如，重组或合成性的来源。“重组来源”表示产生所述分子的细胞来源已被遗传改变。这也许会发生，例如，以便增加或提高通过那一特定细胞来源的生产的产率和产量。局部或片段包括，例如分子的活性区域。衍生物也许来源于氨基酸的插入、删除或置换。氨基酸插入性衍生物包括氨基端和/或羧基端的融合，也包括单一或多重氨基酸的序列内插入。插入性氨基酸序列变体是那些在蛋白质的预定位点引入一个或多个氨基酸残基的类型，虽然随机插入也可能通过对最终产物进行的合适筛选而成为可能。删除变体的特征为从序列中去除了一个或多个氨基酸。置换性氨基酸的变体是那些至少序列中的一个残基被去除而在它的位置插入了不同残基的类型。氨基酸序列的添加包括与其它肽段、多肽或蛋白的融合，如上面详述的一样。

衍生物也包括具有特定表位，或与肽段、多肽或其它蛋白的或非蛋白的分子融合的完整蛋白的部分的片段。例如，活化素 β _c亚基或其衍生物可与某一分子融合，以促进它进入细胞。在此涉及的分子的类似物包括，但不限于，侧链的修饰、在肽段、多肽或蛋白的合成中非

天然氨基酸和/或它们的衍生物的整合和交联剂的应用和对蛋白分子或其类似物施加构象限制的其它方法。

依照本发明的方法被利用的核酸序列的衍生物也许类似地来源于单一或多重的核苷酸的置换、删除和/或添加，包括与其它核酸分子的融合。本发明中所用的核酸分子衍生物包括寡核苷酸、PCR 引物、反义分子、适合用于共抑制的分子和核酸分子融合体。核酸序列衍生物也包括简并变体。

活化素 β_c 亚基的"变体"或"突变体"应被理解成显示至少部分活化素 β_c 亚基形式的功能活性的分子，而它可能是变体或突变体。变体或突变可采用任何形式，也许是自然或非自然发生。

"同源物"表示来源于依照本发明方法而正被处理的物种之外的物种的分子。这也许发生在例如下面的情况中，已确定正被处理的物种之外的某一物种，产生显示与正被经历处理的主体所自然产生的活化素 β_c 亚基相类似和合适的功能特征的活化素 β_c 亚基的形式。

化学和功能上的等价物应被理解为显示主题分子的任何一种或多种功能活性的分子，功能等价物也许来自于任何的来源例如化学合成或通过筛选过程如自然产物筛选而得到确定。例如，化学或功能等价物可利用众所周知的方法如组合化学库或重组库的高通量筛选或用自然产物筛选而被设计和/或鉴别。拮抗剂也可用这类方法筛选得到。

例如，可筛选包含有机小分子的库，其中具有大量专一亲本基因取代的有机分子被应用。通常的合成设计可依照已出版的方法（例如 Bunin BA, 等. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91: 4708-4712; DeWitt SH, 等. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6909-6913). 简而言之，在每一连续的合成步骤中，被选定的多种不同取代基中的

一种被加到阵列中试管亚组中的每一个中，该试管亚组的挑选是为了产生在产生文库时所用不同取代基的所有可能的排列。某一合适的排列策略在 US. Patent No. 5,763, 263 中做了简要描述。

在应用随机有机分子的组合库以搜寻生物活性化合物方面，目前存在广泛关注（参看例如 U. S. Patent No. 5,763, 263）。筛选此类型库所发现的配体，也许在模拟或阻断自然配体或者干扰自然产生的生物学靶的配体中 useful。在本发明上下文中，例如，它们可被用作制备活化素 β_c 亚基类似物的起点，该活化素 β_c 亚基类似物指显示出例如更有效的药理效用的性质的类型。活化素 β_c 亚基或其功能性的部分可根据本发明在通过多种固相或液相合成方法形成的组合文库中应用（参看例如 U. S. Patent No. 5,763, 263 和其中引用的参考文献）。通过技术的应用，例如在 U. S. Patent No. 5,753, 187 中公开的技术，百万计的化学和/或生物学化合物可在不到数周的时间里被常规筛选出。在被鉴别的巨大数量的化合物中，只有那些显示出合适的生物学活性的个体被进一步分析。

关于文库筛选的高通量方法方面，可与选定的生物学试剂特异地相互作用的寡聚性或小分子的文库化合物，例如生物分子、大分子复合物、或细胞，利用很容易被本领域技术人员从例如如上所述的熟知的方法的范围中选定的组合文库设备而被筛选。在这样的方法中，筛选文库中的每一成员与选定的试剂特异性地相互作用的能力。在实践此方法中，生物学试剂被加入含有化合物的试管中，而允许与在每一试管中的文库化合物个体相互作用。相互作用被设计成产生可探测的信号，该信号可被用于监测所期望的相互作用的存在。优选地，生物学试剂在水溶液中存在，进一步的条件依赖于所期望的相互作用而被调整。探测可被完成，例如通过任何众所周知的基于功能性或非功能性的用于物质探测的方法。

除了对模仿活化素 β 。亚基活性的分子的筛选外,可鉴别和利用激动或拮抗活化素 β 。亚基而发挥作用的分子,以上调或下调活化素 β 。亚基与调节细胞生长相关的功能活性。这类分子的应用在下面更详细地被描述。一旦主题分子是蛋白的,它也许来源于,例如,来自自然或重组的来源,包括融合蛋白或根据例如上面描述的筛选方法而得到的。非蛋白的分子也许是,例如,化学或合成的分子,其也依照上述所确定的方法学而被鉴别或产生。因此,本发明涉及可扮演激动剂或拮抗剂角色的活化素 β 。亚基化学类似物的应用。化学激动剂也许不是必然来源于活化素 β 。亚基,但可与其分享一定的构象相似性。替代性地,化学激动剂可被特异设计成模仿一定的活化素 β 。亚基的生理化学性质。拮抗剂也许是可以阻断、抑制或防止活化素 β 。亚基发挥正常生物学功能的任何化合物。拮抗剂包括专一抗活化素 β 。亚基或活化素 β 。亚基部分的单克隆抗体。

在此涉及的活化素 β 。亚基或活化素 β 。亚基的激动剂或拮抗剂类似物包括,但不限于,对侧链的修饰,在肽段、多肽或蛋白的合成中整合非天然氨基酸和/或衍生物,和交联剂的应用,及其它对类似物施加构象限制的方法。这类修饰可采取的专一形式将取决于主题分子是蛋白的还是非蛋白的。特定修饰的性质和/或适宜性可被本领域技术人员常规确定。

例如,本发明涉及的侧链修饰的实施例包括对氨基的修饰,例如通过与醛类反应和随后被 NaBH_4 还原的还原性烷基化;甲基乙酰亚胺酸的脘化;使用乙酸酐的酰基化;用氰酸盐对氨基甲酰化;用2,4,6-三硝基苯磺酸(TNBS)对氨基的三硝基苯化;用琥珀酸酐和四氢化邻苯二甲酸酐对氨基的酰基化;和以5-磷酸吡多醛对赖氨酸吡啶化(pyridoxylation)后以 NaBH_4 还原。

精氨酸残基的胍基可通过与试剂如2,3-丁二酮,苯甲酰甲醛和

乙二醛反应后形成杂环稠合产物而被修饰。

羧基可通过以 O-酰基异脲素 (O-acylisourea) 对碳二亚胺活化而形成, 然后进行, 例如, 随后的衍生化至相应的酰胺而被修饰。

巯基也许通过以下方法而被修饰, 例如以碘乙酸或碘乙酰胺羧甲基化; 过甲酸氧化成磺基丙氨酸; 形成与其它硫醇化合物的混合二硫化物; 与马来酰亚胺、马来酐或其它取代的马来酰亚胺反应; 应用 4-氯汞基苯甲酸, 4-氯汞基苯磺酸, 氯汞苯 (phenylmercury chloride), 2-氯汞基-4-硝基苯酚和其它汞化物形成汞衍生物; 在碱性 pH 下采用氰酸盐的甲氨酰化。

色氨酸残基也许通过以下方法被修饰, 例如, 以 N-溴丁二酰亚胺氧化, 或以 2-羟-5-硝基苄溴化物或硫苯基卤 (sulphenyl halide) 对吲哚环烷基化。另一方面, 酪氨酸残基也许通过以四硝基甲烷进行硝化而形成 3-硝基酪氨酸衍生物。

组氨酸残基咪唑环的修饰也许通过以碘乙酸衍生物进行烷基化或以焦碳酸二乙酯进行 N-羧乙氧基化 (N-carboethoxylation) 而完成。

在蛋白合成中整合的非天然氨基酸和衍生物的实施例包括, 但不限于, 正亮氨酸, 4-氨基丁酸, 4-氨基-3-羟基-5-苯戊酸, 6-氨基己酸, 叔丁基甘氨酸, 正缬氨酸, 苯基甘氨酸, 鸟氨酸, 肌氨酸, 4-氨基-3-羟基-6-甲基庚酸, 2-噻吩基丙氨酸 和/或氨基酸 D-异构体。在此涉及的非天然氨基酸的清单显示在表 1 中。

表 1

非传统氨基酸	代码	非传统氨基酸	代码
α -氨基丁酸	Abu	L-N-甲基丙氨酸	Nmala
α -氨基- α -甲基丁酸	Mgab u	L-N-甲基精氨酸	Nmarg
氨基环丙烷羧酸	Cpro	L-N-甲基天冬酰胺	Nmasn
		L-N-甲基天冬氨酸	Nmasp
氨基异丁酸	Aib	L-N-甲基半胱氨酸	Nmcys
氨基降冰片羧酸	Norb	L-N-甲基谷氨酰胺	Nmgln
		L-N-甲基谷氨酸	Nmglu
环己基丙氨酸	Chexa	L-N-甲基组氨酸	Nmhis
环戊基丙氨酸	Cpen	L-N-甲基异亮氨酸	Nmile
D-丙氨酸	Dal	L-N-甲基亮氨酸	Nmleu
D-精氨酸	Darg	L-N-甲基赖氨酸	Nmlys
D-天冬氨酸	Das p	L-N-甲基甲硫氨酸	Nmmet
D-半胱氨酸	Dcys	L-N-甲基正亮氨酸	Nmnle
D-谷氨酰胺	Dgln	L-N-甲基正缬氨酸	Nmnva
D-谷氨酸	Dglu	L-N-甲基鸟氨酸	Nmorn
D-组氨酸	Dhis	L-N-甲基苯丙氨酸	Nmphe
D-异亮氨酸	Dile	L-N-甲基脯氨酸	Nmpro
D-亮氨酸	Dleu	L-N-甲基丝氨酸	Nmser
D-赖氨酸	Dlys	L-N-甲基苏氨酸	Nmthr
D-甲硫氨酸	Dmet	L-N-甲基色氨酸	Nmtrp
D-鸟氨酸	Dorn	L-N-甲基酪氨酸	Nmtyr
D-苯丙氨酸	Dphe	L-N-甲基缬氨酸	Nmval
D-脯氨酸	Dpro	L-N-甲基乙基甘氨酸	Nmetg
D-丝氨酸	Dser	L-N-甲基-t-丁基甘氨酸	Nmtbug
D-苏氨酸	Dthr	L-正亮氨酸	Nle
D-色氨酸	Dtrp	L-正缬氨酸	Nva
D-酪氨酸	Dtyr	α -甲基-氨基异丁酸	Maib
D-缬氨酸	Dval	α -甲基--氨基丁酸	Mgab u
D- α -甲基丙氨酸	Dmala	α -甲基环己基丙氨酸	Mchexa
D- α -甲基精氨酸	Dmarg	α -甲基环戊基丙氨酸	Mcpen
D- α -甲基天冬酰胺	Dmasn	α -甲基- α -萘丙氨酸	Manap
D- α -甲基天冬氨酸	Dmasp	α -甲基青霉胺	Mpen
D- α -甲基半胱氨酸	Dmcys	N-(4-氨基丁基)甘氨酸	Nglu
D- α -甲基谷氨酰胺	Dmgln	N-(2-氨基乙基)甘氨酸	Naeg
D- α -甲基组氨酸	Dmhis	N-(3-氨基丙基)甘氨酸	Norn
D- α -甲基异亮氨酸	Dmile	N-氨基- α -甲基丁酸	Nmaabu
D- α -甲基亮氨酸	Dmleu	α -萘丙氨酸	Anap

D- α -甲基赖氨酸	Dmlys	N-苯甲基甘氨酸	Nphe
D- α -甲基甲硫氨酸	Dmmet	N-(2-氧乙酰乙基)甘氨酸	Ngln
D- α -甲基鸟氨酸	Dmorn	N-(氧乙酰甲基)甘氨酸	Nasn
D- α -甲基苯丙氨酸	Dmphe	N-(2-羧乙基)甘氨酸	Nglu
D- α -甲基脯氨酸	Dmpro	N-(羧甲基)甘氨酸	Nasp
D- α -甲基丝氨酸	Dmser	N-环丁基甘氨酸	Ncbut
D- α -甲基苏氨酸	Dmthr	N-环庚基甘氨酸	Nchep
D- α -甲基色氨酸	Dmtrp	N-环己基甘氨酸	Nchex
D- α -甲基酪氨酸	Dmty	N-环癸基甘氨酸	Ncdec
D- α -甲基缬氨酸	Dmval	N-环十二烷基甘氨酸	Ncdod
D-N-甲基丙氨酸	Dnmla	N-环辛基甘氨酸	Ncoct
D-N-甲基精氨酸	Dnmarg	N-环丙基甘氨酸	Ncpro
D-N-甲基天冬酰胺	Dnmasn	N-环十一烷基甘氨酸	Ncund
D-N-甲基天冬氨酸	Dnmasp	N-(2,2-联苯乙基)甘氨酸	Nbhm
D-N-甲基半胱氨酸	Dnmcys	N-(3,3-联苯丙基)甘氨酸	Nbhe
D-N-甲基谷氨酰胺	Dnmglu	N-(3-胍基丙基)甘氨酸	Narg
D-N-甲基谷氨酸	Dnmglu	N-(1-羟基乙基)甘氨酸	Nthr
D-N-甲基组氨酸	Dnmhis	N-(羟基乙基)甘氨酸	Nser
D-N-甲基异亮氨酸	Dnmile	N-(咪唑基乙基)甘氨酸	Nhis
D-N-甲基亮氨酸	Dnmlcu	N-(3-吡啶乙基)甘氨酸	Nhtrp
D-N-甲基赖氨酸	Dnmlys	N-甲基- γ -氨基丁酸	Nmgabu
N-甲基环己基丙氨酸	Nmchexa	D-N-甲基甲硫氨酸	Dnmmet
D-N-甲基鸟氨酸	Dnmorn	N-甲基环戊基丙氨酸	Nmcpen
N-甲基甘氨酸	Nala	D-N-甲基苯丙氨酸	Dmphe
N-甲基氨基异丁酸	Nmaib	D-N-甲基脯氨酸	Dmpro
N-(1-甲基丙基)甘氨酸	Nile	D-N-甲基丝氨酸	Dmser
N-(2-甲基丙基)甘氨酸	Nleu	D-N-甲基苏氨酸	Dmthr
D-N-甲基色氨酸	Dnmtrp	N-(1-甲基乙基)甘氨酸	Nval
D-N-甲基酪氨酸	Dnmtyr	N-甲基-萘丙氨酸	Nmanap
D-N-甲基缬氨酸	Dmval	N-甲基青霉胺	Nmpen
γ -氨基丁酸	Gabu	N-(p-羟苯基)甘氨酸	Nhtyr
L-t-丁基甘氨酸	Tbug	N-(硫甲基)甘氨酸	Ncys
L-乙基甘氨酸	Etg	青霉胺	Pen
L-高苯丙氨酸	Hphe	L- α -甲基丙氨酸	Mala
L- α -甲基精氨酸	Marg	L- α -甲基天冬酰胺	Masn
L- α -甲基天冬氨酸	Masp	L- α -甲基-t-丁基甘氨酸	Mtbug
L- α -甲基半胱氨酸	Mcys	L-甲基乙基甘氨酸	Metg
L- α -甲基谷氨酰胺	Mgln	L- α -甲基谷氨酸	Mglu
L- α -甲基组氨酸	Mhis	L- α -甲基高苯丙氨酸	Mhphe

