

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2009-532060

(P2009-532060A)

(43) 公表日 平成21年9月10日 (2009.9.10)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	4 B 0 6 3
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 49/00	A 4 C 0 8 4
C 1 2 Q 1/48 (2006.01)	C 1 2 Q 1/48	Z 4 C 0 8 5
C 1 2 Q 1/42 (2006.01)	C 1 2 Q 1/42	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2009-504216 (P2009-504216)
 (86) (22) 出願日 平成19年3月30日 (2007.3.30)
 (85) 翻訳文提出日 平成20年11月28日 (2008.11.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/007913
 (87) 国際公開番号 W02007/123682
 (87) 国際公開日 平成19年11月1日 (2007.11.1)
 (31) 優先権主張番号 60/788,878
 (32) 優先日 平成18年4月3日 (2006.4.3)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 508050141
 メディクシス エス. エー.
 ギリシャ共和国 ジーアールー 1 4 5 6
 8 アテネ クリオネリ アスクリピオウ
 ストリート 4
 (74) 代理人 100102668
 弁理士 佐伯 憲生
 (72) 発明者 ニコラス バコプロス
 アメリカ合衆国 コネチカット州 0 6 3
 7 8 - 1 3 4 4 スターニントン チャ
 ーチ・ストリート 3 9
 (72) 発明者 コンスタンティノス アレヴィゾプロス
 ギリシャ共和国 ジーアールー 1 4 1 2
 1 ネオ イラクレイオ ダブリュー.
 ジャセミオン 3

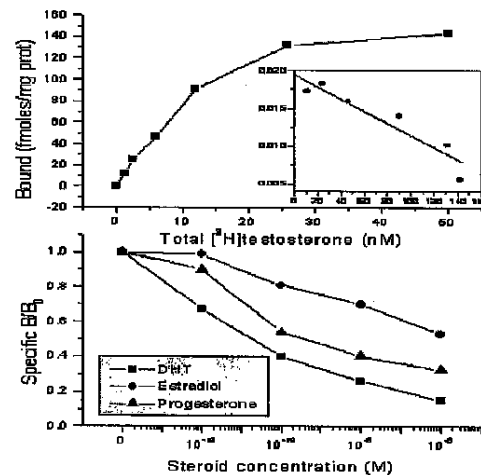
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 膜アンドロゲン受容体 (MAR) 薬剤の検出

(57) 【要約】

膜アンドロゲン受容体 (mAR) を調節する薬剤を検出するための方法を開示する。一態様では、本発明は、リガンド結合するmARを検出及び随意的に同定する方法を提供する。本発明による一アッセイは、古典的細胞内アンドロゲン受容体 (iAR又はAR) との結合に関連してmARを選択的に結合する薬剤を検出する。本発明は、mARを優先的に結合する化学物質に関する化学的ライブラリーをスクリーニングする方法を提供することを含む広範囲の有用な適用を有する。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

方法が、

a) m A R 及び検出可能に標識したアンドロゲン化合物を結合して第 1 の錯体を形成することを可能にする条件下で、m A R を当該化合物と接触させること；

b) 薬剤及び m A R の間を結合して第 2 の錯体を形成することを可能にする条件下で、第 1 の錯体を当該薬剤と接触させること；及び

c) 薬剤の存在を指標するものとして、第 1 の錯体からの検出可能に標識したアンドロゲン化合物の放出を検出すること；

の段階を包含する、膜アンドロゲン受容体 (m A R) の機能を調節する薬剤を検出する方法。

10

【請求項 2】

適切な対照と比較した、検出可能に標識したアンドロゲン化合物の放出の増加が、薬剤の更なる指標をもたらす、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

方法が、

a) m A R 及び検出可能に標識したアンドロゲン化合物を結合して第 1 の錯体を形成することを可能にする条件下で、m A R を当該化合物及び薬剤と接触させること；及び

b) 薬剤の存在を指標するものとして、第 1 の錯体に結合した検出可能に標識したアンドロゲン化合物の濃度の低下を検出すること；

の段階を包含する、膜アンドロゲン受容体 (m A R) の機能を調節する薬剤を検出する方法。

20

【請求項 4】

適切な対照と比較した、結合したアンドロゲン化合物の濃度の低下が、m A R を調節する薬剤の更なる指標をもたらす、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

方法が、

i) 細胞内アンドロゲン受容体 (i A R) 及び (同じ又は異なる) 検出可能に標識したアンドロゲン化合物を結合して第 3 の錯体を形成することを可能にする条件下で、i A R を当該化合物と接触させること；及び

i i) 当該化合物及び第 3 の錯体の間を結合させるようにする条件下で、第 3 の錯体を薬剤と接触させること；

の段階を更に包含する、請求項 1 ～ 4 に記載の方法。

30

【請求項 6】

方法が、細胞内アンドロゲン受容体 (i A R) 及び (同じ又は異なる) 検出可能に標識したアンドロゲン化合物を結合して第 3 の錯体を形成することを可能にする条件下で、i A R を当該化合物と接触させる段階を更に包含する、請求項 1 ～ 4 に記載の方法。

【請求項 7】

方法が、請求項 1 ～ 4 に記載の方法と本質的に並行して行われる、請求項 5 ～ 6 に記載の方法。

40

【請求項 8】

方法が、薬剤の存在を指標するものとして、適切な対照と比較した、薬剤の存在下での第 3 の錯体からの検出可能に標識したアンドロゲン化合物の殆ど無い放出を検出する段階を更に包含する、請求項 5 ～ 7 に記載の方法。

【請求項 9】

1 つ又はそれ以上の接触の段階が、m A R を発現すると知られているか又は考えられている細胞、細胞株、又は組織サンプルを用いて行われる、請求項 1 ～ 4 に記載の方法。

【請求項 10】

m A R を発現する細胞株が D U - 1 4 5 又は L N C a P である、請求項 1 ～ 4 に記載の方法。

50

【請求項 1 1】

m A R を発現する組織サンプルが前立腺組織である、請求項 1 ～ 4 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前立腺の組織が癌性であると分かっている又はその疑いのある、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

1 つ又はそれ以上の接触の段階が、i A R を発現する細胞、細胞株、又は組織サンプルを用いて行われる、請求項 5 ～ 8 に記載の方法。

【請求項 1 4】

i A R が一時的に細胞、細胞株又は組織サンプルによって発現される、請求項 1 3 に記載の方法。

【請求項 1 5】

細胞又は細胞株が、アンドロゲン応答配列 (A R E) を包含するレポーター遺伝子構築物を更に含有してなる、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

方法が、薬剤の存在を指標するものとして、適切な対照と比較して、レポーター遺伝子構築物からの殆ど無いシグナルを検出する段階を更に包含する、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

i A R が合成リボソーム組成物として存在する、請求項 5 ～ 8 及び 1 3 ～ 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 8】

方法が、m A R を発現すると知られているか又は考えられている細胞、細胞株又は組織サンプル由来の細胞亜分画を用いて行われる、請求項 1 ～ 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

方法が、i A R を発現する細胞の細胞亜分画を用いて行われる、請求項 1 ～ 1 7 に記載の方法。

【請求項 2 0】

アンドロゲン化合物が、少なくとも 1 つの放射性同位元素、蛍光色素分子、蛍光消光剤、酵素、親和性標識、又は化学発光、リン光発光若しくは発色団部分で検出可能に標識されている、請求項 1 ～ 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 1】

アンドロゲン化合物がトリチウムで検出可能に標識されている、請求項 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2】

検出可能に標識されているアンドロゲン化合物が、トリチウムジヒドロテストステロン ($^3\text{H}-\text{DHT}$) 又はトリチウムテストステロン ($^3\text{H}-\text{T}$) である、請求項 1 ～ 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 3】

アンドロゲン化合物が、アンドロゲン及びアンドロゲンと共有結合するリンカーを包含する、請求項 1 ～ 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

アンドロゲンがテストステロン又はジヒドロテストステロンである、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

リンカーが O-カルボキシメチルオキシリンカーであって、ステロイド環の 3'-炭素に結合している、請求項 1 ～ 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

検出する段階が、少なくとも 1 つの標識置換、表面プラズモン共鳴、蛍光共鳴エネルギー移動、蛍光消光、蛍光偏光、発光、化学発光、蛍光発光、吸収、及びシンチレーション

10

20

30

40

50

計数を用いて行われる、請求項 1～25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記薬剤が、ペプチド、ペプトイド、ポリペプチド、抗体又は抗原に結合するその断片、脂質、炭水化物、核酸、小分子、又はその組合せである、請求項 1～26 に記載の方法。

【請求項 28】

薬剤がリンカー及びアミノ酸配列と共有結合するアンドロゲン又はその誘導体である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

薬剤が配列に共有結合している以下の構造体：テストステロン又はその誘導体／リンカー／血清アルブミン又はその誘導体を有する、請求項 28 に記載の方法。

10

【請求項 30】

リンカーがカルボキシメチルエーテル基である、請求項 1～29 に記載の方法。

【請求項 31】

薬剤がテストステロン 3-(O-カルボキシメチル)オキシム-血清アルブミンである、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

薬剤が検出可能に標識されている、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

方法が、mAR の下流のシグナリング分子の迅速な調節を検出する段階を更に包含して、適切な対照と比較した、シグナリング分子の濃度の変化を検出する段階を更に包含する、請求項 1～32 に記載の方法。

20

【請求項 34】

シグナリング分子の調節を検出する段階が、グアニンヌクレオチド結合又は交換、キナーゼ活性、グアノシントリホスファターゼ活性、ホスファチジルイノシトール分解、ジアシルグリセロール、イノシトール三リン酸、アクチン再構成、レポーター遺伝子発現、及び細胞内カルシウム濃度の少なくとも 1 つの活性を測定することを包含する、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

キナーゼが、焦点接着キナーゼ (FAK) 又はホスファチジルイノシトール 3-(PI-3) キナーゼである、請求項 34 に記載の方法。

30

【請求項 36】

方法が、FAK のホスファチジルイノシトール 3-(PI-3) キナーゼとの関連性を検出することを更に包含する、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 37】

グアノシントリホスファターゼが Cdc42/Rac1 である、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 38】

グアノシントリホスファターゼが RHO である、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 39】

キナーゼが ROCK である、請求項 34 に記載の方法。

40

【請求項 40】

キナーゼが LIMK2 である、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 41】

細胞内カルシウム濃度を、カルシウムプローブ、カルシウムプローブに対する抗体、カルシウムイオノフォア、及びカルシウムキレート剤の少なくとも 1 つを用いて測定する、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 42】

方法が、mAR、iAR 若しくは両方を発現すると知られているか又は考えられている細胞、細胞株又は組織サンプルによって発現される前立腺特異抗原 (PSA) を迅速に検

50

出する段階を更に包含する、請求項 1～4 1 に記載の方法。

【請求項 4 3】

P S A を免疫学的に検出する、請求項 4 2 に記載の方法。

【請求項 4 4】

方法が、m A R を発現する細胞、細胞株又は組織サンプル内の細胞死（アポトーシス）を検出する段階を更に包含する、請求項 1～4 3 に記載の方法。

【請求項 4 5】

アポトーシスが、アネキシンをアッセイすることにより又は検出可能な小分子を用いることにより検出される、請求項 4 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

方法が、インビボでの i A R の活性化の何れかを検出する段階を更に包含する、請求項 1～4 5 に記載の方法。

【請求項 4 7】

方法が、薬剤を精巣摘出を受けた哺乳類に投与する段階を更に包含する、請求項 4 6 に記載の方法。

【請求項 4 8】

方法が、適切な対照と比較して、哺乳類において、以下の特性：

- a) 前立腺の重さをほとんど又は全く増加させない、
- b) 体重をほとんど又は全く増加させない、
- c) 体脂肪をほとんど又は全く増加させない、及び
- d) 骨密度をほとんど又は全く増加させない；

の少なくとも 1 つを有する薬剤を選択することを更に包含する、請求項 4 7 に記載の方法。

【請求項 4 9】

方法が、薬剤の存在を更に指標することとして、前記特性の少なくとも 1 つを有する薬剤を選択することを更に包含する、請求項 4 8 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

（関連出願）

本出願は、2 0 0 6 年 4 月 3 日に提出された米国特許仮出願第 6 0 7 8 8 , 8 7 8 号及び 2 0 0 6 年 4 月 3 日に提出されたギリシャ特許出願第 G R 2 0 0 6 / 0 1 0 0 2 0 7 号に係る優先権を主張するものであり、前記特許出願の全内容を参照して本明細書に組み込む。

【0 0 0 2】

本発明は、一般に膜アンドロゲン受容体（m A R）を調節するリガンド及び他の薬剤の検出に関する。特に本発明は、そのような薬剤を検出するための方法を提供する。本発明の好ましいアッセイは、細胞内アンドロゲン受容体（i A R 又は A R）に結合することと比較して m A R を選択的に結合するリガンドを検出する。本発明は、m A R を特異的に結合するリガンドを検出する。本発明は、特異的に m A R を結合する要素に関する化学的ライブラリーをスクリーニングするための方法を提供することを含む広範囲の有用な適用を有する。