L- α -甲基异亮氨酸	Mile	N-(2-甲基硫乙基)甘氨酸	Nmet
L- α -甲基亮氨酸	Mleu	L- α -甲基赖氨酸	Mlys
L- α -甲基甲硫氨酸	Mmet	L- α -甲基正亮氨酸	Mnle
L- α -甲基正缬氨酸	Mnva	L- α -甲基鸟氨酸	Morn
L- α -甲基苯丙氨酸	Mphe	L- α -甲基脯氨酸	Mpro
L- α -甲基丝氨酸	Mser	L- α -甲基苏氨酸	Mthr
L- α -甲基色氨酸	Mtrp	L- α -甲基酪氨酸	Mtyr
L- α -甲基缬氨酸	Mval	L-N-甲基高苯丙氨酸	Nmhpe
N-(N-(2,2-联苯乙基)氮甲酰甲基)甘氨酸			Nnbhm
N-(N-(3,3-联苯丙基)氮甲酰甲基)甘氨酸			Nnbhe
1-羧基-1-(2,2-联苯-乙基氨基)环丙烷			Nmbc

交联剂能被用于,例如,稳定3D构象,例如应用同型-双功能交联剂如具有(CH₂)_n间隔基团(其中n=1到6)的双功能亚胺酯、戊二醛、N-羟基琥珀酰亚胺酯和通常包含氨基反应性部分例如N-羟基琥珀酰亚胺和另一专一反应性的基团部分的异型-双功能试剂。

本发明的方法涉及体外和体内的细胞生长的调节。虽然优选的方法是在体内处理个体,然而也应该理解的是,本发明的方法也可在体外环境中应用,例如促进细胞系的产生。在另一实施例中,本发明的方法在体外环境中的应用也可提供用于如那些此前描述的筛选技术的读出机制。也就是,利用这些筛选技术鉴别的分子能被分析去用于观察它们对细胞生长的效用的程度和/或性质。

所述活化素 β_c 亚基功能水平的调节通过活化素 β_c 亚基编码活化素 β_c 亚基的核酸分子,或者影响活化素 β_c 亚基活性调节或活化素 β_c 亚基基因表达的试剂(在此集中性地表示为"调节剂")的施用而实现。优选地,所述方法用于在哺乳动物中向下调节赘生性细胞的细胞生长。

因此,在某一实施方案中,提供了在哺乳动物中向下调节赘生性细胞生长的方法,所述方法包含在足以诱导活化素 β_c 亚基功能上无效水平的条件下,对所述哺乳动物施用一定时间的有效量的试剂。

在另一实施方案中，提供了在哺乳动物中向下调节增生性细胞生长的方法，所述方法包含在足以诱导活化素 β_c 亚基功能上有效水平的条件下，对所述哺乳动物施用一定时间的有效量的试剂。

提法“诱导”应被理解为表示实现所期望的活化素 β_c 亚基水平，无论是功能上有效水平或是功能上无效水平。所述诱导最可能通过向上调节或向下调节活化素 β_c 亚基表达而实现，正如在此之前所描述的，虽然任何其它合适的实现诱导的方法也被本发明的方法所包括。

如在此之前所详细描述，本发明的进一步的方面涉及本发明对疾病状态或其它不想要的病症的治疗和/或预防的应用。

本发明因此涉及治疗性和/或预防性治疗以在哺乳动物中活化素 β_c 亚基异常、不想要或其他不恰当的水平或生物活性为特征的病症，或易于发展该病症的体质的方法，所述方法包含调节活化素 β_c 亚基在所述哺乳动物中的水平。

所述活化素 β_c 亚基水平或生物活性优选在细胞内调节。

提法“异常，不想要的或其它不适当”的活化素 β_c 亚基水平应被理解为表示过高水平、不足水平或不适当的正常生理水平（其不适当在于它们是不想要的或不适当的）。

不以任何方式对本发明加以限制，疾病或病症也许包括胰腺，脑和神经组织，肾上腺，甲状腺，胃，结肠，膀胱，子宫内膜，乳腺，淋巴结，皮肤，唾液腺，骨，鼻腔，十二指肠，胆囊，子宫颈，胸腺，输卵管，子宫，扁桃腺，脾，阑尾，精囊，喉，舌，小肠，直

肠，食管，子宫肌层和软组织的疾病或病症。

所述病症最特定的是瘤形成状态。

因此，本发明优选地涉及治疗性和/或预防性治疗瘤形成状态，或易于发展瘤形成状态的体质的方法，所述方法包含调节活化素 β _c亚基水平或生物活性，其中向下调节所述活化素 β _c亚基水平至功能上无效水平将抑制异常细胞生长。

仍更优选的是，本发明涉及治疗性和/或预防性治疗瘤形成状态，或易于发展瘤形成状态的体质的方法，所述方法包含在足以诱导活化素 β _c亚基功能上无效水平的条件下，施用一定时间的有效量的试剂。

优选的是，所述试剂是抗体。

优选的是，所述瘤形成状态是胰腺，脑和神经组织，肾上腺，甲状腺，胃，结肠，膀胱，子宫内膜，乳腺，淋巴结，皮肤，唾液腺，骨，鼻腔，十二指肠，胆囊，子宫颈，胸腺，输卵管，子宫，扁桃腺，脾，阑尾，精囊，喉，舌，小肠，直肠或食管，子宫肌层和软组织的恶性肿瘤形成或者输卵管，子宫，扁桃腺，脾，阑尾，精囊，子宫肌层和软组织的非恶性肿瘤形成。

“有效量”表示至少部分实现所期望的反应、或者延迟发作或抑制进展、或者被治疗的特定病症的发作或进展同时被中止所需要的数量。数量根据被治疗的个体的健康和生理状态、被治疗的个体的分类群、所期望的保护程度、组合物的配方、医学条件的评估和其它相关因素而变化。可以预期数量将落在可通过常规试验而测定的相对广泛的范围内。

在此的提法“治疗”和“预防”被按照最广泛的含义理解。术语“治疗”并不是必然意味着对象的治疗持续到完全康复。类似地，“预防”不是必然表示对象不会最终感染疾病状态。因此，治疗和预防包括特定病症的症状的改善或防止，或者降低发展特定病症的风险。术语“预防”可被认为是减少特定病症的严重性或发作。“治疗”也可减少已存在的病症的严重性。

本发明进一步涉及联合治疗，例如一起施用调节剂和其它可促进所期望的治疗性或预防性结果的蛋白的或非蛋白的分子。例如，也可将本发明的方法与放射治疗或化学治疗联合。

此前所描述的本发明的分子（在此集中表示为“调节剂”）以药物组合物形式的施用，可通过任何便利的方式完成。药物组合物的调节剂在以根据特定病例确定的数量施用时表现治疗活性。变化依赖于，例如所选择的人或动物和调节剂。也可应用大范围的剂量。例如，考虑某一患者，每天每公斤体重从约 0.1 mg 到约 1 mg 的调节剂可被施用。剂量方案可调整到提供最适宜的治疗反应。例如，数种分开的剂量可每天性、每周性、每月性或以其它合适的时间间隔施用，或者根据条件的紧急性按比例地减少剂量。

调节剂可用便利的方式施用，例如通过口服、静脉内（水可溶性），腹膜内，肌肉内，皮下，皮内或栓剂途径或植入（例如应用缓释分子）。调节剂可采用药学上可接受的非毒性盐的形式施用，例如酸加成盐或金属如锌、铁或类似物的复合物（其被看成是用于此应用目的的盐）。这类酸加成盐的例子有盐酸盐，氢溴酸盐，硫酸盐，磷酸盐，马来酸盐，乙酸盐，柠檬酸盐，苯甲酸盐，琥珀酸盐，苹果酸盐，抗坏血酸盐，酒石酸盐和类似物。如果活性成分将以片剂形式施用，片剂可包含粘合剂如黄芪胶，玉米淀粉或明胶；崩解剂如藻酸；和润滑剂如硬脂酸镁。

施用路径包括，但不限于，呼吸道，气管内，鼻咽，静脉内，腹膜内，皮下，颅内，皮内，肌肉内，眼内，鞘内，脑内，鼻内，注入，口服，直肠，经 IV 滴注片和植入物。所述施用路径优选口服。

依照这些方法，依照本发明所定义的药剂可与一种或更多的其它化合物或分子共施用。“共施用”表示在相同制剂中或两种不同制剂通过相同或不同路径而同时施用，或通过相同或不同路径而顺序施用。例如，所述试剂可与激动剂一起施用，以增强其效用。“顺序”施用表示两个类型分子的施用之间以秒、分钟、小时或天计的时间差异。这些分子也许以任意顺序施用。

本发明的又一方面涉及某一试剂的应用，用于生产对以活化素 β_c 亚基异常的、不想要的或其它不适当的水平为特征的病症进行治疗的药物，所述试剂可调节活化素 β_c 亚基的功能上的有效水平。

本发明的又一方面涉及此前所述试剂在制备用于调节细胞异常生长的药物中的应用，其中活化素 β_c 亚基向下调节至功能上的无效水平将抑制异常生长。

本发明的又一方面涉及此前所述试剂在制备用于调节细胞异常生长的药物中的应用，其中活化素 β_c 亚基向下调节至功能上的有效水平将抑制异常生长。

所述瘤形成状态优选为胰腺，脑和神经组织，肾上腺，甲状腺，胃，结肠，膀胱，子宫内膜，乳腺，淋巴结，皮肤，唾液腺，骨，鼻腔，十二指肠，胆囊，子宫颈，胸腺，输卵管，子宫，扁桃腺，脾，阑尾，精囊，喉，舌，小肠，直肠或食管，子宫肌层和软组织的恶性瘤形成或输卵管，子宫，扁桃腺，脾，阑尾，精囊，子宫肌

层和软组织的非恶性肿瘤形成。

仍然更进一步地，本发明涉及包含前文定义的调节剂和一种或多种药学上可接受的载体和/或稀释剂的药物组合物。所述试剂指活性成分。

适合注射性应用的药学形式包括消毒过的水溶液（水溶性）或分散体，和用于消毒过的可注射溶液或分散体的临时制备的消毒粉末，或者适合局部应用的软膏或其它形式。它必须在制备和储存时的环境条件下稳定，必须防止微生物如细菌和真菌的污染行为。载体可以是包含例如，水，乙醇，多元醇（例如，甘油、丙二醇、液体聚乙二醇，和类似物），它们的合适混合物和植物油的溶剂或分散基质。合适的流动度可被保持，例如通过涂层如卵磷脂的应用，通过在分散体的情况中保持所需颗粒大小，通过表面活性剂的应用。对微生物污染的防止可通过多种抗菌剂和抗真菌剂例如对羟基苯甲酸酯，氯丁醇，苯酚，山梨酸，硫柳汞和类似物而实现。在许多情况中，将优选包括等渗剂，例如糖或氯化钠。可注射的组合物的延迟吸收可通过在组合物中应用延迟吸收的试剂如单硬脂酸铝和明胶而实现。

消毒过的可注射的溶液通过在合适的溶剂中以所需的数量将活性化合物与多种其它上面列举的成分整合而制备，正如所需，随后进行过滤性消毒。一般地，通过将多种消毒过的活性成分整合入消毒过的含有基本分散基质和上面列举的其它所需成分的媒介物中制备分散体。在用于制备消毒过的可注射的溶液的消毒过的粉末这种情况中，优选的制备方法是真空干燥和冰冻干燥技术，它们从前面的消毒过滤过的那一溶液中生产出活性成分的粉末和任何期望的附加成分。

当活性成分被适当保护时，它们可口服施用，例如伴随惰性稀释剂或伴随可吸收可食用的载体，或者它可被硬或软明胶胶囊壳封装，

或者它可被压成药片，或者它可直接与饮食中的食物整合。对于口服的治疗施用，活性化合物可与赋形剂整合，以可吸收的药片、颊片、糖锭、胶囊、酏剂、悬浮液、糖浆、糯米纸囊剂 (wafer) 和类似物的形式应用。这类组合物和制剂应包含按重量至少 1% 的活性化合物。当然，组合物和制剂的百分比可改变，可便利地处于单位的重量的约 5% 到约 80% 之间。这类治疗性有用的组合物所合适剂量的活性化合物的数量可以获得。根据本发明的优选的组合物或制剂被制备成口服剂量单位形式，包含约 0.1 μg 和 2000 mg 之间的活性化合物。

药片，糖锭，药丸，胶囊和类似物也可包含此后列出的成分：粘合剂如胶、阿拉伯胶、玉米淀粉或明胶；赋形剂如磷酸二钙；崩解剂如玉米淀粉、马铃薯淀粉、藻酸和类似物；润滑剂如硬脂酸镁；和可被添加的甜味剂如蔗糖、乳糖、或糖精，或者调味剂如薄荷油、鹿蹄草油或樱桃香味剂。当剂量单位形式是胶囊时，除了上面类型的物质外，它也许包含液体载体。多种其它物质也可作为涂层或对剂量单位的物理形式进行的修饰而存在。例如，药片，药丸，或胶囊也可被涂上虫漆、糖或两者都用。糖浆或酏剂也可包含活性化合物，作为甜味剂的蔗糖，作为防腐剂的甲基和丙基对羟基苯甲酸酯，染料和香味剂如樱桃或橙香味剂。当然，在制备任何剂量单位形式中应用的任何物质应是药学上纯净，所用数量是充分无毒。此外，活性化合物可被整合进持续释放的制剂和配剂中。

药物组合物也可包含遗传分子例如可以转染靶细胞的带有编码活化素 β 亚基的核酸分子或如此前定义的调节剂的载体。载体也许是，例如病毒载体。

本发明进一步的特征在下面的非限制性的图和/或实施例中描述。

实施例 1 生物样本中活化素 AC 异型二聚体的探测

活化素 AC 的 酶联免疫吸附分析 (ELISA)

96 孔 ELISA 平板 (MaxiSorp; Nunc, Roskilde, Denmark) 如前面所述的 (Evans 等, 1998, J Endocrinol 156: 275-82) 用人类活化素 β_c 亚基克隆 1 单克隆抗体涂层和封闭。BFF 被用作 interim 标准。等价于 1/10 稀释液的分析最高剂量被分配为任意单位量的 10 U/ml 形式。标准物和样本稀释在 DMEM/5% FCS 中, 如用于培育实验的。125 μ l 的 6% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 的 PBS 溶液被加到 (最终浓度, 3% w/v) 125 μ l 的样本或标准物中, 混合, 沸腾 3 分钟, 冷却。发现在 SDS 溶液中加入 PBS 会改善分析的性能和标准物与样本的剂量反应曲线的线性性质。此后, 20 μ l 的 30% H_2O_2 (最终浓度, 2% v/v) 被加入, 试管在室温下培育 30 分钟。每一孔中在加入 100 μ l 被处理样本的副本之前, 加入 25 μ l 的 20% BSA/0.1M Tris/0.9% NaCl/5% Triton X-100/0.1% 叠氮化钠。平板在密封的湿盒中培育过夜。第二天, 平板用 0.05M Tris/0.9% NaCl/0.05% Tween-20/0.1% NaN_3 清洗, 然后在每一孔中加入 50 μ l 5% BSA/0.1M Tris/0.9% NaCl/5% Triton X-100/0.1% 叠氮化钠中的抗活化素 β_a 亚基的生物素化的 E4 单克隆抗体, 室温培育 2 小时。清洗之后, 与链霉抗生物素连接的碱性磷酸酶 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) 被加入孔中, 室温培育 1 小时。进一步清洗后, 采用放大试剂盒 (amplification kit) (ELISA Amplification System; Invitrogen) 探测碱性磷酸酶活性, 方式为其与底物室温培育 1 小时, 随后加入放大试剂。加入 50 μ l 的 0.4M H_2SO_4 终止反应。平板在 Multiskan RC 平板读数器 (Labsystems, Helsinki, Finland) 上用 492nm 读数, 使用了 630nm 参比滤光片, 数据用 Genesis Lite EIA 软件 (Labsystems) 处理。

活化素 AC 异型二聚体的体内形成

人血清样本中的活化素 AC 蛋白水平 (U/ml) 被测定 (参看表 2)

实施例 2 正常/病理性人体组织和动物组织中活化素 β_c 亚基蛋白的免疫组织化学

人体组织

人正常组织阵列 (AA) 和人肿瘤组织阵列 (BB) 从 SuperBioChips Laboratories (Seoul, Korea) 获得。得到乳腺癌, 结肠癌, 胃癌, 皮肤癌, 脑膜瘤, 神经鞘瘤, 膀胱癌和甲状腺癌患者的组织。

动物组织

从具有神经退行性疾病 (家族性肌萎缩性侧索硬化) 的转基因小鼠和相应的野生型动物 (38) 中移去左侧矢状脑。组织用 4% 多聚甲醛固定, 石蜡处理, 切出 3 μ m 组织切片。

通过静脉内注射 20ml Lethobarb (Virbac, Peakhurst, NSW, Australia) 杀死母羊。然后将头用 21 ml 肝素化盐灌注, 随后用 11 ml 的 10% 福尔马林固定液和含有 20% 蔗糖的 0.51 ml 相同固定液灌注。脑块在包含 30% 蔗糖的同一固定液中放置过夜, 然后放在 30% 的蔗糖 PBS 溶液中直到它们下沉。脑块然后在干冰中被冰冻, 石蜡膜包裹, -20°C 保存直至切片。在低温保持器中进行绵羊垂体的冠状面切片 (7 μ m), 解冰加载至 superfrost 载玻片, 并储存于 -20°C 直到使用。在低温保持器中进行绵羊脑冠状面切片 (40 μ m), 收集至单独的含有防冻剂的组织培育孔中, -20°C 保存直至使用。

脱石蜡后，组织经历在 0.1 M 甘氨酸 (pH 4.5) 中微波加热的预处理步骤。切片用 DAKO Autostainer (DAKO, Carpinteria, USA) 对活化素 β_c 亚基蛋白免疫着色。简而言之，通过将切片与 0.03% H_2O_2 培育 5 分钟而阻断内源过氧化物酶 (DAKO, Carpinteria, USA)。与 CAS 封闭溶液 (Zymed, CA, USA) 培育 10 分钟后，切片与活化素 β_c 抗体 (工作浓度 0.45 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 一起培育 60 分钟。抗体通过与 Envision 聚合物-抗-小鼠-马的萝卜过氧化物酶 (DAKO, Carpinteria, USA) 培育 15 分钟而被探测，通过与二氨基对二氨基联苯 (DAB) (DAKO, Carpinteria, USA) 反应 5 分钟而可见。免疫着色的专一性通过将 100 倍 (w/w) 过量的初级抗体与相应的活化素 β_c 亚基肽段预培育而检测。

活化素 β_c 亚基蛋白在正常和病理性人体组织中的免疫定位

活化素 β_c 亚基蛋白被证明免疫定位于被研究的大多数良性和恶性人体器官中。细胞质和/或核的着色被普遍观察到，这些模式的变化在良性和恶性状态之间发生。图 1-14 充分描述了着色模式，其下面的描述指出了部分显著的发现。

肾上腺和甲状腺，如图 1 所示，显示强活化素 β_c 亚基蛋白的恶性定位。肾上腺和甲状腺中的着色显示在恶性状态中增加了的强度。

大部分胃，结肠和直肠的腺癌 (图 2) 显示活化素 β_c 亚基在细胞质和核中都定位的模式。此着色模式不同于在正常胃、结肠和直肠中观察到的可变的和突出的细胞质着色。

活化素 β_c 亚基蛋白的强核着色随着皮肤，乳腺和淋巴结中恶性程度的发展而变得明显 (图 3)。部分核着色在良性皮肤和乳腺的部分细胞中观察到，然而更强的着色在恶性组织中显示。类似地，活化素 β_c 亚基蛋白的细胞质定位在正常唾液腺和鼻腔中观察到，然而在恶性

组织中，着色显示出强核定位以及细胞质定位(图 4)。此外，在软骨肉瘤(骨的良性病症)中几乎观察不到着色，然而强的核和细胞质活化素 β 。亚基蛋白定位在恶性组织中被观察到。正常胃(图 2 和 5)显示可变的细胞质定位。除上述的胃腺癌之外，其它胃恶性组织包括胃指环状细胞癌、胃淋巴瘤和转移性胃癌显示核定位(和基质定位)。正常膀胱几乎没有核着色，然而伴随癌症的发展，强的核着色被观察到(图 6)。

部分器官，例如胆囊，肾上腺，子宫颈，和胰腺，在良性和恶性状态下都具有程度不定的核和细胞质着色(图 6, 7, 8)。

食管，甲状腺和胸腺在正常组织中几乎或完全不显示着色，然而伴随癌症的发展，增加的活化素 β 。亚基蛋白定位被观察到(图 8, 9)。

活化素 β 。亚基蛋白免疫定位的其它组织包括子宫肌层，输卵管，扁桃腺，脾，阑尾和精囊，也包括子宫的良性疾病(图 10 和 11)。

正常，损伤和恶性的皮肤具有不同的活化素 β 。亚基蛋白着色的免疫定位模式。核和细胞质着色都在正常皮肤和肿瘤(包括鳞状细胞和黑素瘤)中观察到(图 3 和 14)。

正常乳腺有活化素 β 。亚基的免疫定位，不同乳腺肿瘤(残留浸润型管癌，乳腺浸润型小叶癌，乳腺乳头状癌症)也显示细胞质或核定位(图 3)。

脑在良性和恶性疾病中都显示活化素 β 。亚基蛋白的强定位。特别地，星形细胞，血脑屏障和神经元具有活化素 β 。亚基强定位(图 12)。绵羊的内分泌细胞、人垂体和下丘脑、视前区(pre-optic area)和视丘下部的神经元细胞显示活化素 β 。亚基定位(图 13)。强定位

也在脑的肿瘤细胞，尤其在两名患者的成胶质细胞瘤（I）和四名患者的脑膜瘤（II）的肿瘤细胞中被观察到（图 12）。

实施例 3 乳腺组织分析

在 10 名患有按被接受的分类系统 BRE [BRE 1 级 (低级) 到 BRE 3 级 (高级)] 分类的乳腺癌的患者中调查活化素 β_c 亚基蛋白的定位。对这些患者组织的分析显示出良性乳腺组织中活化素 β_c 亚基蛋白的低水平，(管内癌) 不同级 (低、中、高) 原位的可变着色，BRE 级 1-3 浸润型小叶或乳腺管癌中的可变着色，而粘液状 (mucinous) 乳腺癌中没有定位。如表 3 所示，BRE 2 级浸润型小叶癌症的两名患者或者显示阳性着色的肿瘤细胞，或者显示阴性着色的肿瘤细胞。一名 BRE 3 级浸润型管癌的患者具有活化素 β_c 亚基蛋白免疫定位于核的肿瘤细胞，BRE 2 级或 3 级的其它患者在浸润型管癌症细胞中断断续续着色或没有着色。这些患者的管内癌区域组织中，管内癌症区域或者没有着色 (低级和高级，原位)，或者有阳性细胞着色区域 (中级，原位)。被分类为原位高级的患者 (没有浸润组分) 显示活化素 β_c 亚基蛋白在管内细胞中的强免疫定位。

实施例 4 结肠组织分析

在患有结肠癌的 9 名患者中调查活化素 β_c 亚基蛋白的定位 (图 16)。如表 4 所示，分化不足的结肠腺癌患者或者在肿瘤细胞中具有均一的活化素 β_c 亚基蛋白的强细胞质着色 (如在一名患者中所看到的)，或者肿瘤细胞具有如另外 3 名患者中所观察到的同时强阳性和阴性着色。具有中度分化结肠腺癌的两名患者显示出肿瘤细胞的阳性和阴性染色，而另两名患者的肿瘤细胞显示没有活化素 β_c 亚基蛋白的着色。具有结肠腺癌粘液状亚型的一名患者没有活化素 β_c 亚基的免疫定位。在具有阳性肿瘤细胞着色的患者中，当与邻近的非恶性区域更微弱的

着色相比时，在结肠腺癌中观察到活化素 β_c 亚基蛋白强度的增加。

实施例 5 胃组织分析

在 6 名胃癌症患者中调查活化素 β_c 亚基蛋白的定位 (图 17)。如表 5 所示，正常胃黏膜几乎不显示活化素 β_c 亚基蛋白的着色。在小肠类型的胃腺癌患者中，良好/适度良好分化的肿瘤细胞没有活化素 β_c 亚基蛋白的免疫定位，而其肿瘤细胞分化不足的两名患者具有强细胞质着色或不定的核着色。在指环状细胞类型的胃腺癌的两名患者中，肿瘤细胞显示不定的核着色或没有活化素 β_c 亚基蛋白的定位。

实施例 6 皮肤分析

在 5 名脑内黑素瘤转移患者中调查活化素 β_c 亚基蛋白的定位 (图 18)。如表 6 所示，两名黑素瘤转移患者在肿瘤细胞细胞质中具有活化素 β_c 亚基蛋白的免疫定位，一名患者具有不定的肿瘤细胞着色，而两名患者在黑素瘤肿瘤细胞中没有定位。

实施例 7 脑组织分析

如表 7 所示，强活化素 β_c 亚基蛋白定位在 17 名脑膜瘤患者和三名神经鞘瘤患者的脑组织中被看到 (图 19)。在 WHO 1 级分类的脑膜瘤患者中，活化素 β_c 亚基蛋白突出定位成均一的强细胞质着色，然而一名患者具有非常强的细胞膜定位。当与强烈定位活化素 β_c 亚基蛋白的组织中的其它肿瘤细胞比较时，被分类成 WHO 2 级的两名脑膜瘤患者在肿瘤细胞的某些区域具有集中的弱活化素 β_c 亚基蛋白免疫反应性。所有神经鞘瘤患者在肿瘤细胞中显示活化素 β_c 亚基蛋白的均一的强细胞质着色。

实施例 8 膀胱组织分析

在 3 名膀胱癌患者中调查活化素 β_c 亚基蛋白的定位 (图 20)。如表 8 所示, 高级 (3 级) 变移细胞癌的患者在肿瘤细胞的细胞质和核中具有活化素 β_c 亚基蛋白的免疫定位。一名变移细胞癌患者没有活化素 β_c 亚基蛋白的定位。

实施例 9 甲状腺组织分析

在 4 名甲状腺癌患者中调查活化素 β_c 亚基蛋白的定位 (图 21)。在正常甲状腺的区域中, 滤泡上皮细胞显示断断续续的细胞质着色。如表 9 所示, 两名乳头状癌患者在肿瘤细胞的细胞质中具有活化素 β_c 亚基蛋白的免疫定位, 然而所有肿瘤细胞中着色不定, 也并不都被观察到。髓和滤泡癌患者在肿瘤细胞细胞质中具有一致的活化素 β_c 亚基蛋白着色。

实施例 10 正常人血清分析

在正常人血清中测定活化素 β_c 亚基蛋白二聚体的 Western Blot 方法学

SDS-page 在非还原条件下用 15% 聚丙烯酰胺胶完成。人正常血清样本用 4% SDS 以 1: 3 稀释, 在加热装置中 100°C 沸腾 5 分钟, 收集上清。4% SDS 处理过的血清样本在样本缓冲液 (Tris, 1% SDS, 甘油和 0.01% 溴苯酚蓝, pH 7.2) 中以 1: 2 稀释。样本在加热装置中 100°C 培育 5 分钟, 简短离心, 20 μ l 样本在胶上加样, 用跑胶缓冲液 (Tris, 甘氨酸, 10% SDS) 以 150 伏特跑胶 90 分钟。已在甲醇中预浸 15 秒并在 milliQ 水中预浸 2 分钟的 Immobilon P (PVDF) 膜, 在转移缓冲液 (0.7 mol/L 甘氨酸, 0.3 mol/L Tris 和 15.6% 乙醇) 中与

胶平衡 5 分钟。胶上的蛋白以 100 伏特 60 分钟转至膜上。转膜之后，膜在含 0.05% Tween 20 的 1x TBS 中浸泡 5 分钟。膜封闭 (5% 脱脂奶粉, 0.05% Tween 的 1 x TBS) 90 分钟。加入 1: 6000 的含 5% 牛奶的 1x TBS 中的活化素 β_c 克隆 1 抗体, 4°C 过夜。清洗后, 1: 10000 的含 5% 牛奶的 TBS 中的山羊抗小鼠 HRP 加到膜上, 室温培育 45 分钟。随后的清洗之后, ECL plus 底物 (Amersham Bioscience UK Limited, UK) 根据生产商的用法说明被加入。膜放入 X 射线的盒中, 暴露给 X-Omat 胶片 (Kodak)。

结果

应用专一的抗活化素 β_c 亚基的单克隆抗体, Western blot 分析显示来自两个人的正常人血清样本包含了二聚体活化素 β_c 蛋白, 其大小约 20 kDa, 预计是活化素 C 或 BC。一人具有强 20 kDa 条带, 说明活化素 C 或 BC 的存在, 也具有弱一些的 23 kDa 条带, 说明另一活化素 β_c 二聚体即活化素 AC, 在血清中存在 (如图 22 所示)。

本领域的技术人员将意识到本文所述的发明除明确被描述的那些类型之外, 能有另外的变化和修改。应被理解的是, 本发明包括所有这类变化和修改。本发明也包括所有在此说明书中单独或集中提到或指出的步骤、特征、组合物和化合物, 和所述步骤或特征的任何两种或更多种的任何与所有组合。

表 2

样 本	活化素 AC (U/ml)
正常血清	
男性血清对照	0.033
女性血清对照	0.038

表 3

癌	患者总数	+ve 癌	+/-癌	-ve 癌
乳腺癌	10	3	1	6
浸润型小叶癌				
▪ BRE 2 级		1		1
浸润型管癌				
▪ BRE 2 级			1	2
▪ BRE 3 级		1 (+核)		2
原位癌				
▪ 高级		1 (+++)		
粘液状癌				1

表 4

癌	患者总数	+ve 癌	+/-癌	-ve 癌
结肠腺癌	9	1	5	3
▪ 适度良好分化			2	2
▪ 分化不良		1 (++)	3	
粘液亚型				1

表 5

癌	患者总数	+ve 癌	+/-癌	-ve 癌			
胃腺癌	6	1	2	3			
小肠型							
▪ 分化良好					1 (++)	1 (+/-核)	1
▪ 适度良好							1
▪ 分化不良							
指环状细胞类型			1 (+/-核)	1			