【背景技術】

【0 0 0 3】

アンドロゲン活性が細胞内アンドロゲン受容体（本明細書では i A R 又は A R として示す）に結合することに介在されるという認識がある。i A R は、リガンドに活性化される転写因子として機能する核内受容体スーパーファミリーの構成要素として知られている。i A R を発現する細胞に対するアンドロゲン効果は、受容体に結合することを含むと報告されている。更なる効果は、アンドロゲンの内在化、2 量化、核転座、核酸結合、及びアンドロゲン感受性遺伝子の活性及び発現を含む。アンドロゲン介在の遺伝子発現（A R を

10

20

30

40

50

介して作用する)は、一般に数時間掛かる。一般には例えば、Pietras、, RJ. et al.(2001) Endocrine 14:417-427, Kumar, MV (1998) Prog. nucleic Acids Res. Mol. Biol. 59:289-306及びこれらに引用されている文献を参照されたい。

【0004】

ジヒドロテストステロン(DHT)のようなある特定のアンドロゲン誘導体は、天然のARリガンドであると考えられる。これらの影響を最小化又は阻止する薬を開発する試みが報告されている。例えば、多くの小分子ARモジュレータは、酢酸シプロテロン、フルタミド、クロルアミドン(chloramidone)、ピカルタミド、若しくはある特定のキノリン及びキノリノン誘導体を含む。例えば、PCT/IB2005/002592号(国際公開第2006/024931号公報)、PCT/US2004/038859号(国際公開第2005/052211号公報)、PCT/2004/027483(国際公開第2005/018573号公報)、PCT/2005/013775号(国際公開第2005/105091号公報)、PCT/US2005/029592号(国際公開第2006/026196号公報)、及びPCT/IB2005/002592号(国際公開第2006/024931号公報)、並びにこれらに開示されている文献を参照されたい。

10

【0005】

少なくともいくつかのアンドロゲンの生物学的活性が、AR結合による(数時間)と説明され得るものより更に迅速(数分以内)であるとの認識が高まっている。これらの説によると、「非古典的な」ステロイド結合要素、即ちARを含まない結合要素が報告されている。Papakonstanti, E. et al. (2003) Molecular Endocrinology 17:870; Koukoutaki, S. B. et al. (1999) Mol. Med. 5:731; 及びこれらに引用されている文献を参照されたい。

20

【0006】

より具体的には、最小のiARを発現するか又はiARを発現しない細胞内のアンドロゲン膜結合部位が報告されている。そのような細胞は、これらに限定はされないが、Tリンパ球、単球、骨芽細胞、前立腺組織及びある特定の細胞株を含む。mARの調節に含有される報告された一般的な要素は、細胞内カルシウムの増加、検出可能な前立腺特異抗原(PSA)の増加、細胞死(アポトーシス)の増加及び実質的なアクチン再構成を含む。Gorczyńska, E. and Handelsman, DJ (1995) Endocrinology 136:2052; 及びKampa, M. et al (2002) FASEB J. 16:1429を参照されたい。

30

【0007】

mARの分布及び機能が再検討されている。Kampa, M. E. Castanas (2006) in Mol. And Cell. Endocrinology 246:76; 及び本明細書に開示の文献を参照されたい。端的に、mAR活性化は、アクチン再構成、アポトーシス及び細胞内カルシウム濃度の調節における鍵となる働きをする考えられている。mARが新規な治療標的を示すことができると提案されている。Kampa, M. E. Castanas (2006) ibid; Hatzoglou, A. et al. (2005) J. of Clinical Endocrinology & Metabolism, 90:893; Kampa, M. et al. (2002), ibid; Sathopoulos, E. et al. (2003) BMC Clinical Pathology 3:1; 及びこれらに引用されている文献を参照されたい。

40

【0008】

mARを調節する薬剤を検出することが望ましいであろう。ARの調節の何れかと比較して、優先的に調節する薬剤を検出する方法を有することがより望ましいであろう。更に好ましい方法は、ARに結合することと比較して、特異的にmARを結合する受容体結合リガンドを検出することができるものであろう。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

(発明の概要)

本発明は一般に、膜アンドロゲン受容体(mAR)を調節する(増加させる又は減少させる)薬剤を検出する方法に関する。特に本発明は、細胞内膜受容体(iAR又はAR)

50

の調節と比較して、m A Rを優先的に調節する薬剤を検出するために用いることができる方法に関する。より具体的な方法は、A Rと比較して特異的にm A Rを結合するものからリガンドを検出及び同定するために用いることができる。本発明は、特異的にm A Rを結合する分子に関する化学的ライブラリーをスクリーニングするために用いることのできる方法を提供することを含む広範囲の有用な適用を有する。

【課題を解決するための手段】

【0010】

例示的な薬剤は、受容体結合リガンド及びその様な分子である。そのような薬剤は、本明細書に記述のように、インビトロ及びインビボ方法の1つ又は組み合わせを用いることにより同定できる。本発明による同定の方法(又は方法の組み合わせ)の選択は、分析する薬剤の数、所望の特異性及び選択性、及び使用者が実施出来る方法の数のような認識するパラメータにより誘導されるであろう。

10

【0011】

よって、一態様では、本発明は、m A Rの機能を調節(増加又は減少)できる薬剤を検出する方法を提供する。一態様では、方法は少なくとも1つの、及び好ましくは全ての、下記段階を含有してなる：

a) m A R及び検出可能に標識したアンドロゲン化合物を結合して第1の錯体を形成することを可能にする条件下で、m A Rを当該化合物と接触させること；

b) 薬剤及びm A Rの間を結合して第2の錯体を形成することを可能にする条件下で、第1の錯体を薬剤と接触させること；及び

20

c) 薬剤の存在を指標するものとして、第1の錯体からの検出可能に標識したアンドロゲン化合物の何れかの放出を検出すること。

【0012】

検出可能に標識したアンドロゲン化合物及び薬剤が本発明に用いられる場合の順番は、意図する結果が達成される限り、重要ではないことを理解されるであろう。よって一態様では、方法は、場合によっては過剰のアンドロゲンで、被検薬剤の添加前に、第1の錯体を形成するように適応されてもよい(飽和形式)。あるいは、薬剤及び検出可能に標識したアンドロゲンは、同時に添加して第1の錯体を形成してもよい(競合形式)。更に別の方法の態様では、検出可能に標識したアンドロゲンは、スクリーニングする薬剤の添加の後に加えられる。

30

【0013】

よって一態様では、本発明は、少なくとも1つの及び好ましくは全ての下記段階を含むm A Rの機能を調節する薬剤を検出することを包含する：

a) m A R及び検出可能に標識したアンドロゲン化合物を結合して第1の錯体を形成することを可能にする条件下で、m A Rを当該化合物及び薬剤と接触させる(例えば、それらを一緒に混合することにより又はそれらを1つずつ組み合わせることにより)こと；及び

b) 薬剤の存在を指標するものとして、第1の錯体に結合した検出可能に標識したアンドロゲン化合物の濃度の低下を検出すること。

【0014】

40

前記発明の態様では、第1の錯体は、被検薬剤の存在下で形成される。検出可能に標識したアンドロゲンと薬剤は、m A Rに結合するために競合する。m A Rと薬剤の間に形成した何れの錯体も、本明細書で「第2の錯体」として示す。この態様では、検出可能に標識したアンドロゲン化合物の濃度の減少(例えば、第2の錯体は第1の錯体より多く検出される)は、m A Rを調節する薬剤を指標するものとして扱われる。スクリーニング成分の添加の順番は重要ではないが、多くの場合被検薬剤の添加に先行して第1の錯体を形成することが有用であろう。

【0015】

本発明の最適な実施のために常時必要とされるわけではないが(例えば、特定の薬剤又は公知の薬剤の受容体活性の場合)、多くの場合適切な対照を1つ又は組合せて含むのが

50

有益である。一般に、「適切な対照」は、薬剤又は複数の薬剤の存在しない場合と比較したそのような薬剤又は複数の薬剤の活性についての情報を提供するであろう。或いは又は更に、「適切な対照」は、ARに関しての薬剤又は複数の薬剤の活性についての情報を提供するであろう。そのような対照の賢明な使用は、mARを特異的に結合できる薬剤の検出の可能性を高めることを含む、多くの実用的な利益を提供可能である。検討したように、目的とする特定の薬剤は、mAR活性を確実に増加させ、そして本明細書で提供されるような対照のアッセイの1つ又は組合せにおいてほとんど若しくは全く活性のないことも好ましく示すであろう。例として、目的とする特定の薬剤は、第1の錯体からの検出可能に標識したアンドロゲン化合物の放出の実質的な増加を、直接的又は間接的のどちらかでもたらしることができる。好ましくは、その薬剤は、mARを調節する能力の何れかを検出及び付加的に定量するよう設計された適切な対照アッセイにおいてほとんど又は全く活性を示さない。

10

【0016】

従って、ARの調節を検出するよう設計されたような適切な対照アッセイの1つまたはそれ以上を実施することは多くの場合有用であろう。同定の態様では、薬剤がmAR活性を増加させる能力を評価して、その薬剤がAR機能を増加させる又は減少させる能力と比較する。より特異的な対照アッセイは、薬剤を適切な細胞又はARを発現することが公知の細胞の細胞垂分画（例えば、膜、核、若しくは細胞質分画）と接触させることを含む。そのような対照アッセイは、薬剤の活性を検出することを含む。その活性は、対照アッセイ中に直接的にモニタリングしてもよい（例えば受容体結合をモニタリングすることにより）又は間接的にモニタリングしてもよい（例えば、ARからの「下流」の分子をモニタリングすることにより；遺伝子の転写、翻訳若しくはARの特異タンパク質発現をモニタリングすることにより）。この態様に沿った例示的な対照は、受容体リガンドとしてのARを結合する薬剤の能力を検出及び付加的に定量するよう設計したものである。本発明による好ましい薬剤は、本明細書に開示される対照アッセイの1つ又は組合せによるAR活性の増加をほとんど示さないか又は全く示さないであろう。更に好ましい薬剤は、本発明のmARアッセイの1つ又はそれ以上における実質的な活性を示し、そしてAR対照アッセイの何れかにおいては活性をほとんど又は全く示さない。

20

【0017】

本発明の適切な対照アッセイの一態様では、少なくとも1つの、及び好ましくは全ての下記の段階が実施される：

30

i) iAR及び検出可能に標識したアンドロゲン化合物を結合して第3の錯体を形成することを可能にする条件下で、iARを当該化合物と接触させること；及び

ii) 当該化合物及び第3の錯体の間を結合させるようにする条件下で、第3の錯体を被検薬剤と接触させること。

好ましい薬剤は、第3の錯体からの検出可能に標識したアンドロゲンの放出をほとんど又は全くもたらさないであろう。

【0018】

別の適切な対照の態様では、iARを、検出可能に標識したアンドロゲン化合物及び薬剤と接触させる。iAR及び薬剤を結合して第3の錯体を形成することを可能にする条件下での接触が好ましい。本発明のこの例示では、対照は、競合的形式中で第3の錯体の形成をもたらす。iARと薬剤の間に形成する第3の錯体の何れかを、本明細書で「第4の錯体」として示す。或いは、被検薬剤を、iAR及び検出可能に標識したアンドロゲンの間の接触に先行して、第3（又は第4）の錯体の形成に有利に働く条件下でiARと接触させてもよい。

40

【0019】

本発明は適応性があり、目的とする使用に適合するように必要に応じて改変できる。よって例えば、1つの又は前述の対照に用いる検出可能に標識したアンドロゲン化合物は、選択したmARアッセイに用いるものと同一又は異なってもよい。所定の対照に用いるための検出可能に標識したアンドロゲンの選択は、選択した特異的対照アッセイ、被検

50

薬剤の数、及び所望のアッセイ感受性のような認識されるパラメータにより誘導されるであろう。

【0020】

本発明の最適な実施のために常時必要であるわけではないが、多くの場合、薬剤のmAR機能を調節する能力をテストする方法を、薬剤がARを調節する能力の何れかを検出するための対照（又は複数の対照）と、本質的に並行して実施することが有益であろう。よって一態様では、1つ又は組み合わせたmARスクリーニングアッセイは、薬剤のARを調節する能力を検出するための対照アッセイの1つ又は組合せと本質的に並行して実施する。理解されるであろうように、特定のmARアッセイ及び対照アッセイを並行して（即ち、同時に）実施することが常時必要であるわけではない。例えば、所定の薬剤（又は複数の薬剤）に関してARの活性が相対的に公知であるような態様では、選択したmARアッセイを実施する度に対照を実施する必要はないであろう。或いは、及び多数の薬剤をスクリーニングするような（例えば、大きな化学的ライブラリーを試験するような場合）態様では、そこでの1つ又は組合せの対照アッセイは最適な結果を達成するために必要ではないだろう。例えば、最初にmARを活性化する能力を検出することによる薬剤のスクリーニングを行い、次いで対照アッセイの1つ又は組合せを用いて更なるテストを引き続き実施することが有用であろう。

10

【0021】

本発明の多くの態様に関して、特に本発明をハイパー又はウルトラハイースループットスクリーニング（HTS）形式に従って用いるような態様では、AR調節をモニタリングするための少なくともいくつかの対照アッセイを含むのが有用であろう。そのような形式は、mAR活性化能に関する多数の候補薬剤を分析するために特に有用である。