表 6

癌	患者总数	+ve 癌	+/-癌	-ve 癌
黑色素瘤	5	2	1	2
▪ 脑内转移瘤		1 (+++), 1 (+)	1	2

表 7

脑	患者总数	+ve 癌	+/-癌	-ve 癌
脑膜瘤	17	15	2	
▪ WHO 1 级				
▪ WHO 2 级				
神经鞘瘤	3	3		

表 8

癌	患者总数	+ve 癌	+/-癌	-ve 癌
膀胱变移细胞癌	3	1	1	1
▪ 3 级 (高级)		1 (+胞质/核)	1	1

表 9

癌	患者总数	+ve 癌	+/-癌	-ve 癌
甲状腺癌	4	2	2	
• 乳头状			2	
• 滤泡性		1		
• 髓样		1		

参考书目

Bunin BA, 等., 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91 :
4708-4712

Burke 和 Warren, 1984, Cell 36:847-56

Chang 等 , 2001, Mol Cell Endocrinol. Jun 30 ;
180(1-2):39-46

Chang 等, 2001, Mol Cell Endocrinol. Jun 30 ; 180 (1-2).
39-46

Chen 等, 1996, Nature 383 : 691-6

Chen 等, 1997, Nature 389 : 85-9

Cole 1985 Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy. In.
Alan R. Liss, Inc. 77-96

de Kretser 等, 1999, J Endocrinol 161:195-8

DeWitt SH, 等, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:
6909-6913

Esquela 等, 1997, Biochem Biophys Res Commun 235 : 553-6

Evans 等, 1998, J Endocrinol 156 : 275-82

-
- Fang J 等, 1997, *Biochem Biophys Res Commun* 231(3) : 655-61
- Groome 等, 2001, *J Mol Cell Endo* 180: 73-77
- Hotten G 等, 1995, *Biochem Biophys Res Commun* 206:608-13
- Hubner 等, 1999, *Histol Histopathol* 14 : 295-304
- Kozbar 1983 *Immunology Today* 4 : 72
- Kron 等, 1998, *J Virol Methods* 72 : 9-14
- Lau 等, 2000, *Mol Cel Biol*, 20 (16) : 6127-37
- Lau 等, 1996, *Biochim Biophys Acta* 1307:145-8
- Lebrun 等, 1999, *Mol Endocrinol* 13 : 15-23
- Luisi 等, 2001, *Eur J Endocrinol* 145 : 225-36
- McDowell 等, 1999, *Semin Cell Dev Biol* 10 : 311-7
- McFarlane 等, 1996 *Eur J Endocrinol* 134 : 481-9
- Morgan 和 Roth, 1988, *Immunol Today* 9:84-8
- Moore, A. , Basilion, J. , Chiocca, E. ,和 Weissleder, R. ,
1988, *BBA*, 1402 : 239-249

O'Bryan 等, 2000, J Mol Endocrinol 24. 409-18

Oda 等, 1995, Biochem Biophys Res Commun 210 : 581-8

Pangas 等, 2000, Trends Endocrinol Metab 11 : 309-314

Schmitt 等, 1996, Genomics 32 : 358-66

Stein 和 Cohen, 1988 Cancer Res 48. 2659-68

van der Krol 等, 1988 Biotechnique 6 : 958-976

Wedemeyer, N., Potter, T., Wetzlich, S. 和 Gohde, W. 2002,
Clinical Chemistry 48 : 9 1398-1405

Weissleder, R., Moore, A., Ph. D., Mahmood-Bhorade, U.,
Benveniste, H., Chiocca, E.A., Basilion, J. P. 2000, Nature
Medicine, 6 : 351-355

Wrana 和 Attisano, 2000, Cytokine Growth Factor Rev 11 : 5-13

Zhang 等, 1997, Endocr J 44 : 759-64

<110> Monash University
 MELLOR, Sally (US only)
 RISBRIDGER, Gail (US only)
 BALL, Emma (US only)
 WANG, Hong (US only)
 McCLEAN, Catriona (US only)
 PEDERSEN, John (US only)
 O'CONNOR, Anne (US only)
 CRANFIELD, Mark (US only)
 GROOME, Nigel (US only)

<120> 针对以活化素 β_c 水平的调节为特征的病症的诊断、治疗方法和有用试剂

<130> 12384740/TDO

<150> AU 2002953327
 <151> 2002-12-12

<160> 1

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 哺乳动物

<400> 1

Val Pro Thr Ala Arg Arg Pro Leu Ser Leu Leu Tyr Tyr Asp Arg Asp
 1 5 10 15

Ser Asn Ile Val Lys Thr Asp Ile Pro Asp Met Val Val Glu Ala Cys
 20 25 30

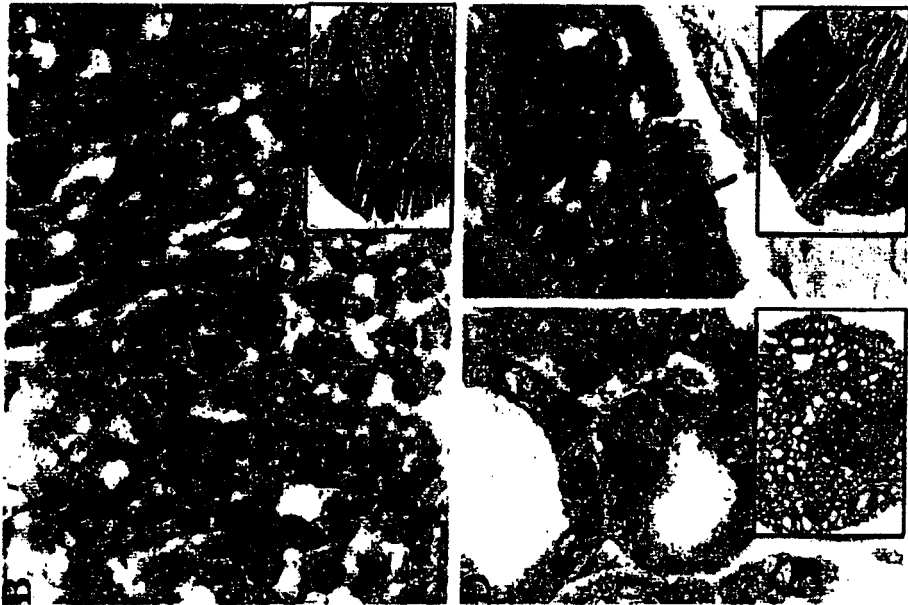
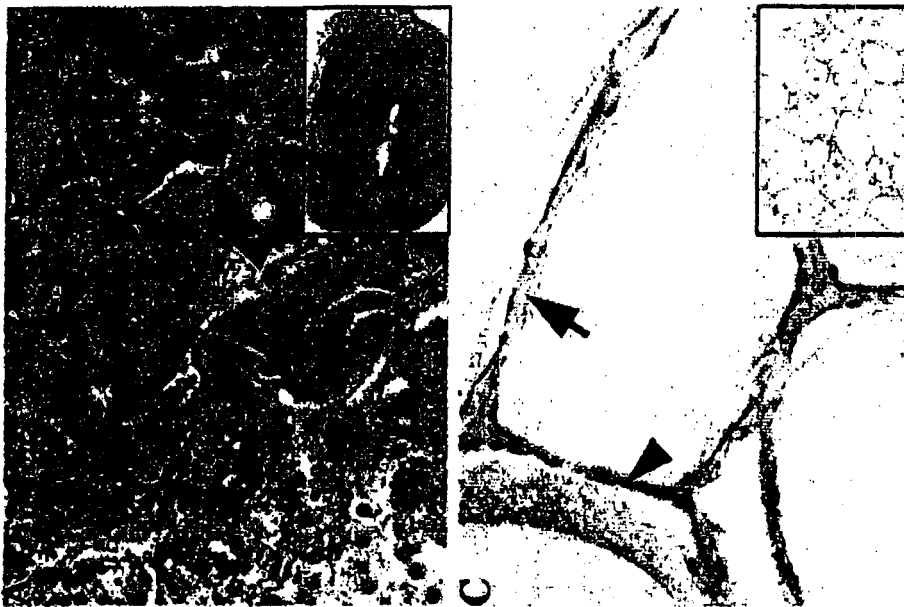