20

【0022】

対照アッセイを第3の錯体（iAR及び検出可能に標識したアンドロゲン化合物の間に形成される）を検出するために用いるような態様では、方法は、薬剤の存在下で第3の錯体からの検出可能に標識したアンドロゲン化合物の放出を検出する段階を更に含むであろう。好ましくは、そのような薬剤は第3の錯体からの標識したアンドロゲン化合物の放出をほとんど又は全く示さないであろう。

本発明のこれら及び他の使用並びに利点は、以下の検討及び実施例から明らかであろう。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0023】

（発明の詳細な説明）

検討したように、本発明は、mAR結合を増大又は低下させる薬剤を検出するために用いることができる。好ましい薬剤は、ARを調節する能力と比較して、優先的に又は排他的にのどちらかでmARの活性化を増大する受容体リガンドである。好ましい受容体リガンドは、ARを結合して活性化する能力をほとんど又は全く有さずにmARを特異的に結合する。

【0024】

本明細書で用いる「薬剤」（複数形を含む）は、非共有又は共有結合のどちらかにより、mAR又はAR（又は両方）と結合可能な部分を意味する。好ましい薬剤は、本明細書に開示されている方法の1つ又は組合せにより判定されるようなmARと、直接的又は間接的のどちらかで優先的に結合する。より好ましい薬剤は、「リガンド」である。「リガンド」は、一般的に非共有結合を介し、mAR（又はAR）を結合する特定の薬剤を意味する。好ましいリガンドは、本明細書に開示されているアッセイの1つまたはそれ以上によって、結合の検出を可能にするのに十分な受容体結合定数を有する。そのようなアッセイの具体例は、受容体結合錯体の形成又は分解、二次メッセンジャーの検出、アポトーシスの検出、前立腺特異抗原（PSA）の検出、細胞内カルシウムの検出、タンパク質ーリガンド結合を測定する結合アッセイ、抗体ー抗原の相互作用を測定する免疫アッセイ又は細胞骨格の再構築を直接的又は間接的にモニタリングすることを含む。本発明による例

40

50

示的なリガンドは、テストステロン及びその誘導体（例えば、DHT）のような特定のアンドロゲンである。他の適切なリガンドは、抗体、抗原、酵素、ペプチド、ポリペプチド、ペプチド、核酸、ステロイド、又はmARを結合する小分子リガンドを含む。好ましいリガンドは、一般に受容体-リガンド錯体を形成するために、ARと相互に作用する能力をほとんど又は全く持たずにmARを特異的に結合する。

【0025】

本明細書で用いる「二次メッセンジャー」という用語は、mAR又はARの活性化により、産生された又は濃度を変化させられる分子を意味する。「二次メッセンジャーの濃度変化」という用語は、候補モジュレータの非存在下で実施したアッセイにおいて検出した量と比べて、所定の二次メッセンジャーの検出した濃度の少なくとも約10%の増加又は減少を意味する。例示的な二次メッセンジャー（シグナリング）分子は、本明細書中に提供される。

10

【0026】

「特異的に結合する」という用語又は同様の用語は、別の分子（例えば、受容体）を結合して、それにより特異的な結合対を形成する、本明細書に開示されている分子（例えば、薬剤）を意味する。好ましくは、分子は、例えば、ウエスタンブロッティングELISA、RIA、移動度シフトアッセイ、酵素免疫アッセイ、競合アッセイ、飽和アッセイ、又は当該技術分野で公知の他のタンパク質結合アッセイにより判定されるように、他の分子を認識しないか又は結合しない。一般に、Ausubel, et al. supra; Harlow and Lane in, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988) 及び適切な免疫学的方法及び分子間の特異的結合を検出するための方法の実施例に関してそれらで引用されている文献を参照されたい。好ましい態様では、薬剤及びmARの間の「特異的結合」は、一般に0.01nM～約100nM、好ましくは約0.1nM～約10nMの範囲の、1mM又はそれ以下のK_dで明示される。K_dを判定するための多種の標準的方法は本明細書に開示されている。

20

【0027】

本発明のmARアッセイが1つ又はそれ以上の二次メッセンジャー、細胞内カルシウム、PSA分泌、又は細胞骨格の再構築を検出するような態様では、mARが最大の効果を発揮していると思われる時間の間に、即ち約3時間以内に、好ましくは約1～約2時間以内に、より好ましくは約数分～約30分以内に、検出を行うであろう。一方で、アポトーシス効果は、より長い時間、即ち約数時間～数日間、例えば1、2、3又は4日～1週間の後に検出してもよい。

30

【0028】

薬剤、特にmARと結合して（例えば、非共有的に結合して）そして天然のmARリガンド（例えば、テストステロン）の影響を最小化するmAR受容体リガンドは、本明細書で「mARアゴニスト」として示す。一方で、天然のmARリガンド（例えば、テストステロン）の影響を阻止する薬剤は、「mARアンタゴニスト」と称する。

【0029】

より広範に、本発明のmARアゴニストは、mARが介在する1つ又はそれ以上の生物学的応答を、天然のリガンド（例えば、テストステロン又はDHT）の結合のような適切な対照と比較して、少なくとも約2倍、好ましくは約5倍、より好ましくは約10倍、及び最も好ましくは約100倍又はそれ以上（即ち、約150倍、200倍、250倍、500倍、1000倍～10,000倍）まで、調節する（この場合増大する）であろう。他方で、本発明によるmARアンタゴニストは、mARが介在する1つ又はそれ以上の生物学的応答を、天然のリガンドの存在中の応答と比較して、少なくとも約2倍、好ましくは約5倍、より好ましくは約10倍、及び最も好ましくは約100倍又はそれ以上（即ち、約150倍、200倍、250倍、500倍、1000倍～10,000倍）まで、調節する（この場合低減する）であろう。

40

【0030】

「アンドロゲン」（複数形も含む）という用語は、本明細書では、脊椎動物における男性的特徴の発達を刺激する、天然の、合成の、半合成の、又は組換えの物質の何れかを包

50

含するよう用いられる。好ましいアンドロゲンは、一般に、以下に検討するような公知のアッセイの1つ又は組合せにより、mARを調節する能力を実証する。より特定のアンドロゲンは、男性付属性器の活性を制御するそれら天然又は合成の化合物を含む。アンドロゲンは、ある場合「アンドロゲンホルモン」として、又はいくつかの場合「精巢」として知られている。

【0031】

本発明によるより特定のアンドロゲンは、一般に認められるインビトロ又はインビボのアッセイにおいて有意な活性を示す。例えば、PCT/IB2005/002592号(国際公開第2006/024931号公報)、PCT/US2004/038859号(国際公開第2005/052211号公報)、PCT/2004/027483(国際公開第2005/018573号公報)、PCT/2005/013775号(国際公開第2005/105091号公報)、PCT/US2005/029592号(国際公開第2006/026196号公報)、及びPCT/IB2005/002592号(国際公開第2006/024931号公報)、並びにそれらに開示されている文献におけるARの調節をテストするアッセイを参照されたい。

【0032】

アンドロゲンを同定するための適切なインビトロアッセイは、「放射性リガンド置換アッセイ」と当該技術分野で称されているものである。端的に、アッセイは、AR受容体リガンド(例えば、DHT)を置換する能力を検出及び好ましくは測定する。この一般的なテストの多様な操作は、所定の薬剤の IC_{50} 、 K_d 及び K_i 値を確認するために実施されてもよい。PCT/IB2005/002592号(国際公開第2006/024931号公報)、PCT/US2004/038859号(国際公開第2005/052211号公報)、PCT/2004/027483(国際公開第2005/018573号公報)、PCT/2005/013775号(国際公開第2005/105091号公報)、PCT/US2005/029592号(国際公開第2006/026196号公報)、及びPCT/IB2005/002592号(国際公開第2006/024931号公報)、並びにそれらに開示されている文献の1つ又はそれ以上、例えばPCT/US2005/002592号(国際公開第2006/026196号公報)、具体的には54~56ページを参照されたい。適切なインビボアッセイは、適切な動物モデルにおける睪丸切除に続いて、前立腺(及び必要であれば、副器官)を測定する。他の好ましいアッセイ形式に関して Chang et al. (1984) J. Steroid Biochem. 20:1-17; 及び Chang et al. (1992) PNAS 89:5546も参照されたい。よって本発明による「アンドロゲン」は、これらのアッセイの1つ又はそれ以上において良好な活性を示すであろう。

【0033】

アンドロゲンの「誘導体」は、テストステロンと構造的及び機能的な関係を持ち、1つ又はそれ以上の新たな化学基もまた有するものである。そのような基は、これらに限定はされないが、飽和基、不飽和基、アルキル基(アルカン、アルケン、アルキン及びヘテロアルキルを含む)、アリール基(アレーン及びヘテロアリールを含む)、アルコール、エーテル、アミン、アルデヒド、ケトン、酸、エステル、アミド、環状化合物、複素環式化合物(プリン、ピリミジン、ベンゾジアゼピン、 β -ラクタム、テトラサイクリン、セファロsporin、及び炭水化物を含む)、他のステロイド(エストロゲン、他のアンドロゲン、コルチゾン、エコジソン(ecodyson)等を含む)、アルカロイド(麦角、ビンカ、クラレ、ピロリジジン、及びマイトマイシンを含む)、有機金属化合物、ヘテロ原子ベアリング化合物、アミノ酸、及びヌクレオシドを含む。

【0034】

より特定のアンドロゲン及びアンドロゲン誘導体は、これに限定されないが、副腎アンドロゲン、即ち副腎皮質により合成された19-炭素ステロイドの何れかを含む。他のアンドロゲンは、テストステロン、ジヒドロテストステロン(DHT)、特に5- α -ジヒドロテストステロン、デヒドロエピアンドロステロン(DHEA、デヒドロイソアンドロステロン又はデヒドロアンドロステロンとも呼ばれる)、アンドロステンジオン、アンド

ロスタンジオール； 及び天然の、合成の又は半合成の誘導体、並びにその塩を含む。本発明の「アンドロゲン」は、塩、好ましくは薬学的に許容されるものとして提供されてもよい。そのような塩の具体例は、無機酸付加塩、例えば塩酸塩、硫酸塩、若しくはリン酸塩のような、又は有機酸付加塩、例えば酢酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、酒石酸塩、若しくはクエン酸塩のような、酸付加塩を含む。薬学的に許容される塩は、金属塩、特にナトリウム塩若しくはカリウム塩のようなアルカリ金属塩；マグネシウム若しくはカルシウム塩のようなアルカリ土類金属塩；アンモニウム若しくはテトラメチルアンモニウム塩のようなようなアンモニウム塩；又はリジン、グリシン若しくはフェニルアラニン塩のようなアミノ酸付加塩も含んでいてよい。付加的な塩は、ナトリウム、塩化物、臭化物、フマル酸塩、クエン酸塩、プロピオン酸塩、安息香酸塩、シピオン酸塩、及びカプリン酸塩を含む。

10

【0035】

テストステロンの多くの誘導体が公知であり、D(-)ノルゲステレル、エピテストステロン、17-安息香酸テストステロン、17-フェニルプロピオン酸テストステロン、17β-シピオン酸テストステロン、テストステロン3-(O-カルボキシメチル)オキシム、テストステロン3-(O-カルボキシメチル)オキシム；BSA、テストステロン3-(O-カルボキシメチル)オキシム；BSA-フルオレセインイソチオシアネート複合体のようなテストステロンのオキシム、酢酸テストステロン、テストステロンβ-D-グルクロニド、テストステロンβ-D-グルクロニドナトリウム塩、エナント酸テストステロン、イソカプロン酸テストステロン、プロピオン酸テストステロン、テストステロン-d3、17-α-2-カルボキシ-エチル-テストステロン-γ-カルボキシ-エチル-ラクトン、酢酸テストステロン、テストステロン-β-D-グルクロニド、及び17-α-(2-カルボキシエチル)テストステロン-γ-ラクトン、5α-アンドロスタン-17β-オール-3-オン、17-安息香酸アンドロスタノロン、プロピオン酸ジヒドロテストステロン、メチルトリエノロン、アンドロスタノロン、ジヒドロテストステロン、17-ヒドロキシアンドロスタン-3-オン、ヘルマロン (hermalone)、酢酸アンドロスタノロン、5β-ジヒドロテストステロン、プロピオン酸アンドロスタノロン、エナント酸ジヒドロテストステロン、メスタノロン、17-プロモアセトキシジヒドロテストステロン、及びエンジステロン (emdisterone) を含む。

20

【0036】

Hauptman, H. (2003) Steroids 68:629 (ジヒドロテストステロンの1α-及び17α-アミノアルキル誘導体を記載している) も参照されたい。テストステロンの更なる誘導体を開示している、国立医学図書館 (the National Library of Medicine) (8600 Rockville Pike, Bethesda, MD 20894 (USA)) の公開化学データベース (Pub Chem Database) も参照されたい。