图1



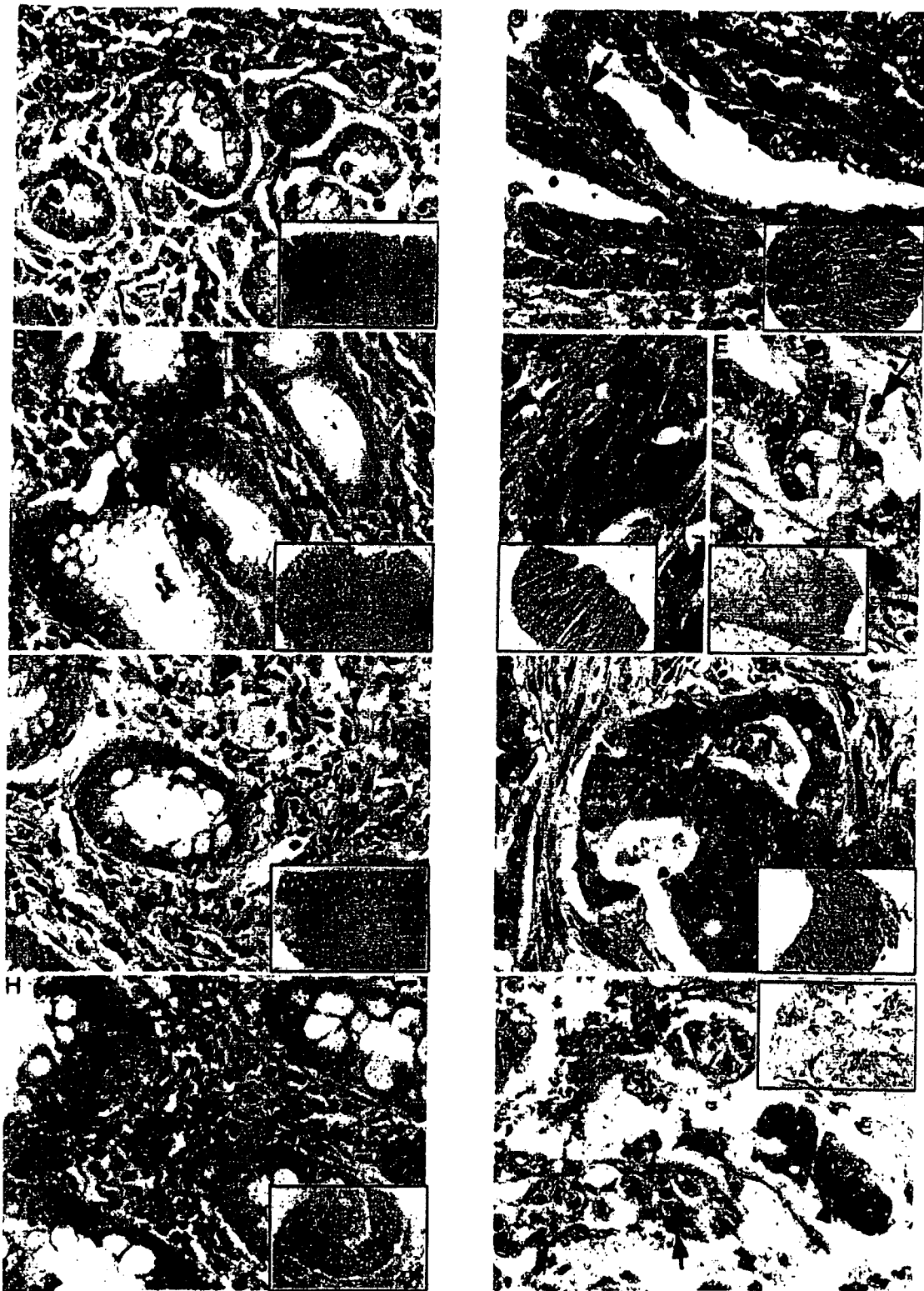


图 2

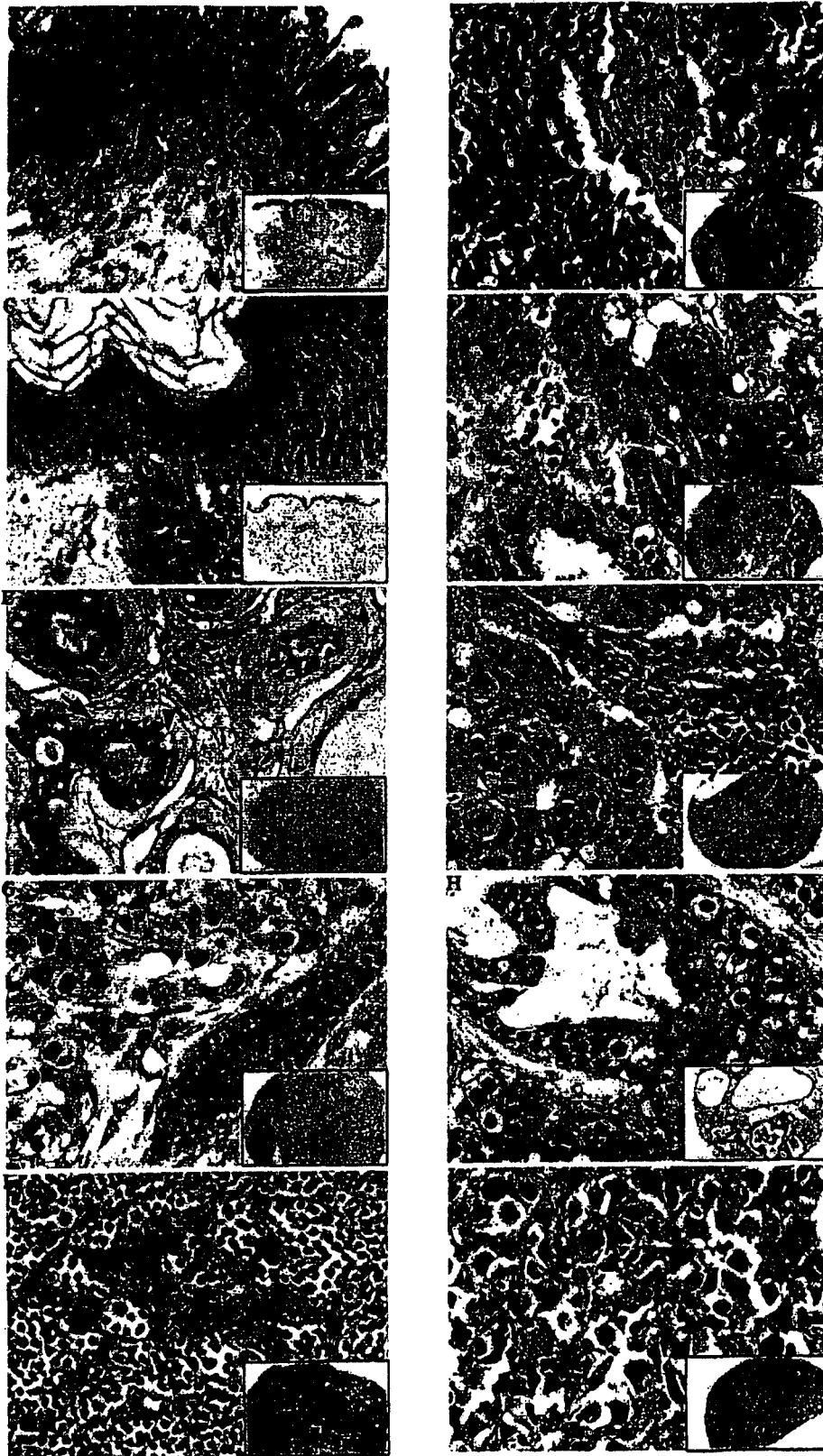


图 3

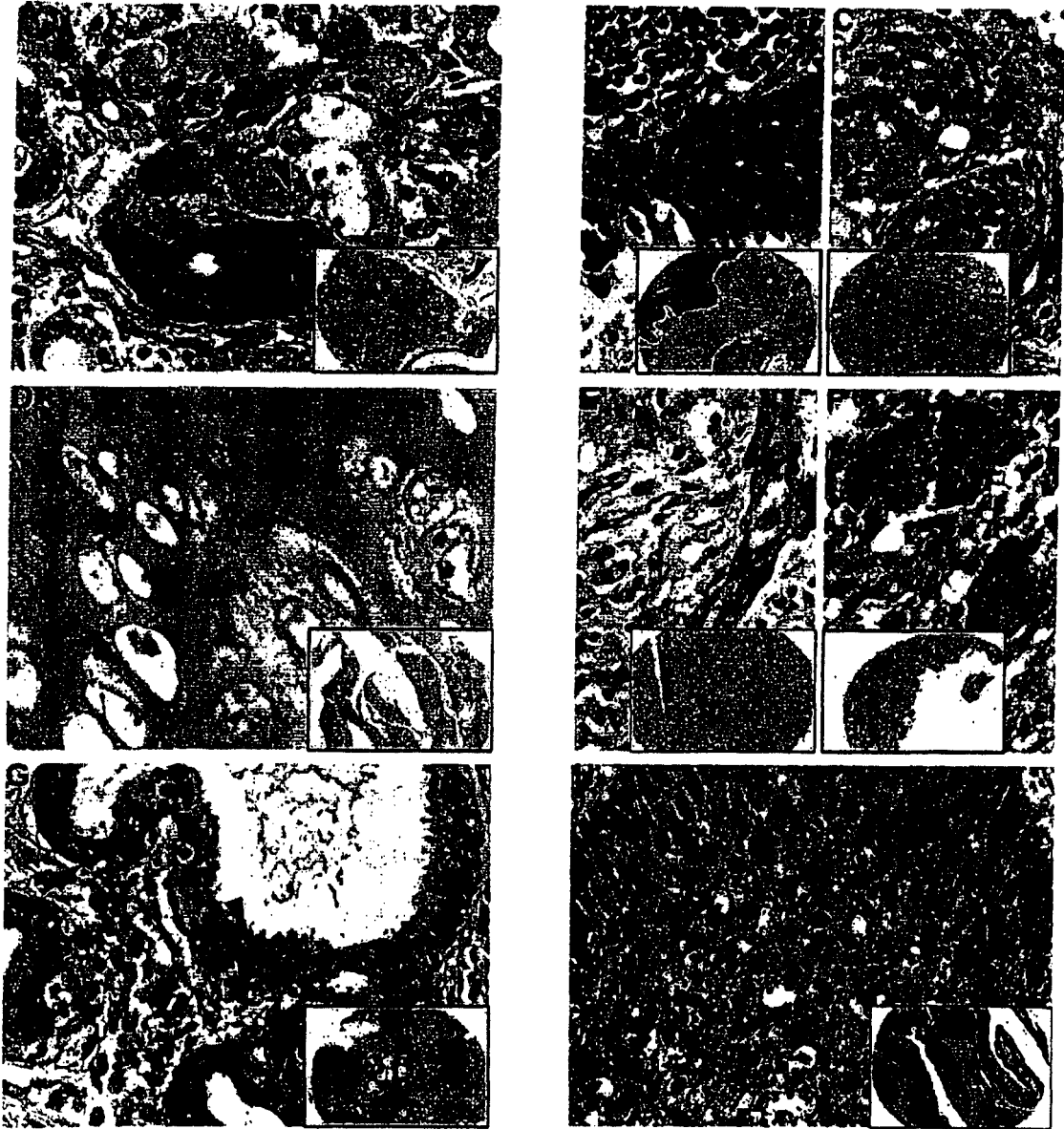


图 4

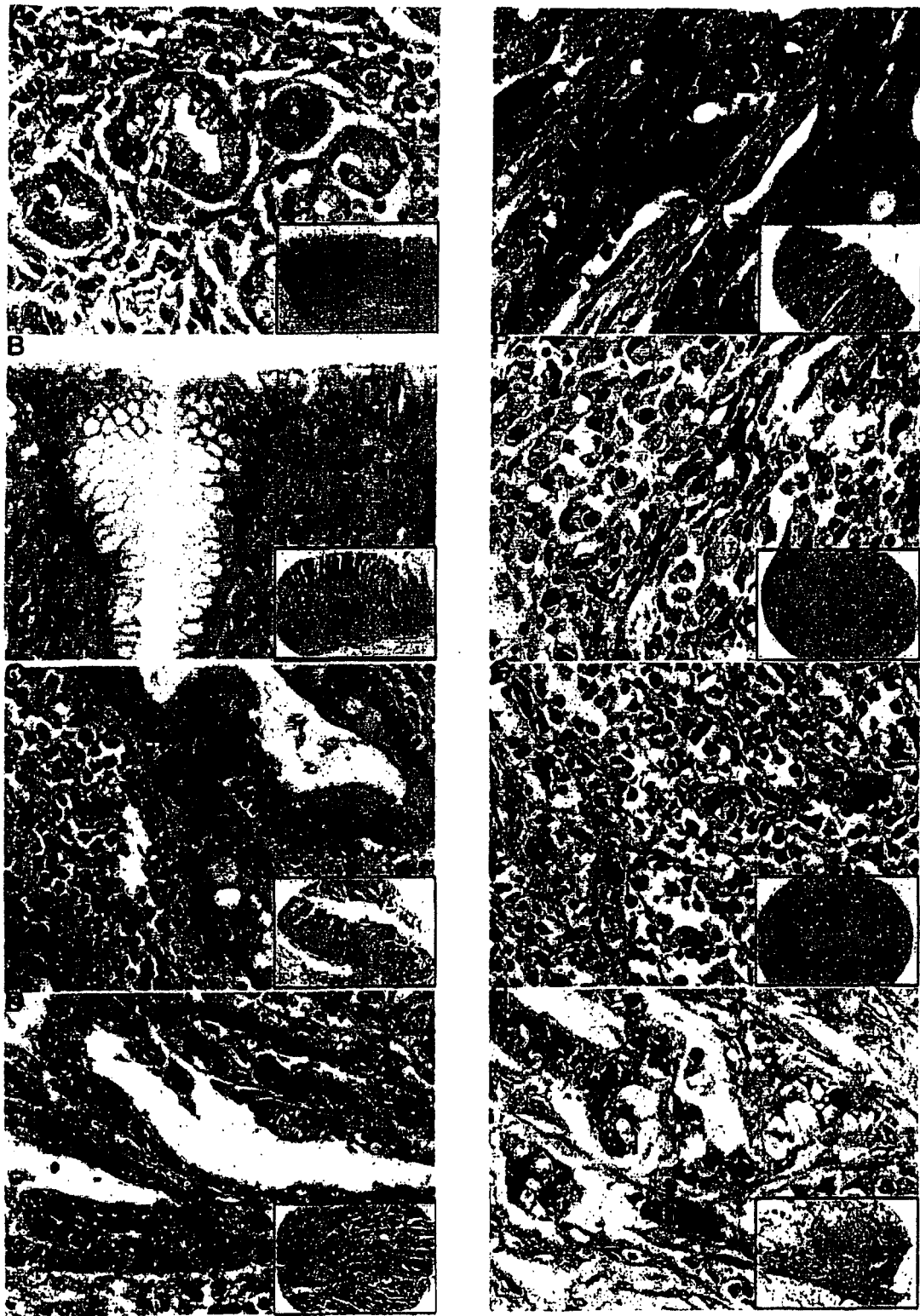


图 5

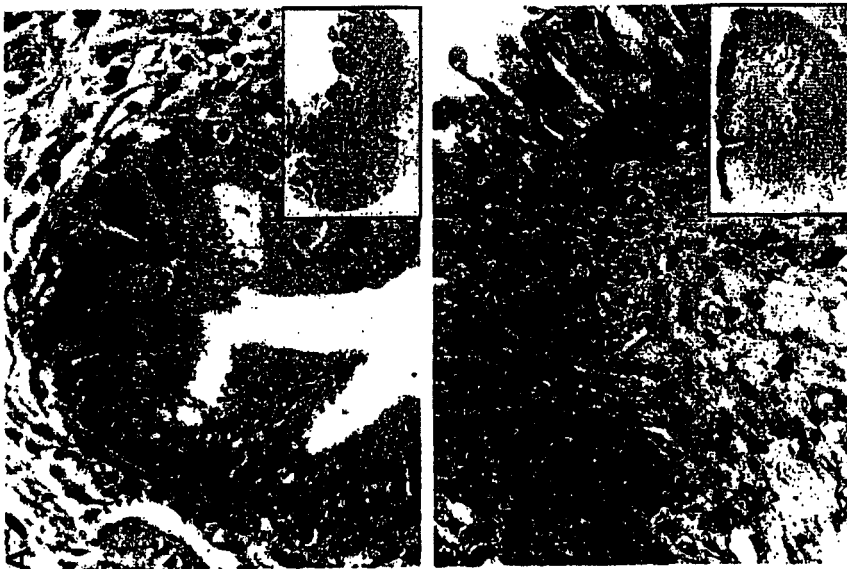
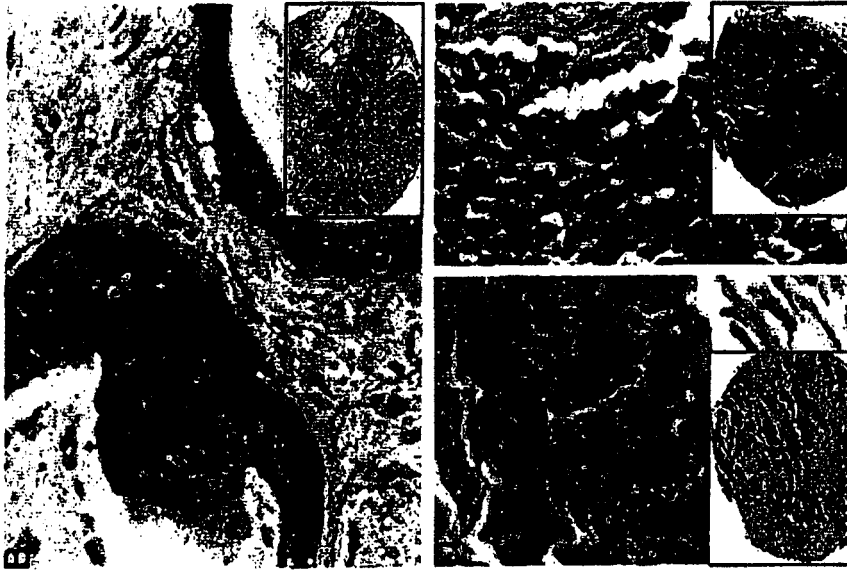