30

【0037】

本発明の範囲内の他の特定のテストステロン誘導体は、例えば、テストステロン又はDHTが、より大きなタンパク質分子に、適切なリンカーを介して直接的又は間接的のどちらかで接続しているような分子を含む。本目的のための例示的なタンパク質は、約30kD~約100kD、好ましくは約40kD~約80kD、及びより好ましくは約60kDの分子量を有する。1つの例示的なタンパク質は、ウシ血清アルブミン (BSA) 又はヒト血清アルブミン (HSA) のような血清アルブミンである。例示的なアルブミン (適切なその分画及び誘導体を含む) は、以下に検討する。分子量は、ゲル電気泳動を含む標準的方法により測定する。所望であれば、テストステロンに接続したタンパク質は、例えばGFPのように、それ自身を検出可能であってもよい。

40

【0038】

本発明による更なるアンドロゲンは、米国食品医薬品局 (USFDA) のインターネットウェブサイトが開示されている。特に、Endocrine Knowledge Disrupter Base (EKDB) は、アンドロゲン性 (及び/又はエストロゲン性活性) を持つと報告されている約2000の天然の又は合成の化合物を掲載している。そのような活性を測定する生物学的ア

50

ッセイに関するデータが含まれている。アンドロゲンの概説及びその検出のためのインシリコの方法に関する Fang, H. et al. (2003) Chem. Res. Toxicol. 16:1338も参照されたい。

【0039】

本明細書に開示されている適切な対照アッセイの大部分に関して好ましいアンドロゲンは、テストステロン又はDHTである。しかし、他のアンドロゲン、特にテストステロン誘導体を1つ又はそれ以上のそのようなアッセイに用いることができる(例えば、メチルトリエノロン)ことは理解されるであろう。一般に、DHTは天然のARリガンドである場合に選択される。

【0040】

検討したように、本発明の目的は、薬剤、例えばmARを結合できる、受容体結合リガンド、を検出及び随意的に同定することである。そのような薬剤の代表的なものはmARアゴニストである。「膜アンドロゲン受容体」(複数形及び「mAR」のような短縮形を含む)とは、アンドロゲン介在の効果を「迅速に」、即ち3時間以内に、好ましくは約1〜約2時間未満で、より好ましくは1時間足らずで、更に好ましくは約数分(例えば1又は2分)から約30分までに、発揮するアンドロゲン感受性受容体を意味する。Kampa, M. E. Castanas (2006), *ibid* (多種の許容可能なmARアッセイを概説している)を参照されたい。

【0041】

例えば、1つのmAR薬剤の検出形式では、アクチン再構築、細胞内カルシウム放出、又はPSA放出の1つ又はそれ以上は、約数分〜約3時間でmARを結合する薬剤を同定するために測定できる。mARとの結合は、カルシウム動員、分泌及びアクチン再構成を含む、「迅速」効果に関連すると考えられる。mARを検出及び分析するための他の方法は、ある特定の細胞、細胞株及び組織について報告されている。例えば、Porto, C. S. et al. (1995) in *Steroid Biochem. Mol. Biol.* 53:561を参照されたい。

【0042】

「組織」とは、器官において特定の機能を果たす細胞の集合体を意味する。本明細書に用いる「組織」という用語は、特定の生理学的領域由来の細胞物質を示す。特定の組織の細胞は、いくつかの異なる細胞型を包含してもよい。この具体例は、これに限定はされないが、例えば全てが所定の組織の切片及びサンプルに含有される、神経細胞、若しくは毛細管内皮細胞及び血球を更に包含する前立腺及び周辺組織であろう。固形組織に加えて、「組織」という用語は、血液及びリンパ液のような非固形組織を含むことも意図している。

【0043】

mARを発現する細胞、細胞株及び組織を同定するための好ましい検討方法は、ここでステロイド環が高分子と連結するようなテストステロンの誘導体とこれを接触することを含む。そのような分子の設計は、アンドロゲンの分子量を大いに増加させることを意図する。そのように実施した場合、ステロイドは、古典的な細胞内アンドロゲン膜受容体(iAR)による内在化を防止される。より特定の及び適切な方法では、検出可能に標識したテストステロン-血清アルブミン複合体を、mARを同定するためのプローブとして用いる。例えば、Kampa, M. E. and Castanas (2006), *ibid*; Hatzoglou, A. et al. (2005), *ibid*; Kampa, M. et al. (2002), *ibid*; Stathopoulos, E. et al. (2003), *ibid*; (そのようなmARプローブの作成及び使用に関連する開示に対して)を参照されたい。

【0044】

Dambaki, C. et al. (2005) *BMC Cancer*, 5:148; PCT/IB03/02785号、米国特許出願公開第20050245442号及びギリシャ特許出願第20020100335号(E. Castanas (University of Crete Medical School (Heraklion, Greece)))も参照されたい。mARの検出及び特徴付けのための好ましいテストステロン血清アルブミン複合体は、Test-BSAである。

【0045】

適切な方法の1つ又は組合せを用いることにより、例えば前立腺腫瘍組織、前立腺癌性LNCaP細胞、DU-145前立腺癌細胞、及びヒト乳癌細胞株T47Dのような、多種の細胞及び組織においてmARを検出できている。Kampa, et al. (2005), *ibid*; Kampa, et al. (2002), *ibid*; Hatzoglou, A. et al. (2005), *ibid*; を参照されたい。一方、非腫瘍性及び増殖性の細胞のようなある特定の組織サンプルが低い又はほとんど検出できないレベルのmARを発現すると考えられる。Stathopoulos et al. (2003), *ibid*。LNCaP細胞がmAR及びiAR受容体分子を発現する一方で、DU-145細胞株はmARだけを発現する（即ち、iARは検出できなかった）と報告されている。

【0046】

mARを検出するためのこれらの及び関連する方法を用いて、mARの存在に関して所望の細胞、細胞株又は組織サンプルの何れかのほとんどを検査することが可能である。そこでmARが検出されるようなサンプルは、本明細書に記述する方法に従って用いることができる。具体的には、及び一態様では、LNCaP、T47D又はDU-145細胞株を、mARの供給源として用いる。mAR（ARではなく）を発現する細胞有することが有用であるような態様では、DU-145細胞株の使用が特に好ましいであろう。適切な細胞、細胞株及び組織サンプルは、ドイツ微生物及び細胞培養コレクション（the German Collection of Microorganisms and Cell Cultures）（Braunschweig, Germany）及びAmerican Type Culture Collection（ATCC）（Manassas, VA）を含む多種の供給源から入手できる。

【0047】

mAR（又はAR）の存在に関してスクリーニングすることができる細胞の具体例は、全ての型の腫瘍細胞（特にメラノーマ、骨髄性白血病、肺、乳、卵巣、結腸、腎臓、前立腺、膵臓及び睪丸の癌）、心筋細胞、内皮細胞、上皮細胞、リンパ球（T-細胞及びB細胞）、肥満細胞、好酸球、血管内膜細胞、肝細胞、単核白血球を含む白血球、造血、神経、皮膚、肺、腎臓、肝臓及び筋細胞の幹細胞のような幹細胞（分化及び脱分化の因子に関するスクリーニングに使用するため）、破骨細胞、軟骨細胞及び他の結合組織細胞、ケラチン生成細胞、メラニン細胞、肝細胞、腎細胞、及び含脂肪細胞のような適切な真核細胞型を含む。他の適切な細胞は、ジャーカットT細胞、NIH3T3細胞、CHO、COS等を含む。ATCC細胞株のカタログ一覧を参照されたい。

【0048】

検討したように、本発明の目的は、mARを活性化できる受容体リガンドを検出及び随意的に同定することができる方法を提供することである。好ましい実施は、mAR及び検出可能に標識したアンドロゲン化合物（例えば、³H-DHT又はARを結合する他の適切なテストステロン誘導体）を結合して第1の錯体を形成することを可能にする条件下で、mARを当該化合物と接触させることを含む。続いて、薬剤及びmARの間を結合して第2の錯体を形成することを可能にする条件下で、第1の錯体を薬剤と接触させる。好ましくは、第1の錯体からの検出可能に標識したアンドロゲン化合物の放出のいずれかを検出して薬剤の存在の指標とする。

【0049】

「mAR及び薬剤を結合することを可能にする条件」（単数形を含む）という用語は、テストステロン、DHT、又はテストステロン3-（O-カルボキシメチル）オキシム：BSAのようなテストステロン誘導体のmARとの結合に通常有利に働くような条件を意味する。そのような条件は、その下で例えばテストステロン3-（O-カルボキシメチル）オキシム：BSAがmARを結合するような、温度、塩濃度、pH及びタンパク質濃度を包含するであろう。的確な結合の条件は、例えばアッセイが生存細胞を用いるかそれとも細胞の膜分画のみを用いるかのような、アッセイの特性に依存して変化するであろう。しかし、mARは細胞表面タンパク質であるので、有利な条件は通常、生理的食塩水（約90mM）及びpH（約7.0～8.0）を含む。結合するための温度は、15℃～37℃に変化させてもよいが、好ましくは、室温～約30℃であろう。検出する薬剤の濃度も変化するであろうが、好ましくは、約0.01nM～100マイクロモルであろう。

【0050】

本明細書で用いる「膜分画」という用語は、mAR又はARを包含する細胞内脂質膜の調製物を示す。この用語を本明細書で用いる場合、「膜分画」は、細胞ホモジネートと異なる、即ち少なくとも非膜関連の細胞構成要素の少なくとも一部（即ち、少なくとも10%、及び好ましくはそれ以上）が除去されている。「膜関連の」という用語は、脂質膜に組み込まれているか或いは脂質膜に組み込まれている成分と物理的に関連しているかのどちらかである細胞構成要素を示す。

【0051】

リガンドをmAR受容体と結合するためのより特定の条件が報告されている。Hatzoglou et al. (2005) J. Clin. Endocrinol Metab. 90:893; 及び Kampa, M. et al. (2002), supra; を参照されたい、ここではDHT、テストステロン 及びテストステロン3-(
10
O-カルボキシメチル) オキシム：BSA複合体をmARに結合するための特定の条件がそれぞれの引例に記述されている。

よって「AR及び薬剤を結合することを可能にする条件」（同類の用語を含む）という用語は、一般にmAR及びテストステロン、DHT又はテストステロン3-(O-カルボキシメチル) オキシム：BSAの間を結合することを可能にする条件を意味する。

【0052】

「検出可能に標識したアンドロゲン」という用語は、少なくとも1つの以下のものを含むアンドロゲンを意味する：放射性同位体、蛍光色素分子、蛍光消光剤、酵素、親和性標識、又は化学発光性、リン光発光性、又は色素体部分。検出可能な標識は、アンドロゲンの
20
ステロイド環（例えば、1、3、7、11及び15の炭素位の1つ又はそれ以上）に存在していてもよく、或いは別の基に、例えばリンカー、又はアンドロゲン若しくはリンカーと結合するアミノ酸配列に存在していてもよい。そのようなリンカーの具体例は、カルボキシジイミドの使用を介してステロイド環に付加しているカルボキシメチルエーテル部分である。より特定のリンカーはオキシム基を含む。一例として、検出可能に標識したアンドロゲンは、テストステロンオキシム及びテストステロン血清アルブミン複合体を含み、ここでは1つ又はそれ以上の検出可能な標識が適切なオキシムリンカーに又はリンカーと結合したアミノ酸配列に付着している。例えば、これらの特定のアンドロゲンの作成及び使用に関連する更なる情報に関して、PCT/IB03/02785号、米国特許出願公開第20050245442号及びギリシャ特許出願第20020100335号を参
30
照されたい。

【0053】

i. アッセイの検出形式

本発明による使用のための広く多様な検出可能な標識が報告されている。一般に、W. T. Mason in *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity: A Practical Guide to Technology For Quantitative Real-Time Analysis*, 2nd Ed. (Academic Press, 1999)を参照されたい。アミノ酸配列を標識するための例示的標識は、フルオロセイン、ローダミンレッド、FITC及びオレゴングリーンを含む。他の適切な蛍光、発光及び発色のプローブは *In Vitro Gen* (1600 Faraday Avenue, Carlsbad, CA 92008 (USA)) から入手できる。
40

【0054】

付加的な蛍光標識の使用は本発明の範囲内である。

例えば、フルオロセイン、ローダミン、テトラメチルローダミン、エオシン、エリスロシン、クマリン、メチルークマリン、ピレン、マラカイトグリーン、スチルベン、ルシファーイエロー、カスケードブルー (Cascade Blue; 登録商標)、テキサスレッド、IAEDANS、EDANS、BODIPY FL、LCレッド 640、Cy5、CY5.5、及びLCレッド 705。適切な光学色素は、Richard P. Hauglandによる1996 *Molecular Probe Handbook*に記述されていて、明確に本明細書に参照して組み込まれる。適切な蛍光標識は、これらに限定はされないが、緑色蛍光タンパク質 (GFP, Charfie, et al., Science 263(5148):802-805 (Feb. 11, 1994) 及びEGFP, Clontech--Genbank Acces
50

sion Number U55762)、青色蛍光タンパク質 (B F P、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. and Tsin, R. Y. Curr. Biol. 6:178-182 (1996))、増強黄色蛍光タンパク質 (E Y F P、1. Clontech Laboratories, Inc., 1020 East Meadow Circle, Palo Alto Calif. 94303)、ルシフェラーゼ (Ichiki, et al., J. Immunol. 150(12):5408-5417 (1993))、 β -ガラクトシダーゼ (Nolan, et al., Proc Natl Acad Sci USA 85(8):2603-2607 (April 1988)) 及び Renilla (国際公開第 9 2 / 1 5 6 7 3 号公報; 同第 9 5 / 0 7 4 6 3 号; 同第 9 8 / 1 4 6 0 5 号; 同第 9 8 / 2 6 2 7 7 号; 同第 9 9 / 4 9 0 1 9 号; 米国特許第 5, 2 9 2, 6 5 8 号; 同第 5, 4 1 8, 1 5 5 号; 同第 5, 6 8 3, 8 8 8 号; 同第 5, 7 4 1, 6 6 8 号; 同第 5, 7 7 7, 0 7 9 号; 同第 5, 8 0 4, 3 8 7 号; 同第 5, 8 7 4, 3 0 4 号; 同第 5, 8 7 6, 9 9 5 号; 及び同第 5, 9 2 5, 5 5 8 号) を含む。