图6

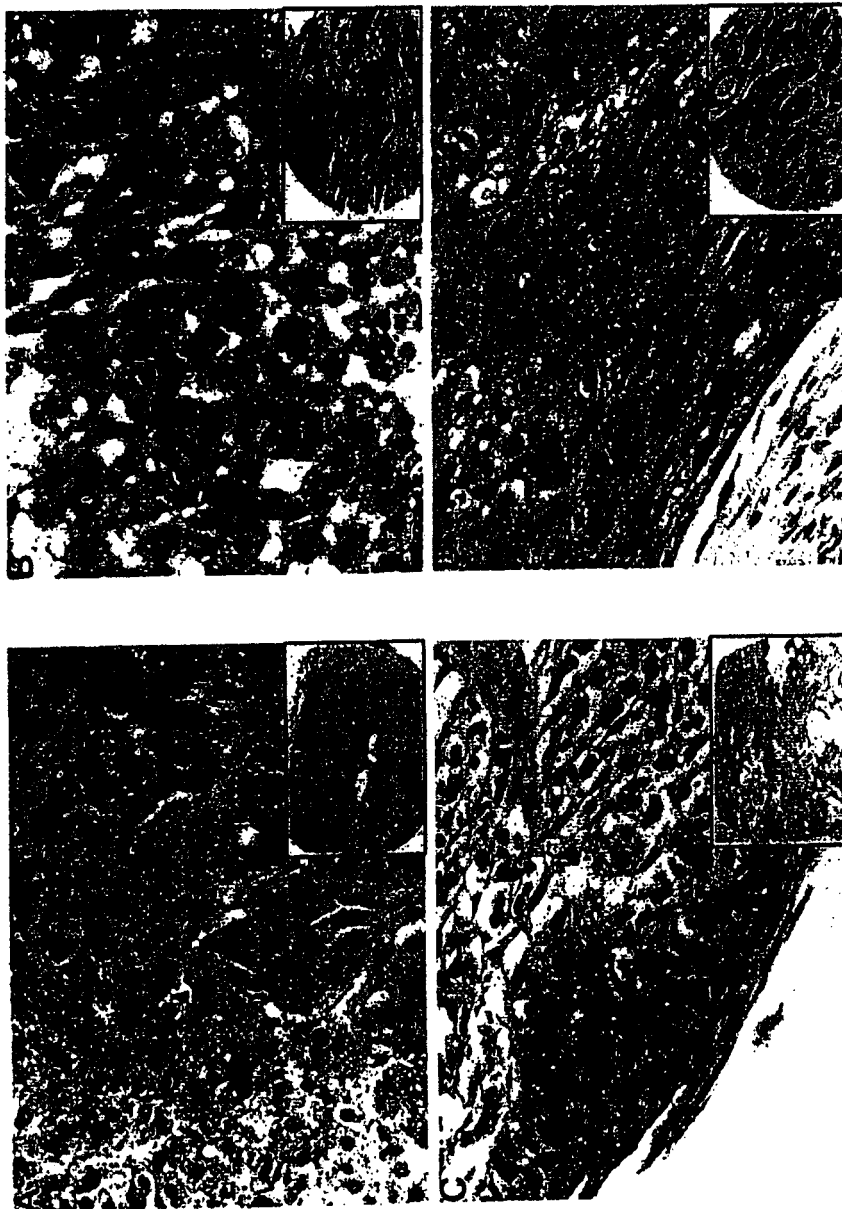


图7

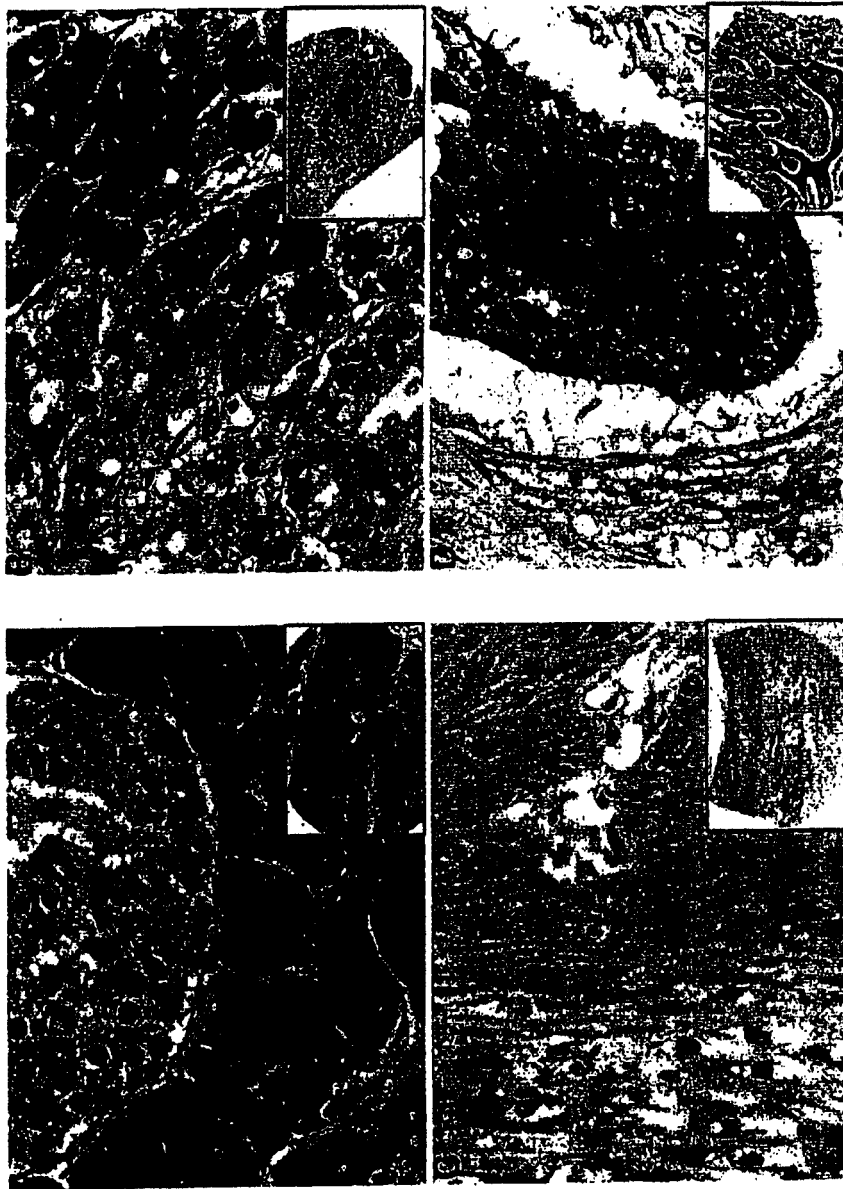


图8

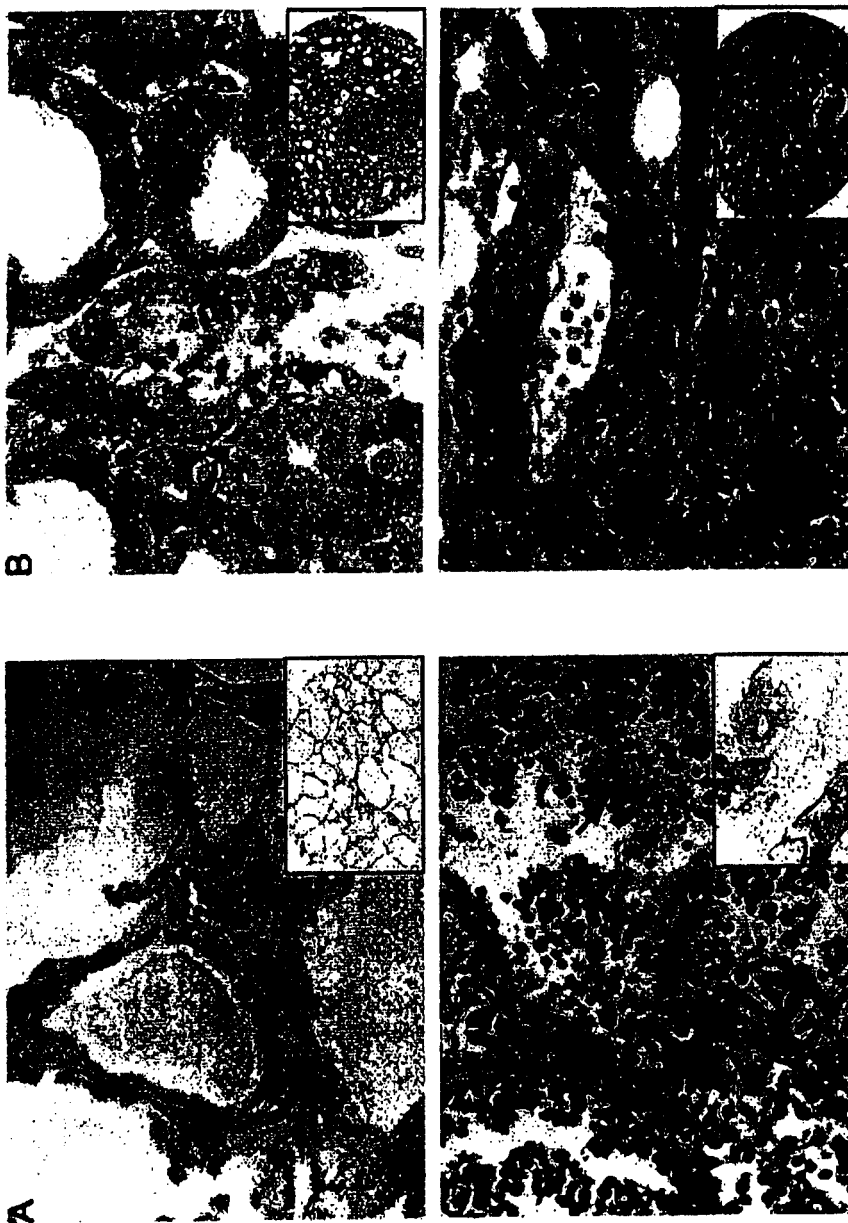
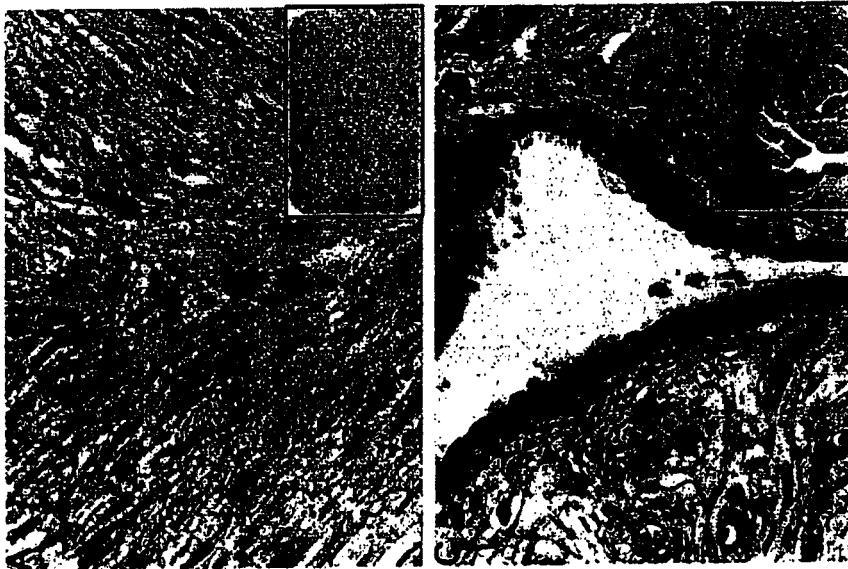


图9



图10



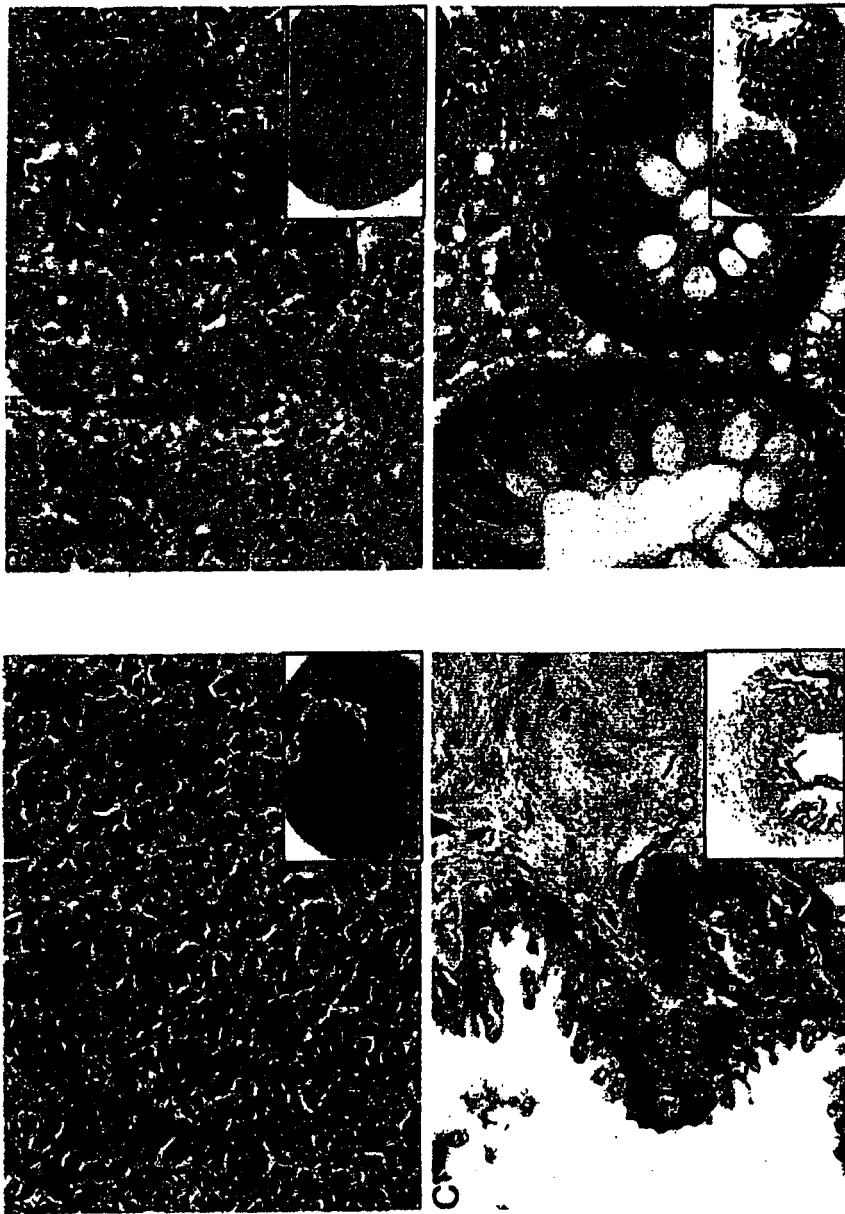


图11

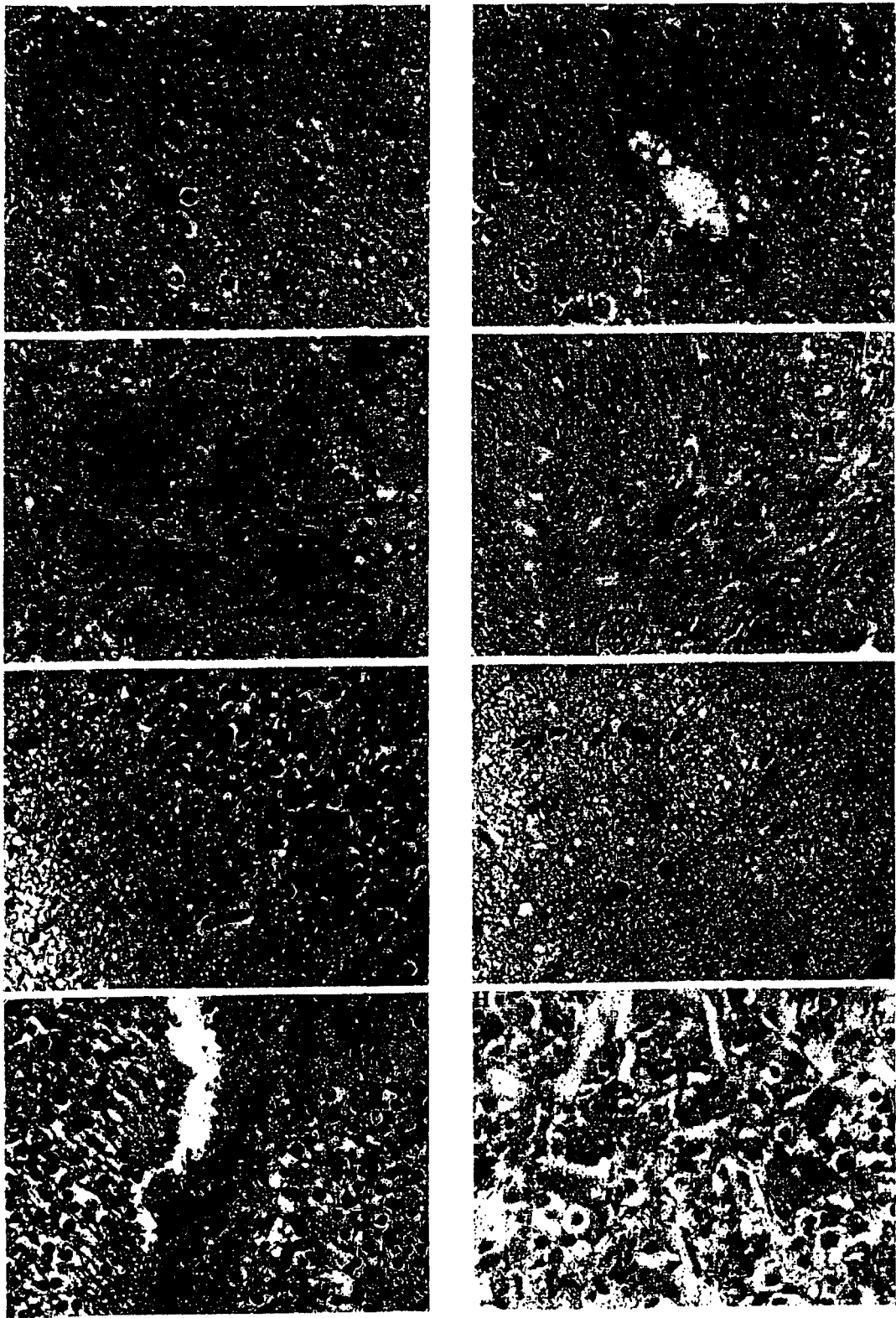


图 12

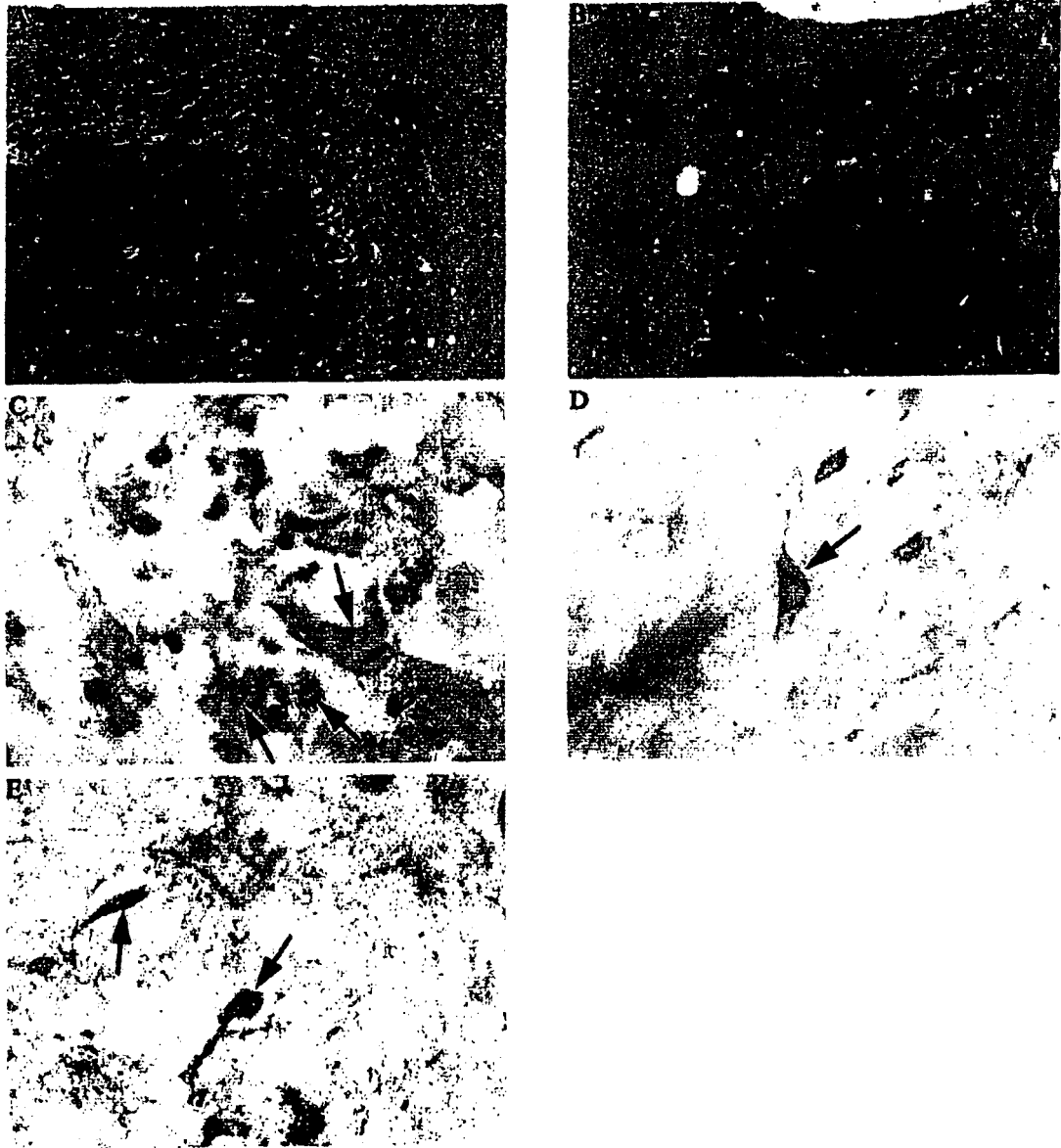


图 13

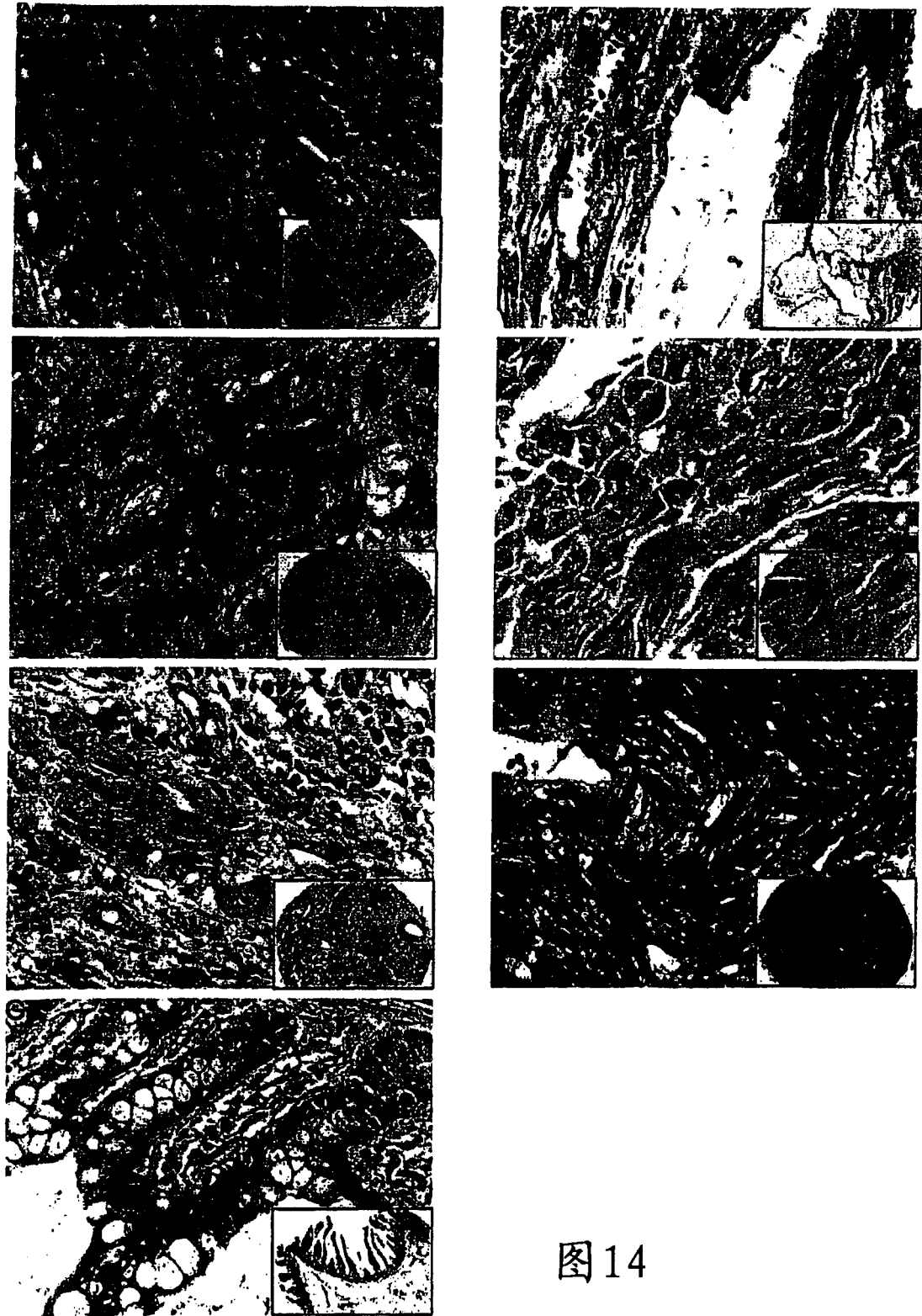


图 14

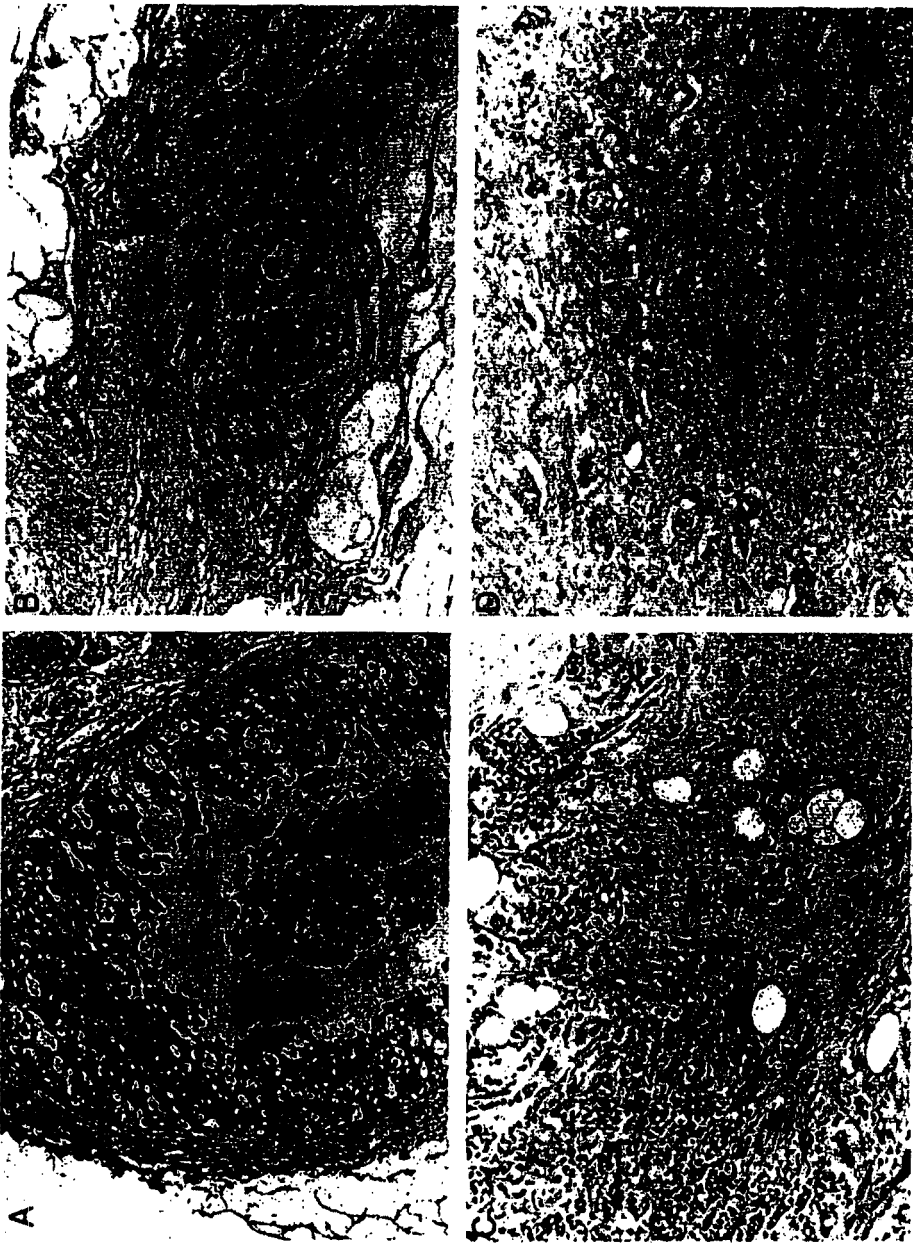


图15

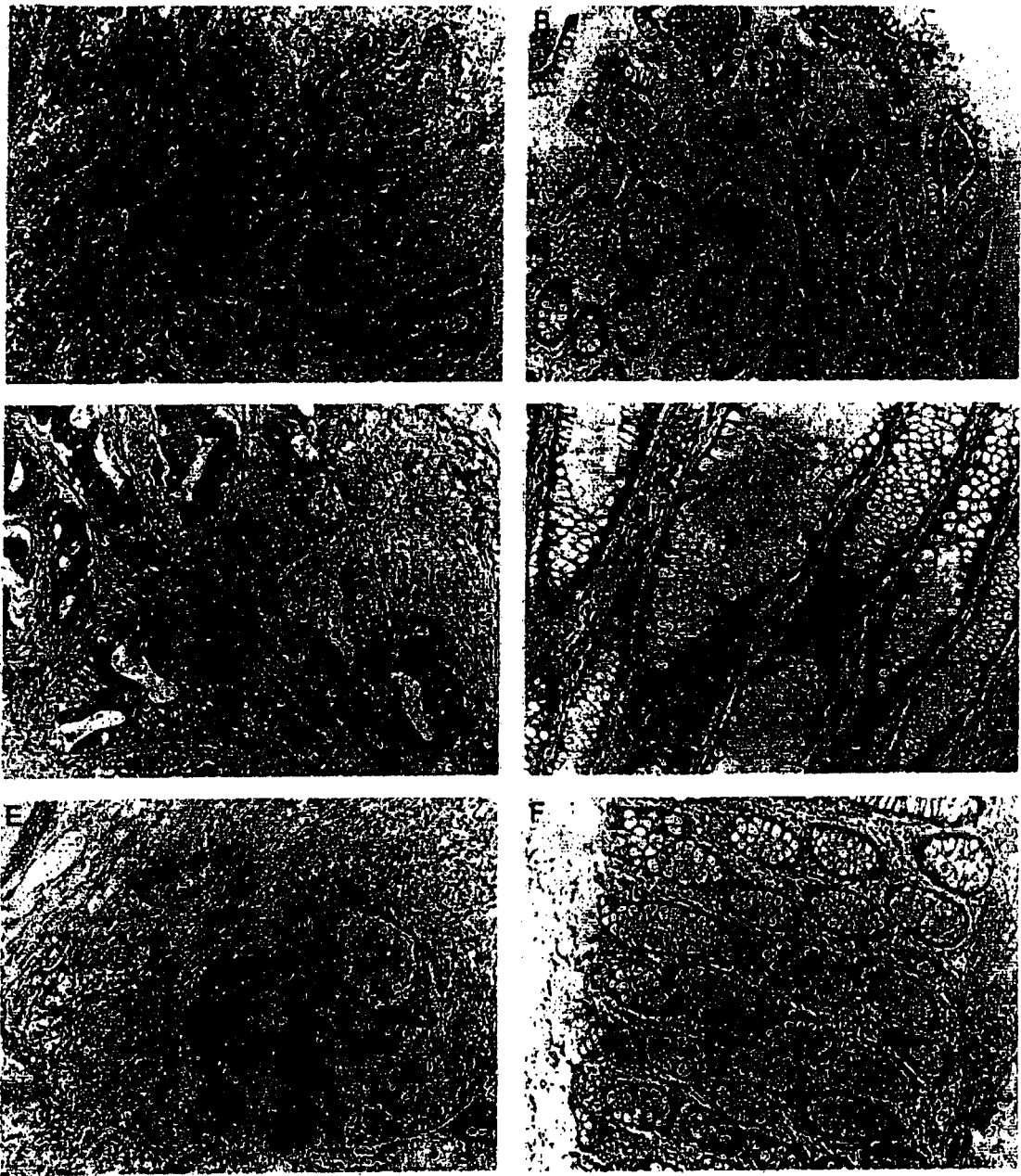


图16

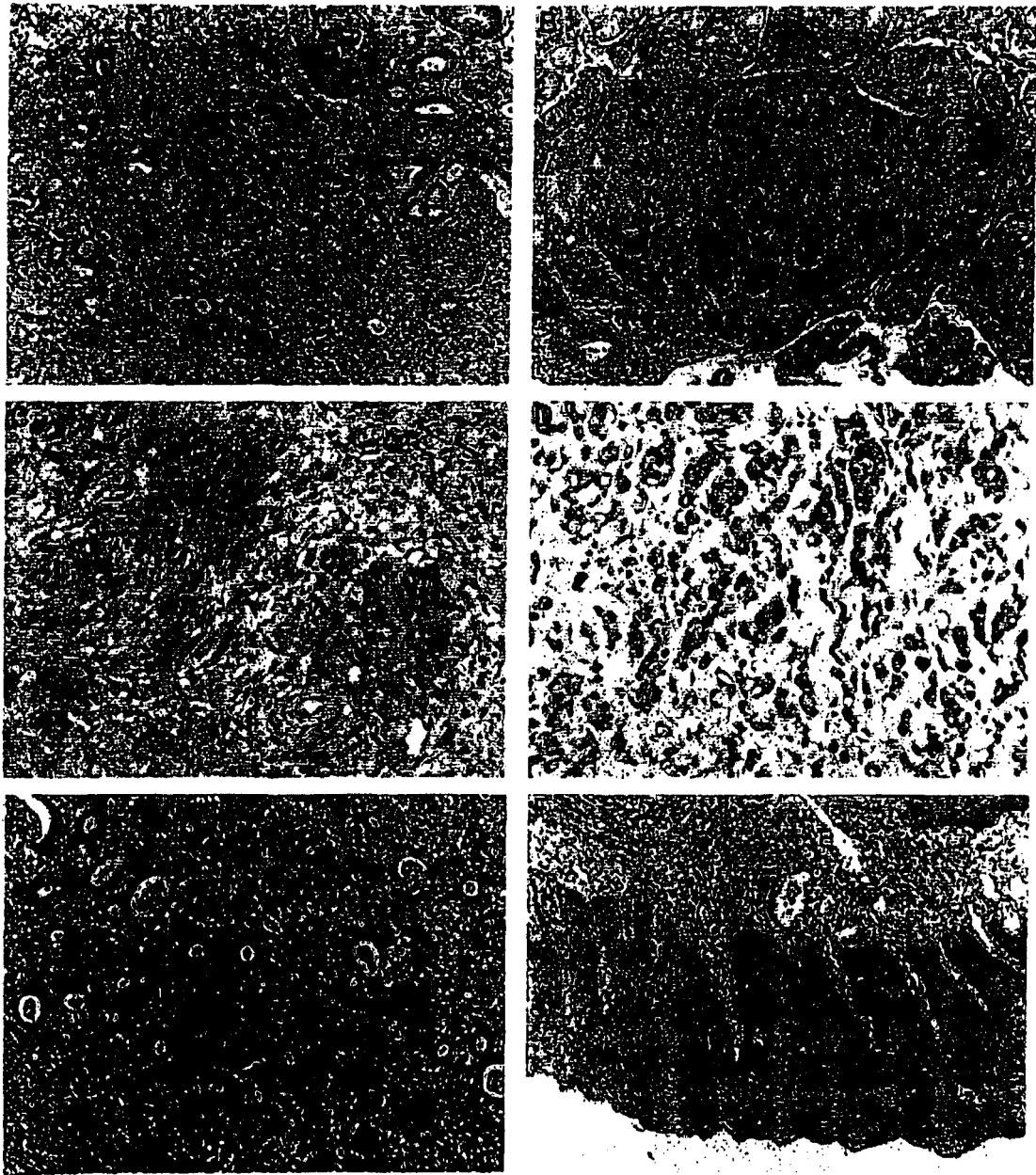


图17

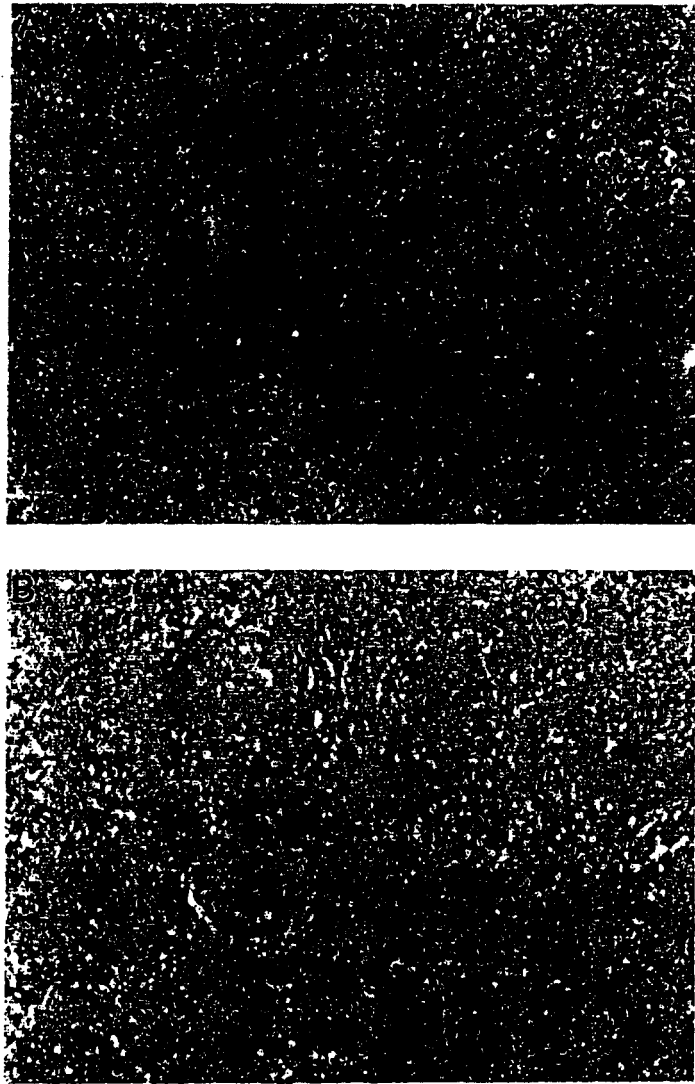


图18

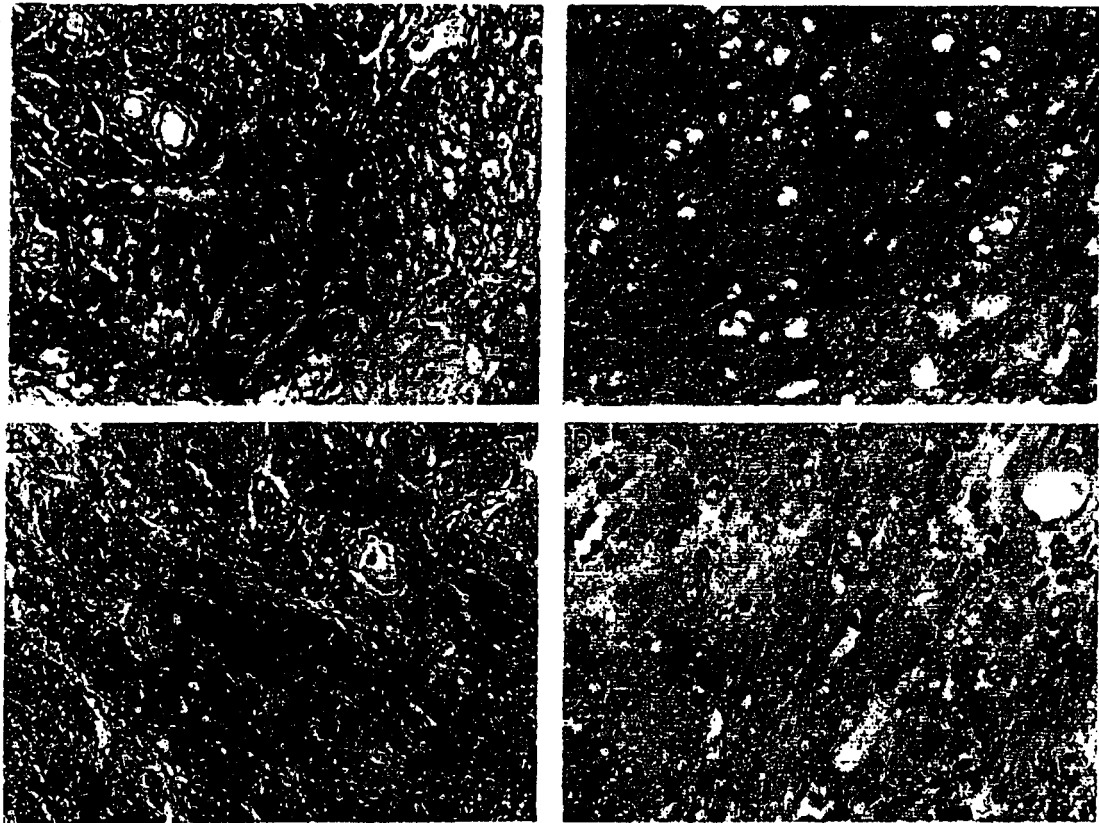


图19

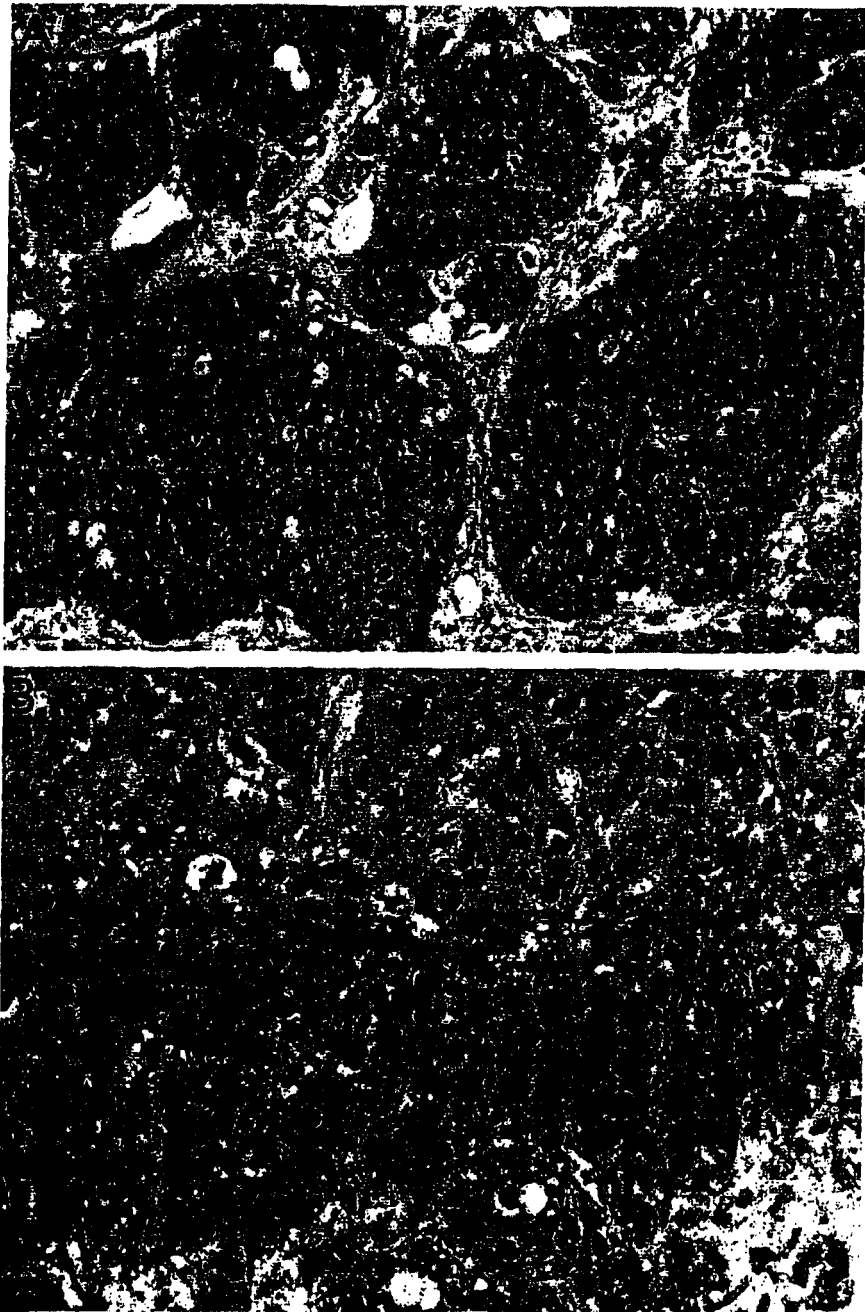


图20

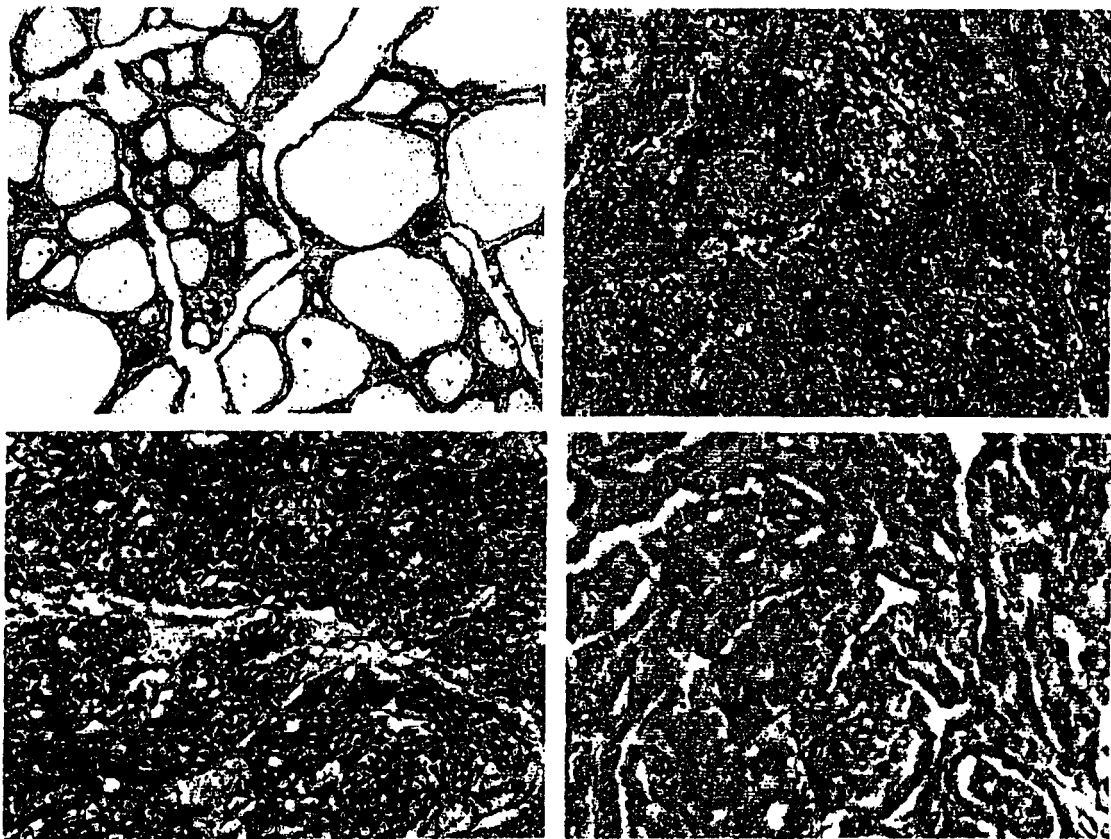


图 21

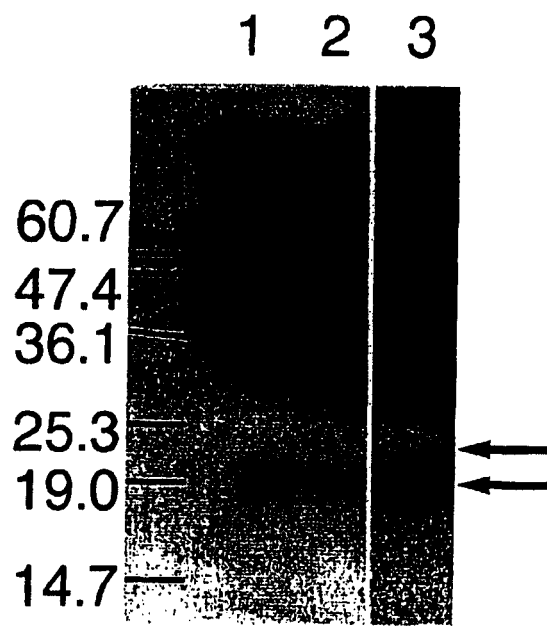


图 22

专利名称(译)	针对以活化素 β c水平的调节为特征的病症的诊断、治疗方法和有用试剂		
公开(公告)号	CN1745299A	公开(公告)日	2006-03-08