【0055】

よって本発明の一態様では、テストステロンのようなアンドロゲンは、G F P タンパク質のような蛍光体又は検出可能なその画分と連結している。この実施例では、G F P はウミシイタケ (renilla)、プチロサルカス (ptilosarcus) 又はオワンクラゲ (aequorea) 種由来の G F P を入手した。

さらに本発明のいくつかの態様に関して適切な標識は、Alexa-Fluor 色素 (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)、カスケードブルー、カスケードイエロー 及び R-フィコエリシン (PE) (分子プローブ) (Eugene, Oreg.)、F I T C、ローダミン及びテキサスレッド (Pierce, Rockford, Illinois)、C y 5、C y 5. 5、C y 7 (Amersham Life Science, Pittsburgh, Pa.) を含む。C y 5 P E、C y 5. 5 P E、C y 7 P E、C y 5. 5 A P C、C y 7 A P C に関するタンデム複合体のプロトコルは、drmr.com/abcon にて参照できる。蛍光プローブ複合体の定量化を評価して、標識化の程度を判定してもよく、色素スペクトルの特性を含むプロトコルは metazoa.com/UPL3419 にて参照できる。

【0056】

本発明の一態様では、アンドロゲンは第 2 の検出可能な標識で、直接的又は間接的 (例えばリンカーを介して) の何れかで、検出可能に標識される。第 2 の標識は、間接的に検出されるものであり; 例えば第 2 の標識は、検出のために第 1 の標識と結合又は反応することができ、付加的生成物に作用して第 1 の標識 (例えば酵素) 等を産生できる。第二の標識は、これらに限定はされないが、結合パートナー対の一方、化学的に修飾可能な部分、ヌクレアーゼ阻害剤、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、ルシフェラーゼ等のような酵素を含む。

【0057】

例として、第二の標識は、結合パートナー対である。例えば標識は、その結合パートナーを結合するであろうハプテン又は抗原でもよい。例えば、適切な結合パートナー対は、これらに限定はされないが、抗原 (タンパク質 (ペプチドを含む) 及び小分子のような) 及び抗体 (その断片を含む (F A B s 等)); ビオチン/ストレプトアビジンを含む、タンパク質及び小分子 (、ビオチン/ストレプトアビジンを含む); 酵素及び基質又は阻害剤; 他のタンパク質-タンパク質相互作用対; 受容体-リガンド; 並びに炭水化物及びそれらの結合パートナーを含む。好ましい結合パートナー対は、これらに限定はされないが、ビオチン (又はイミノ-ビオチン) 及びストレプトアビジン、並びにジゴキシゲニンを含む。

【0058】

本発明の別の態様では、第二の標識は化学的に修飾可能な部分である。この態様では、反応性官能基を包含する標識は標識される分子、通常はアンドロゲン、に組み込まれている。官能基は直接的に又は血清アルブミン (その断片を含む) のような適切なリンカー若しくはタンパク質基を介して間接的に、ステロイド環に付加できる。官能基は、続いて第

10

20

30

40

50

一の標識で標識されてもよい（例えば、アッセイの前または後のどちらか）。適切な官能基は、これらに限定はされないが、アミノ基、カルボキシ基、マレイミド基、オキシ基及びチオール基を含み、アミノ基及びチオール基が特に好ましい。例えば、アミノ基を含有する第一の標識は、例えば当該技術分野で公知のリンカー；例えば公知である（1994 Pierce Chemical Company catalog, technical section on cross-linkers, pages 155-200を参照されたい、本明細書に参照して組み込まれている。）ホモ-又はヘテロー二（元機能）官能性リンカー；を用いてアミノ基を包含する第二の標識に付加できる。

【0059】

本発明の方法及び組成物は、標識酵素を使用してもよい。標識酵素とは、検出可能な生成物を生成する標識酵素基質の存在下で反応する酵素を示す。本発明で使用するのに適切な標識酵素は、これらに限定はされないが、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ及びブドウ糖酸化酵素を含む。そのような基質の使用方法は、当該技術分野で公知である。標識酵素の存在は一般に、識別可能な生成物を生成する標識酵素基質と反応する酵素の触媒作用を通して示される。そのような生成物は、西洋わさびペルオキシダーゼのテトラメチルベンジジンとの反応のように、不透明であってもよく、そして多様な色を有してもよい。ルミノール（Pierce Chemical Co.より入手可能）のような他の標識酵素基質は、蛍光反応生成物を生成するように開発されている。標識酵素基質で標識酵素を同定する方法は、当該技術分野で公知であり、多くの市販キットが入手可能である。多種の標識酵素の使用の具体例及び方法は、Savage et al., *Previews* 247:6-9 (1998), Young, J. *Virol. Methods* 24:227-236 (1989)に記述されていて、各々はその全体を参照して本明細書に組み込まれる。

【0060】

標識酵素及び他の検出可能な標識の検出のため多種の適切な方法は記述されている。Hall and Lane in, *Antibodies: A Laboratory Manual* (1988)及びそこで引用されている文献（サンドイッチアッセイ等）を参照されたい。例えば及び一態様では、検出可能な標識はビオチン又はDNPであり、ここでは標準的な抗体検出方法を用いてビオチン部分を検出する。或いは、検出可能な標識は、トリチウム、重水素又は炭素-14のような、1つ又はそれ以上の放射性同位体である。例示的な放射活性物質で標識したアンドロゲン化合物は、(^3H -DHT)又はトリチウム化テストステロン(^3H -T)である。例えば、特異的にトリチウム化したテストステロン化合物は、テストステロン-[1, 2, 6, 7- ^3H] (New England Nuclear, Beverly MA (USA)より入手可能)である。本発明によるアンドロゲンのトリチウム化の方法は、公知であり、例えば通常の同位体交換反応を含む。他の適切な放射性同位体は、 ^{14}C 、 ^{125}I 、及び ^{131}I を含む。

【0061】

検出可能な標識を、間接的に、例えば抗体により検出してもよい。即ち、抗体はアンドロゲン化合物を直接的に、又は化合物に結合するタグを通して間接的に検出可能であってもよい。タグは、一般的に抗体の結合パートナーである。そのような抗体を用いる態様における使用に適切な結合パートナーは、これらに限定はされないが、ジゴキシゲニン／抗ジゴキシゲニン、ジニトロフェニル(DNP)/抗DNP、ダンシル-X／抗ダンシル、フルオレセイン／抗フルオロセイン、ルシフェールイエロー／抗ルシフェールイエロー、及びローダミン／抗ローダミン、ビオチン／アビジン（又はビオチン／ストレプトアビジン）及びカルモジュリン結合タンパク質(CBP)／カルモジュリンを含む。他の適切な結合対は、FLAG-ペプチド [Hopp et al., *Bio Technology*, 6:1204-1210 (1988)]；KT3エピトープペプチド [Martin et al., *Science*, 255:192-194 (1992)]；チューブリンエピトープペプチド [Skinner et al., *J. Biol. Chem.*, 266:15163-15166 (1991)]；及びT7遺伝子10タンパク質ペプチドタグ [Lutz-Freyermuth et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6393-6397 (1990)]のようなポリペプチド並びにそれら各々に対する抗体を含む。

【0062】

本発明のアンドロゲン化合物を検出可能に標識するために用いることのできる他の適切

な「タグ」群は、ポリーヒスチジン (poly-his) 又はポリーヒスチジン-グリシン (poly-his-gly) タグ及びニッケル基質；グルタチオン-S トランスフェラーゼタグ及びその抗体基質 (Pierce Chemical より入手可能) ； f l u H A タグポリペプチド及びその抗体 1 2 C A 5 基質 [Field et al., Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1985)] ； c - m y c タグ及びそれに対する 8 F 9、3 C 7、6 E 1 0、G 4、B 7 及び 9 E 1 0 抗体基質 [Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)] ； 及び単純ヘルペスウイルスグリコプロテイン D (g D) タグ及びその抗体基質 [Parborsky et al., Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)] を含む。タグもまたポリペプチドである場合の組換え法によるタグ-ポリペプチドの生成を、以下に記述する。タグ-標識したタンパク質の生成は、当該技術分野で公知であり、そのような生成に関するキットは市販されている (例えば、Kodak 社及び Sigma 社より)。タグ標識したタンパク質の具体例は、これに限定はされないが、Flag-ポリペプチド及び His-ポリペプチドである。タグ標識したタンパク質の生成及び使用の方法は、例えば、Winston et al., Genes and Devel. 13:270-283 (1999) (その全体を参照して本明細書に取り込む)、或いは上記キットにて提供される製品ハンドブックに見出すことができる。

10

【0063】

本発明のある特定の検出可能アンドロゲン化合物をビオチン化してもよい。標的の分子及び基質のビオチン化は公知であり、例えば、タンパク質、核酸、炭水化物、カルボン酸のビオチン化のための、アミン反応性及びチオール反応性の薬剤；chapter 4, Molecular Probes Catalog, Haugland, 6th Ed. 1996 (参照して本明細書に取り込む) を参照のこと；を含む、多数のビオチン化薬剤が知られる。ビオチン化した基質は、アビジン又はストレプトアビジンを介してビオチン化した成分に付加できる。同様に、多数のハプテン化試薬も知られている (I d)。

20

【0064】

タンパク質を放射性同位体で標識するための方法は当該技術分野で公知である。例えば、そのような方法は Ohta et al., Molec. Cell 3:535-541(1999)に見出され、その全体を参照して本明細書に取り込む。

組み換え法によるタグを有するタンパク質の生成は公知であり、そのようなタンパク質を生成するためのキットは市販されている。例えば、そのようなキット及びその使用は、Joanne Crowe et al. による Qiagen 社の QIAexpress Handbook に記述されていて、これは明確に参照して本明細書に取り込まれる。よって一態様では、血清アルブミンは 1 つ又はそれ以上のタグで組換え的に発現する。そのような修飾したアルブミンは、直接的に又は適切なリンカーを介して、標準的な方法論を用いてアンドロゲンと連結できる。

30

【0065】

「検出可能に標識したアンドロゲン化合物の放出」という用語は、適切な対照 (例えば薬剤の非存在下での放出) と比較して、特定のアッセイにおける薬剤の存在によるアンドロゲン化合物の放出の検出可能な増加を示す。好ましくは、放出が、薬剤を添加しない対照と比較して少なくとも約 20% 多く、好ましくは少なくとも約 50% 多く、より好ましくは少なくとも約 80%、約 90%、又は約 95% 若しくはそれ以上である。この態様では、薬剤は、単離でき、同定でき、そして本発明による更なる試験を行うことができる、潜在的な m A R アゴニストである。

40

【0066】

以下の A ~ E の欄は、薬剤又は複数の薬剤 (例えば薬剤のライブラリー) の m A R 機能を調節する (増加又は減少させる) 能力を検出及び定量化するための好ましい方法を記述する。

「m A R 機能」とは、本明細書で定義したようなシグナリング分子の調節、P S A 分泌、カルシウム流出の調節、及び細胞骨格再構成の 1 つ又はそれ以上を調節する (増加又は減少) 受容体の能力である。好ましくは、この機能は、適切な化合物薬剤 (例えば D H T) と接触後 3 時間以内に、好ましくは約数分 ~ 約 1 時間の間に、より好ましくは約数分 ~ 30 分の間に観測する。

50

【0067】

A. 膜アンドロゲン受容体 (mAR) 結合

検出可能に標識したアンドロゲンの放出は、例えば薬剤のアゴニスト活性を確認するために及び／又はその活性の強度を測定するために、定量化してもよい。よって一態様では、以下の特定のmAR結合アッセイは薬剤の K_d を判定するために用いてもよい。

初めに、適切なmAR発現細胞（例えばDU-145細胞）は、1～2日間無血清培地に保持される。以下のアッセイの一方又は両方を前記細胞で実施する：（1）トリチウム化DHTに対する K_d を判定するmAR飽和分析又は（2）mARに対する薬剤のDHTとの競合能力を評価する競合結合アッセイ。そのようなアッセイは以下の検討に例示されている。

10

【0068】

DU-145細胞は、無血清培地に保持した後、100倍超の非標識DHTの存在下又は非存在下（全(total)結合）で、検出可能に標識したDHT（例えば ^3H -DHT）の飽和量、一般に0.05 nM～約20 nMの範囲の量を含む培地と接触させてもよい。競合的アッセイに関して、約0.1 nM～約1 nMの ^3H -DHT及び1つ又はそれ以上の被検薬剤（ 10^{-10} M ～ 10^{-5} M の濃度範囲）を含む細胞培地を細胞に添加する。各サンプルに対して3つの複製物を用いるのが好ましい。37℃にて約5時間、好ましくは3～4時間培養した後、 ^3H -DHTのそれぞれの濃度での全結合培地のアリコートを取り出し、結合していない ^3H -DHTの量を測定する。残りの培地を取り出し、細胞を洗浄して未結合の薬剤を取り除き、そして細胞をTriton-X-100に溶解する。溶解物は、標準的シンチレーションカウンターを用いて、結合した ^3H -DHTの量に関してアッセイする。任意の非特異的結合を従来法で測定できる。

20

所望であれば、アッセイは、LNCaPのような他の適切な細胞、又はmARを発現する他の適切な細胞で実施してもよい。

【0069】

i. mAR飽和分析

飽和分析に関して、全結合と非特異的結合との間の差異は正規化される。特異的なmAR受容体結合は、標準的Scatchard分析を用いて評価して ^3H -DHTに対する K_d を判定することができる。Scatchard分析は、飽和結合実験からのデータを線形化して結合定数（ K_d ）を判定するための方法であることは理解されるであろう。特異的結合（X軸）に対する（vs.）特異的結合／非結合の放射性リガンド濃度（Y軸）の「第二の」プロットを作成する。例えば、Robard, D. in Ligand Assay, J. Langon and J.J. Clapp (eds.) (Masson Publishing U.S.A.), pp.45-49 (1981)を参照されたい。

30

目的とする特定の薬剤は、約1マイクロモルより小さい、好ましくは約0.01 nM～約0.1マイクロモル、より好ましくは約0.1 nM～50 nMの K_d を示すであろう。

【0070】

ii. mAR競合分析

受容体競合の検討に関して、データは、所定の薬剤に対する容量-応答曲線の範囲を超えて残る ^3H -DHTの量（薬剤の非存在下での対照に対する%）としてプロットできる。50%の量の ^3H -DHTが競合する受容体リガンドの非存在下で結合することを阻止する何れの薬剤の濃度も、標準的方法を用いて定量化できる（ IC_{50} と称す）。例えば、Robard, D. (1981), supra; 及びPCT/US2004/027483を参照されたい。何れかの非特異的結合の補正後、 IC_{50} 値を判定してもよい。 IC_{50} 値は、本明細書では結合を約50%減少させるのに必要とする競合する薬剤の濃度として定義する。

40

目的とする特定の薬剤は、約1マイクロモルより小さい、好ましくは約0.01 nM～約0.1マイクロモル、より好ましくは約0.1 nM～約20 nMの IC_{50} を示すであろう。

【0071】

B. 膜アンドロゲン受容体 (mAR) シグナリング分子の検出

検討したように、本発明の目的は、mAR受容体活性を調節する薬剤を検出することで

50

ある。そのような活性は、受容体結合のレベルで又はそのような結合の後で（m A Rの「下流」活性として示す）検出してもよい。少なくとも1つの及び好ましくは全ての、焦点接着キナーゼ（F A K）、ホスファチジルイノシトール-3（P I-3）キナーゼ、細胞分裂周期42（c d c 42）及びr a s関連C3ボツリヌス毒素基質1（R a c 1）分子を含む、いくつかの下流m A Rシグナリング分子が報告されている。この特定の経路の活性は、迅速なアクチンの細胞骨格再構成（例えば、細胞の増殖、分泌及び移動性を制御すること）をもたらす。Papakonstanti, E. et al. (2003) Mol. Endocrinology 17:870を参照されたい。

【0072】

最近になって、アクチンの細胞骨格再構成が、m A R活性化の1つの重要な成果として明示されている。Papadopoulos, N.D. et al. (2004), 56th Meeting of HSBMB (Hellenic Society of Biochemistry and Molecular Biology) 25-27 November 2004, Larissa Greece を参照されたい。10

非ゲノムのアンドロゲン効果は、膜レベルで開始する。これは、例えば特異的な分泌機序及びシグナリング機構（i A Rの下流のそれらとは異なる）を提示する。アンドロゲン膜結合部位（即ちm A R）は、L N C a Pヒト前立腺細胞に存在する。

【0073】

本開示から理解されるであろうように、細胞をテストステロン-B S Aと接触させることにより、D U-145のm A Rの活性化が可能である。この接触は、有意なアクチンの再構築、これに続く細胞移動、接着及び侵襲の低減を誘発した。さらに示されるように、これらの効果は、R a sホモログ遺伝子ファミリーメンバーA B（R h o A/B）、R h o関連コイルドコイルキナーゼ（R O C K）及びL I M-モチーフ含有キナーゼ（L I M K 2）の少なくとも1つ及び好ましくは全てを含む、下流のシグナリング経路の活性化を通してもたらされた。この経路の活性化はシグナリング及びアクチンの再構成を誘発した。この経路は、L N C a P細胞では活性化しない。テストステロン-B S Aは、L N C a P及びD U 145細胞の両方でアポトーシス、アクチンの細胞骨格再構成により調節された1効果をもたらした。加えて、L N C a P接種ヌードマウスのインビボ実験では、テストステロン-B S A（8 m g/k g/体重）での1ヶ月の処理が、対照動物と比較して60%の腫瘍サイズの減少をもたらすことを示した。この効果は抗-アンドロゲンフルタミドでは観察されなかった。対照動物での明確な毒性作用は見られなかった。この実施例は、m A Rの活性化が前立腺癌細胞のアポトーシス退行を誘発できることを示す。20 30

【0074】

従って、及び本発明の一態様では、前記薬剤検出方法の1つ又は組み合わせは、m A Rの下流のシグナリング分子の調節を検出する段階をさらに含んでもよい。「下流」とは、特定の分子が、m A R活性化に応答性のある生物化学的経路の中にあることを意味する。好ましくは、このような方法は、適切な対照（例えば、薬剤を付加しないような場合）と比較した、シグナリング分子のレベルの変化を検出する段階をさらに含む。シグナリング分子の調節を検出する段階は、例えば、グアニンヌクレオチド結合又は交換、キナーゼ活性、グアノシントリホスファターゼ活性、ホスファチジルイノシトール分解、ジアシルグリセロール、イノシトール三リン酸、アクチン再構成、レポーター遺伝子発現、及び細胞内カルシウム濃度の少なくとも1つの活性（即ち、増加又は減少）を測定することを含んでもよい。好ましくは、キナーゼは焦点接着キナーゼ（F A K）又はホスファチジルイノシトール-3（P I-3）キナーゼの一方である。そのような方法は、F A Kのホスファチジルイノシトール-3（P I-3）キナーゼとの関連を検出する段階をさらに含んでもよい。特定のグアノシントリホスファターゼはC d c 42/R a c 1である。40

ある特定のこれら及び他のシグナリング分子の検出のための免疫学的方法が報告されている。Papakonstanti, E. et al. (2003), supra; 及びPapadopoulos, N.D. et al. (2004), supra;を参照されたい。一般に、方法は、定着した免疫沈降、キナーゼ、及び免疫ブロッティング型検出形式を含む。

【0075】

C. m A Rによる細胞内カルシウムの調節

m A Rに結合するテストステロンの共通効果は迅速に、数秒以内に、細胞内カルシウムを増加させることであると報告されている。Kampa, et al. (2004), supra;及び Kampa and Castanas (2006), supra を参照されたい。この増加は、Gタンパク質受容体アンタゴニスト、Gタンパク質共役受容体を示す百日咳毒素に感受性があると報告されている。これはA Rを欠く細胞でも観察され、酢酸シプロテロン又はフルタミドのような抗アンドロゲンにより効果的でない。これは、とりわけ非古典的受容体媒介作用を示す。Gong et al. (1995) Endocrinology 136:2172も参照されたい。

【0076】

従って、及び一態様では、m A Rの調節を検出するための前記方法の1つ又は組み合わせは、細胞内カルシウムの増加を検出及び随意的に定量化するための従来のテストと組み合わせてもよい。適切なテストの具体例は、例えば、Kampa et al. (2004), supraに記述されている。さらに、適切なテストは一般に、カルシウムプローブ、カルシウムプローブに対する抗体、カルシウムイオノフォア及び細胞内カルシウムの変化を検出するためのカルシウムキレート剤の少なくとも1つを用いるであろう。Cell Signaling & Neuroscience (2002-2003)なる表題のthe Sigma-Aldrich Catalogue Book、特にカルシウム濃度を検出及び測定するためのそのような物質の使用に係る開示に関する、pages 482-498を参照されたい。例示的な形式は、A r s e n a z o III、F l u o 3、F l u o - 3 a m、F u r a 2 及び細胞内カルシウムの増加（又は減少）の検出可能な指標としての使用を含む。

【0077】

よって一態様では、適切な細胞、細胞株又は組織サンプル（例えば、D U - 1 4 5 又は L N C a P 細胞）の細胞内カルシウム濃度は、m A Rの1つ又はそれ以上の薬剤との接触に続いて検出される。薬剤なしでの培養のような適切な対照と比較した、何れの細胞内カルシウム濃度の増加も、m A Rを調節する薬剤を指標するものとできる。好ましい薬剤は、1つ又は組み合わせの前記の標準的アッセイにより測定し、薬剤のない対照と比較して、少なくとも約20%、好ましくは少なくとも約50%、及びより好ましくは少なくとも約90%、95%、100%～約300%、500%、～約1000%、細胞内カルシウム濃度を増加させるであろう。

【0078】

D. 前立腺特異的抗原（P S A）の調節

m A Rの刺激がP S Aの分泌に付随して起こることが報告されている。Kampa, M et al. (2002), supra を参照されたい。特に、分泌はサイトカラシンBでの前処理の後に阻害された。よって、1つ又は組み合わせのm A Rを調節する薬剤の検出のための前記の方法は、アッセイに用いる細胞、細胞株又は組織が分泌するP S Aの濃度の変化を検出するためのテストをさらに含んでもよい。一態様では、そのようなテストは、適切な対照（例えば薬剤の添加なし）と比較して、細胞、細胞株、組織サンプルが発現するP S Aの何れかを検出する段階をさらに含む。適切な細胞、細胞株及び組織サンプルは、公知であり、m A R, i A R 又は両方を発現すると考えられているものでもよい。

【0079】

P S Aを検出する特定の方法は、従来の免疫学的手段に依存する。一態様では、分泌したP S Aを、特異的にP S Aに結合する抗P S Aモノクローナル抗体と接触させることにより、P S Aを測定する。そのようなアッセイは、直接検出又はサンドイッチアッセイ形式を用いることによるような、許容できる形式の何れかで実施できる。P S Aに対して反応性があると報告される多種の適切な抗体はA T C Cより入手できる。

【0080】

上記のP S Aアッセイによる目的とする特定の薬剤は、P S A分泌の濃度を、薬剤なしの適切な対照と比較して、少なくとも約20%、好ましくは少なくとも約50%、より好ましくは少なくとも約90%、95%、100%～約200%又は300%増加させるであろう。好ましくは、P S Aは、P S Aを結合すると知られるモノー又はポリクローナル

抗体のような適切な免疫学的試薬の1つ又は組み合わせを用いて検出される。

【0081】

E. 膜アンドロゲン受容体 (mAR) によるアポトーシスの調節

mARの活性化がインビトロ及びインビボの両方で前立腺癌細胞のアポトーシス退行をもたらすことが報告されている。Hatzoglou, A. et al. (2005); supra を参照されたい。よって、mARの調節を検出する前記方法の1つ又は組み合わせは、アッセイに用いる細胞、細胞株又は組織のアポトーシスのレベルの変化を検出する方法をさらに含んでもよい。従って、及び一態様では、薬剤を検出方法は、mARを発現する細胞、細胞株又は組織サンプルの細胞死 (アポトーシス) を検出する段階をさらに含む。好ましくは、本発明の薬剤は、アッセイに用いる細胞、細胞株又は組織のアポトーシスのレベルを、適切な対照 (例えば、薬剤の非存在下でアッセイを実施する) と比較して、増加させる。

10

【0082】

免疫学的な、色素媒介の及びサイトメトリのアッセイを含む、アポトーシスを検出及び定量化するための多種の適切なアッセイが報告されている。Hatzoglou, A. et al. (2005); supraを参照されたい。他の適切なアッセイは、例えば Cell Signaling & Neuroscience (2002-2003)なる表題の the Sigma-Aldrich Catalogue Book、特に pages 17-98に開示されている。よって本発明の一態様では、アネキシン、検出可能な小分子、及びアポトーシス又はプロアポトーシスタンパク質の少なくとも1つをアッセイすることによりアポトーシスを検出する。実施例は、とりわけ BCL-2、BCL-X、Caspase 9、Apaf-1を含む。

20

【0083】

好ましい本発明の実施は、mARを発現することが知られているか又は考えられている所望の細胞、細胞株又は組織サンプルと接触させる段階の1つ又はそれ以上を実施することを含む。よって一態様では、本発明は、DU-145細胞を例えばmARの供給源として用いるような、適切なmAR受容体リガンドを検出する方法を包含する。或いは、LNCaP又は前立腺組織をmARの供給源として用いる。mARは、全細胞若しくは組織として、又は細胞垂分画 (通常、膜分画) として、選択するアッセイ形式に依存して、提供されてもよい。