申请号	CN200380109564.9	申请日	2003-12-12
申请(专利权)人(译)	莫纳什大学		
当前申请(专利权)人(译)	莫纳什大学		
[标]发明人	S梅勒 G里斯布里奇 E鲍尔 H王 C麦克利恩 J佩德森 A奥康纳 M克兰菲尔德 N格鲁姆		
发明人	S·梅勒 G·里斯布里奇 E·鲍尔 H·王 C·麦克利恩 J·佩德森 A·奥康纳 M·克兰菲尔德 N·格鲁姆		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/574 A61K39/395 A61P35/00 C07K16/22 G01N33/74		
CPC分类号	C07K16/22 G01N33/74 G01N33/574		
代理人(译)	程泳		
优先权	2002953327 2002-12-12 AU		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明一般性地涉及对以活化素表达水平的调节为特征的病症的发展或进展进行诊断、预报或监测的方法，和更具体的是，对以活化素 β c亚基表达水平的调节为特征的病症的发展或进展进行诊断、预报或监测的方法。本发明还进一步提供对以异常、不想要的或其他不恰当的活化素表达为特征的病症进行治疗或预防性治疗的方法，所述病症例如以活化素过量表达或表达不足，尤其是活化素 β c亚基过量表达或表达不足为特征的病症。本发明的内容更进一步地延伸到了本发明的方法所用的试剂。