【0084】

上記のアポトーシスのアッセイによる目的とする特定の薬剤は、薬剤を用いない場合のような適切な対照と比較して、細胞死のレベルを、少なくとも約20%、好ましくは少なくとも約50%、より好ましくは少なくとも約90%、95%、100%~約200%又は300%増加させるであろう。

30

以下のF~Gの欄は、薬剤又は複数の薬剤 (例えば薬剤のライブラリー) のARを調節する (増加させる又は減少させる) 能力を検出及び定量化するための方法を記述する。

【0085】

F. AR調節を検出するための対照アッセイ (インビトロ)

検討したように、多くの本発明の態様では、薬剤のAR機能を増大する又は低下させる能力を検出及び随意に定量化するための、対照アッセイの1つ又は組合せを実施することは有用であろう。一態様では、適切なARを発現する細胞、細胞株又は組織サンプルを、薬剤と接触させて、活性があればそれを同定する。ARは、男性生殖組織 (前立腺及び付属組織を含む)、女性生殖組織、ある特定のCNS組織、更にはある特定の骨及び筋肉細胞のような、多数の生体組織で発現されると報告されている。ARは、一般に内因性アンドロゲンリガンドテストステロン及び5- α -ジヒドロテストステロンに対して感受性があると考えられている。ARが3つの機能的ドメイン: リガンド結合ドメイン、DNA-結合ドメイン、及びアミノ末端ドメイン: から成っているとの認識がある。例えば, Caplan, et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:5251; Fliss et al. (1999) J. Biol. Chem. 274:34045; 及びFang et al. (1996) J. Biol. Chem. 271:28697; 並びにそこで引用されている文献を参照されたい。

40

【0086】

50

A R、例えばA R受容体リガンド、と結び付く及び天然のA Rリガンドの影響を最小化する薬剤を、本明細書では「A Rアゴニスト」として示し、一方、天然リガンドの影響を阻害する化合物を「A Rアンタゴニスト」と称する。本発明の好ましい薬剤は、本明細書に開示する対照アッセイの何れか1つ又は組み合わせにより判定されるように、A Rアゴニスト又はアタゴニストとしての活性をほとんど若しくは全く有していない。

【0087】

A R、例えばR B A、T R A M P - C 2、D D T 1 M F - 2、R W P E - 2等を発現すると報告されている、多種の細胞株は、A T C C (Manassas, VA(USA))より入手できる。M D A (MDA-MB-453)細胞は、内因性A Rを発現するとも報告されている。P C T / U S 2 0 0 5 / 0 2 9 5 9 2及びそこで開示されている文献を参照されたい。M D A細胞は、対照アッセイが、M D A A Rに対する薬剤の親和性における放射性リガンド置換アッセイであるような態様において特に好ましい。P C T / U S 2 0 0 5 / 0 2 9 5 9 2の54～56ページを参照されたい。A Rを発現する別の細胞株はL N C a Pである。

【0088】

組換えヒトアンドロゲン受容体 (h A R) をある特定の対照アッセイに用いてもよい。一態様では、競合的結合分析はh A Rを発現する細胞で実施される。そのような細胞は、公知であり、例えば、バキュロウイルス / S f 9 産生 h A R 細胞及びその抽出物を含む。或いは、A Rを発現すると知られる他の細胞、細胞株及び組織、例えばM D A細胞、を用いてもよい。Sambrook et al. in Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed. 1989); 及び標準的組換え技術に関する検討についての Ausubel et al. (1989), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York を参照されたい。

【0089】

A R (又はh A R) を発現する適切な細胞、細胞株又は組織を入手して、異なる濃度の薬剤及び一定の濃度の³ H - D H T トレーサーの存在下又は非存在下で結合を実施する。アッセイに係る一般的開示に関する Chang, et al. (1984) J. Steroid Biochem. 20:11を参照されたい。端的には、段階的に減少した濃度の薬剤は、A R又はh A Rの抽出物の存在下並びに非存在下で、例えばハイドロキシアパタイト及び約1 n Mの³ H - D H T とともに、4℃にて約1時間培養する。続いて、結合反応物を洗浄して、過剰の標識を除去する。A R又はh A Rに結合する³ H - D H T のレベルを化合物 (競合的結合) の存在下で判定して、薬剤なしの結合 (最大の結合) と比較する。Chang et. al. (1992) PNAS 89:5546を参照されたい。h A Rに対する薬剤結合親和性は、最大結合の半分を阻害する薬剤の濃度 (I C₅₀) として表される。

【0090】

ヒトアンドロゲン受容体をコードするc D N Aのような多種の核酸が報告されている。Chang, CS. (1988) Science 240:324を参照されたい。他の適切な配列に関して国立医学図書館 (G E N B A N K)、特にaccession no. N M_0 0 1 0 1 1 6 4 5にて閲覧できるもの、も参照されたい。

本発明による特定の薬剤は、これらのアッセイにおいて活性をほとんど又は全く示さない。好ましくは、そのような薬剤は、約10～約1000マイクロモルを超える又はそれ以上のI C₅₀を示す。

【0091】

i. アンドロゲン応答エレメント (A R E) 活性化の検出

いくつかの対照の態様では、通常は受容体を発現しない細胞 (例えば、C O S又はC V - 1細胞) において異種A R (例えば、h A R) を発現させるのが有用であろう。好ましくは、h A Rを発現させるように組換え核酸技術を用いて、A Rを一時的に発現させる。一手段では、異種A Rを発現させるような条件下で細胞を培養して、A Rを調節する可能性がある化合物と接触させる。A Rの調節は、検出可能なアンドロゲン応答エレメント (A R E) を含む、導入されたプラスミド構築物の活性の変化を検出できる、手段で観察される。例示的なA R Eは、アンドロゲン応答遺伝子プロモーター、アンドロゲン応答遺伝子エンハンサー等を含む。A Rを結合する薬剤は、「下流」のA R E活性を観測すること

による方法で検出できる。

【0092】

PCT/US 2004/027483 (国際公開第2005/018573号公報)に概説されている一手段では、適切な細胞(COS又はCV-1)は、Berger et al., J. Steroid Biochem. Mol. Biol. (1992) 41:733に開示されている物質及び方法に従って、トランスフェクトされる。

用いる構築物は、pShAR (ARを発現する)、MTV-LUC、pRS- β -GAL及びpGEM (フィラー(filler)DNA)を含む。受容体プラスミド、pRS hARは、SV-40の構成的制御下でヒトARを含む。Simental et al. J. Biol. Chem. (1992) 266:510を参照されたい。レポーター遺伝子構築物、MTV-LUCは、マウス乳癌ウィルス(MTV)の長い末端反復の制御下で蛍光素(ルシフェラーゼ(LUC))をコードするcDNA、アンドロゲン応答要素を含む条件付プロモーターを含む。Berger, et al., supraを参照されたい。或いは、大腸菌 β -ガラクトシダーゼの構成的発現をコードするpRS β -GALが、内部制御として含まれていてもよい。

【0093】

トランスフェクションに続いて、培地をトランスフェクトした細胞から除去して、細胞を洗浄する。続いて、本発明による薬剤を含んでいる培地を細胞に添加する。許容できる薬剤の濃度は、 10^{-12} M $\sim 10^{-5}$ Mの範囲のようなものを用いてもよい。約2 $\sim$ 3日、好ましくは約2日間、培地で細胞を培養後、細胞を洗浄して、TritonX-100又はその他の適切な洗浄剤に溶解して、標準的手順を用いてLUC及び β -GAL活性に関するアッセイを行う。ARアンタゴニスト(2-OH-フルタミド)及びARアゴニスト(DHT)に対する陽性対照の使用を含む、この特定のアッセイに関する更なる開示は、PCT/US 2004/027483の特許出願に見られる。

【0094】

本明細書で言及している「MTV-AREアッセイ」は、PCT/US 2004/027483の出願に開示されているアッセイを示す。本発明による好ましい薬剤は、1つ又はそれ以上の適切な対照と比較(例えばアッセイにおけるDHTの活性と比較)した場合、MTV-AREアッセイにおいてほとんど又は全く活性を示さないであろう。

ARE活性を検出及び随意に定量化するために用いてもよいレポーター遺伝子構築物(ベクター)の一覧(例えば、pAR-LUCはそのようなベクターの1つである)に関する、Panomic, Inc. (6519 Dumbarton Circle, Fremont CA (USA))も参照されたい。そのようなベクターの使用説明書は、上記の企業より入手できる。

【0095】

G. ARの調節を検出するための対照アッセイ(インビボ)

いくつかの本発明の適用に関して、ARをインビトロで調節する薬剤の能力を検討するのが有用であろう。有意に、単一の薬剤(若しくは薬剤のライブラリーでも)での複数の検出アッセイ(例えば、インビトロ及び/又はインビボでのアッセイの組合せ)の使用は、検出の選択性及び感受性を拡張することができる。

【0096】

そのような広範囲のテストは更なる利点を提供する。よって、例えば本発明のインビトロアッセイは、複数の分析を効果的に実施して、それにより治療的潜在能力を有する薬剤を同定することにおける効率及び確率を増進させることができる。多数の薬剤をテストする必要がある場合、これは特に有用である。例えば、潜在的mAR結合リガンド及び他の薬剤のライブラリーを、コンビナトリアルタイプの化学操作を含む標準的合成方法により作成して、次いで本発明によりテストすることができる。

【0097】

よって一態様では、1つ又は組合せの前記方法は、インビボでのiARのいかなる活性も検出する段階を更に含む。ARの調節を検出する適切な方法はすでに記述されている。例えば、PCT/IB 2005/002592号(国際公開第2006/024931号公報)、PCT/US 2004/038859号(国際公開第2005/052211号

10

20

30

40

50

公報)、PCT/2004/027483(国際公開第2005/018573号公報)、PCT/2005/013775号(国際公開第2005/105091号公報)、PCT/US2005/029592号(国際公開第2006/026196号公報)、及びPCT/IB2005/002592号(国際公開第2006/024931号公報)、並びにこれらに開示されている文献を参照されたい。

【0098】

特定の態様では、本発明の薬剤はPCT/US2005/029592に開示されているインビボ前立腺アッセイでテストされる。若年の性的に成熟したラットに睾丸摘出(ORX)を施す。薬剤の用量を、例えば約1~2回/日、約1~2週間、約0.1マイクログラム/kg~約100マイクログラム/kgの範囲で、ラットに皮下又は経口投与する。この期間後、前立腺及び精嚢の腹側部をそれぞれ秤量する。薬剤がこれらの組織のORXに誘発される欠損をどの程度阻害できるかを標準的方法により評価する。

10

【0099】

よって一態様では、前記のインビボでの方法は、適切な対照と比較して、被検哺乳類において、以下の特性：(1)前立腺の重さをほとんど又は全く増加させない、(2)体重をほとんど又は全く増加させない、(3)体脂肪をほとんど又は全く増加させない、及び(4)骨密度をほとんど又は全く増加させない：の少なくとも1つを有する薬剤を選択することを更に含む。本発明の実施例では、方法は、少なくとも1つの前記特性を有する薬剤を選択することを、薬剤の存在を更に指標することとして含んでもよい。

【0100】

本明細書で言及している「ほとんど又は全く」シグナル又は活性を検出しないとは、適切な対照における結果の1つ又は組合せを説明する場合、そのアッセイにおけるDHTの活性が約20%より低いこと、好ましくはその活性が約10%より低いこと、より好ましくはそのアッセイにおけるDHTの活性が約5%より低い、約3%より低い又は約1%より低いことを意味する。本発明の好ましい薬剤は、前記の対照アッセイの1つ又は組合せによるARを調節する能力をほとんど又は全く示さないであろう。

20

【0101】

本発明による非常に好ましい薬剤は、例えば、F~Gの欄に記述する対照アッセイの1つ又はそれ以上において検出可能な活性を示さないmAR受容体リガンドである。他方、そのような好ましい薬剤は、上記A~Eの欄に提供するアッセイの1つ又はそれ以上において実質的な活性を示す。

30

【0102】

特定の対照アッセイの最適な実施は、場合により少なくとも1つのmAR及びiARが、分画、合成又は半合形成態で提供されることを必要とするであろう。例えば、一態様では、iARは合成リポソーム組成物として存在する。そのような組成物を生成する方法は報告されている。他の受容体の態様は、iARを含むウィルス誘発の出芽膜上への提示を含む。国際公開第0102551号公報及びMirzabekov et al., 2000を参照されたい。

【0103】

本発明は適応性があり、多様なアッセイ形式に用いることができる。従ってmARを調節する能力に関して薬剤をテストする一態様では、mAR及び/又はiARを発現すると知られているか又は考えられている、細胞由来の細胞垂分画、細胞株、又は組織サンプルを用いる。よって一態様では、本明細書に記述のように対照アッセイは、iARを発現する細胞の細胞垂分画、好ましくは膜、細胞質又は核の分画を用いて実施することができる。

40

【0104】

mAR及びiARの調節を検出するためのアッセイの1つ又は組合せは、1つ又はそれ以上の以下の検出段階を用いて実施してもよい：標識置換、表面プラズモン共鳴、蛍光共鳴エネルギー移動、蛍光消光、蛍光偏光、発光、化学発光、蛍光発光、吸収、及びシンチレーション計数。特定の検出形式の選択は、例えば、選択した検出可能に標識したアンドロゲン及び必要とするアッセイの感受性の程度のような従来の変数に依存するであろう。

50

【0105】

H. 薬剤供給源

本発明は、多種多様な薬剤を検出して随意に同定するために用いることができる。好ましい薬剤は、ペプチド、ペプトイド、ポリペプチド、抗体又は抗原に結合するその断片、脂質、炭水化物、核酸、小分子、又はそれらの組合せを含む。本明細書で用いる「小分子」という用語は、3000ダルトンより小さい、好ましくは2000又は1500より小さい、より好ましくは1000より小さい、最も好ましくは600ダルトンよりも小さい分子量を有する化合物を示す。「有機小分子」は、炭素を包含する小分子である。

【0106】

それから本発明による薬剤を選択する、多種多様なコレクションを入手することができる。特定の被検薬剤は、合成又は天然の化合物の多くのライブラリーに含まれていてよい。現在、多数の方法が、サッカリド、ペプチド及び核酸よりなる化合物のランダムな及び有向的な合成のために用いられている。合成化合物ライブラリーは、Maybridge Chemical Co. (Trevillet, Cornwall, UK)、Comgenex (Princeton N.J.)、Brandon Associates (Merrimack, N.H.)及びMicrosource (New Milford, Conn.)を含む、数多くの企業から市販されている。レアケミカルライブラリーは、Aldrich (Milwaukee, Wis.)から市販されている。コンビナトリアルライブラリーは入手可能であり調製してもよい。或いは、細菌、真菌、植物及び動物の抽出物形態の天然化合物のライブラリーは、例えば Pan Laboratories (Bothell, Wash.) 若しくは MycoSearch (NC) から入手でき、又は当該技術分野で公知の方法で容易に作成できる。更に、天然の及び合成的に生成したライブラリー並びに化合物は、通常の化学的、物理的、及び生物化学的方法を通じて容易に修飾される。

10

20

【0107】

候補薬剤の他の供給源は、多種の単量体及びオリゴマーフラバノール、特にカテキン、エピカテキン及びその誘導体を含む。Nifli, A-P et al. (2005) Exp. Cell Res. 309:329を参照されたい。候補薬剤の更なる供給源は、オピオイドである。Kampa, M. et al. (2004) Exp. Cell Res. 294:234を参照されたい。

或いは、ARを結合すると言われている小分子の1つ又は組合せは、優先的なmAR結合のためにテストしてもよい。例えば、PCT/IB2005/002592号(国際公開第2006/024931号公報)、PCT/US2004/038859号(国際公開第2005/052211号公報)、PCT/2004/027483(国際公開第2005/018573号公報)、PCT/2005/013775号(国際公開第2005/105091号公報)、PCT/US2005/029592号(国際公開第2006/026196号公報)、及びPCT/IB2005/002592号(国際公開第2006/024931号公報)を参照されたい。

30

【0108】

本発明による有用な薬剤は、多数の化学的分類に見出すことができる。有用な化合物は、有機化合物、又は有機小化合物でもよい。有機小化合物は、50より大きくさらに約2500ダルトンより小さい、好ましくは約750より小さい、より好ましくは約350ダルトンより小さい分子量を有する。具体的な分類は、ヘテロ環、ペプチド、サッカリド、ステロイド等を含む。化合物は、効能、安定性、薬学的適合性等を増強するように修飾されてもよい。薬剤の構造同定は、更なる薬剤を同定、産生、又はスクリーニングするために用いてもよい。例えば、ペプチド薬剤が同定される場合、それらは、例えばアミノ基のアシル化又はアルキル化及びカルボキシル基のエステル化又はアミジフィケーション(amidification)等のための、アミノ又はカルボキシル末端の機能化による、D-アミノ酸、特にD-アラニンのような非天然アミノ酸を用いるような、それらの安定性を増強するために多様な方法で修飾されてもよい。

40

【0109】

本発明による更なる試験可能な薬剤は、1つ又はそれ以上のテストステロン環の炭素分子、例えば、テストステロンの3'炭素(例えば、T-3-BSA)、又はテストステロンの17'炭素(例えば、T-17-BSA)を結合する血清アルブミン分子を含む。一態様では

50

、血清アルブミンは、テストステロンに3'炭素で結合するオキシムリンカーのような適切なリンカーによりステロイド環から離れている。Goeji, AF et al. (1986) J. Steroid Biochem. 24:1017を参照されたい。他の化合物が、血清アルブミン (BSA又はヒト血清アルブミン (HSA))の断片と結合するテストステロンのような有用な薬剤であってもよいことは理解されるであろう。好ましいフラグメントは、少なくとも50%、好ましくは少なくとも約70%、より好ましくは少なくとも約90%、約95%~約99%の血清アルブミンのアミノ酸配列を有するそれらの配列を含む。適切なフラグメントは連続的又は非連続的な欠失を有してもよい。

【0110】

「ウシ血清アルブミン」又はBSAとは、その好ましいフラグメント及び対立遺伝子多型を含む、Swiss-ProtエントリーP02769により表される、アミノ酸配列を意味する。「ヒト血清アルブミン」又はHSAとは、その好ましいフラグメント及び対立遺伝子多型を含む、Swiss-ProtエントリーP02768により表される、アミノ酸配列を意味する。よって前記血清アルブミン配列の対立遺伝子多型は、本発明の薬剤を生成するために用いてもよい(そのような多型の好ましいフラグメントも同様に包含する)。

【0111】

第一のスクリーニングに関して、被検薬剤の有用な濃度は、約10マイクロモル~約100マイクロモルより高い(即ち1mM、10mM、100mM又は1Mでも)が、1nM及びそれより高くても、1pM及びそれより高くても、又は1fM及びそれより高くてもよい。第一のスクリーニングの濃度は、9つの付加的な濃度とともに、(ここでは9つの付加的な濃度は第2の検査のために又は濃度曲線を作成するために第一のスクリーニング濃度を半対数区間(例えば9より多い濃度に関して)で低下することにより判定される)上限として用いられるであろう。

【0112】

「タンパク質」及び「ポリペプチド」は互換可能に用いられてもよく、少なくとも二つの共有結合しているアミノ酸を意味し、タンパク質、ポリペプチド、オリゴペプチド及びペプチドを含む。タンパク質は、天然のアミノ酸及びペプチド結合、又は合成のペプチド様構造で構成されてもよい。よって本明細書で用いる「アミノ酸」又は「ペプチド残基」は、天然及び合成の両方のアミノ酸を示す。例えば、ホモフェニルアラニン、シトルリン及びノルロイシンは本発明の目的のためのアミノ酸と考えられる。「アミノ酸」は、プロリン及びヒドロキシプロリンのようなイミノ酸残基も含む。側鎖は(R)又は(S)のどちらかの立体配置でよい。好ましい態様では、アミノ酸は(S)又はL-立体配置である。非天然型側鎖を用いる場合、非アミノ酸置換基を、例えばインビボの分解を予防又は遅延するために、用いてもよい。非天然型アミノ酸を含むタンパク質は、合成しても又はいくつの場合組換え的に生成してもよい。van Hest et al., FEBS Lett 428:(1-2)68-70 May 22, 1988 及び Tang et al., Abstr. Pap Am. Chem. S218:U138 Part2 Aug. 22, 1999を参照されたく、この両方は明確に参照して本明細書に取り込まれる。

【0113】

本明細書で用いる「検出可能な段階」「検出可能な」等の用語は、直接的に、例えば2次メッセンジャーの測定若しくは修飾(例えばリン酸化)タンパク質の検出による、又は間接的に、例えばその段階の下流の効果を観測することによる、のどちらかで測定できる段階を示す。例えば、アデニル酸シクラーゼの活性化は、cAMPの産生をもたらす。アデニル酸シクラーゼは、直接的に、例えばアッセイにおけるcAMPの生成物を観測するアッセイにより、又は間接的に、例えば実際のcAMPレベルの測定により、測定できる。他の検出可能な段階は、カルシウム流出、アポトーシス、PSA分泌及び骨格細胞の再構成の測定を含む。

本明細書で用いる、例えば結合若しくはシグナリング活性又はPSA分泌、アポトーシス及び/若しくはカルシウム流出に適用するような、「変化」、「差異」、「減少」又は「増加」という用語は、それらのそれぞれの活性の少なくとも10%の増加又は減少を示

す。

【0114】

G. ハイスループットスクリーニングアッセイ

検討したように、1つ又はそれ以上の検出可能に標識したアンドロゲンを、(1) mARを発現する細胞を検出するために；及び(2) mAR結合受容体リガンド及び他の薬剤についてスクリーニングするために：用いることは本発明の範囲内である。そのようなスクリーニングは、ハイ又はウルトラハイスループット形式で実施できるように容易に適合できる。本発明の態様の実施は、蛍光、発光、リン光発光又は化学発光化合物（複数も）を用いることにより、前述のように、アンドロゲンを直接的又は間接的のどちらかで標識して達成できる。

10

【0115】

蛍光標識したアンドロゲンを用いる場合、異なる蛍光モニタリングシステムの1つ又は組合せを用いてもよい。これは、例えばFACSシステムを含む。好ましくは、FACSシステム、又はハイスループットスクリーニング、例えば96ウェル又はそれ以上のマイクロタイタープレート専用のシステムを用いる。蛍光物質においてアッセイを実施する方法は公知であり、例えば Lakowicz, J. R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, New York: Plenum Press (1983); Herman, B., Resonance energy transfer microscopy, in: Fluorescence Microscopy of Living Cells in Culture, Part B, Methods in Cell Biology, vol. 30, ed. Taylor, D. L. & Wang, Y. -L., San Diego: Academic Press (1989), pp. 219-243; Turro, N. J., Modern Molecular Photochemistry, Menlo Park: Benjamin / Cummings Publishing Co., Inc. (1978), pp. 296-361に記載されている。多種のFACSシステムが当該技術分野で知られていて、本発明の方法に用いることができる（例えば、1999年4月16日に出願の国際公開第99/54494号公報、2001年7月5日出願の米国特許出願公開第20,010,006,787号を参照されたい、各々は明確に参照して本明細書に取り込まれる）。

20

【0116】

例えば、薬剤の存在下でのmAR陽性細胞からの蛍光標識したアンドロゲンの実質的な消失は、mARを結合する能力を有する薬剤の指標である。そのような方法の結果は、標準的なハイ及びウルトラハイスループットスクリーニングの方法を用いて達成できる。所望であれば、そのような方法は、対照もハイ又はウルトラハイスループットのプラットホームにて実施されるような、本明細書に開示の1つ又はそれ以上の適切な対照アッセイと組合せる（例えば、本質的に同時に行う）ことができる。

30

【0117】

本発明の一態様によると、サンプルの蛍光性は蛍光光度計を用いて測定できる。一般に、第一波長を有する励起源からの、励起放射は励起光学部品を通過する。励起光学部品は、励起放射がサンプルを励起するように働く。それに応じて、サンプル中の蛍光タンパク質は、励起波長とは異なる波長を有する放射を放つ。次いで、収集光学部品は、サンプルからの放出を収集する。装置は、走査の間サンプルを特異的な温度に維持する温度制御部を含んでもよい。一態様によると、多軸平行移動ステージは、異なるウェルが露光するように配置されるように、複数のサンプルを保持しているマイクロタイタープレートを移動させる。多軸平行移動ステージ、温度制御部、自動焦点特性、並びに画像化及びデータ収集に関連する電子機器は、適正にプログラム化されたデジタルコンピュータに管理されてもよい。コンピューターは、アッセイ中に収集したデータを提示のために別の形式に変換することもできる。

40

【0118】

別の態様では、フローサイトメトリーは蛍光性を検出するために用いる。蛍光性を検出するための他の方法、例えば量子ドット法（例えば Goldman et al., J. Am. Chem. Soc. (2002) 124: 6378-82; Pathak et al. J. Am. Chem. Soc. (2001) 123:4103-4; 及び Remade et al., Proc. Natl. Sci. USA (2000) 18:553-8を参照されたい、各々は明確に参照して本明細書に取り込まれる）も用いられてもよい。

50

ハイスループット及び関連するスクリーニングアッセイの実施についての一般的開示に関して、Olah, NM et al. (2004) Current Drug Discov. Technology, 3:211; deLong et al. (2005) in J. Chromatogr. B. Analyt. Biomed. Life Science, 829:1; 及び Liu B. et al. (2005) Am. J. Pharmacogenomics 4:263も参照されたい。

【0119】

特に定められていない限り、本明細書でテストステロン-B S A複合体（多種の短縮形を含む）とは、以下の特定の化合物：テストステロン3-（O-カルボキシメチル）オキシム：B S Aを示す。

本明細書に記載する全ての文献は、その全体を参照して本明細書に取り込まれる。以下の非限定的な実施例は本発明を例示するものである。

【0120】

（実施例）

本参考実施例は、Kampa, M et al. (2002) FASEB J. 16:1429を再現している。とりわけ、トリチウム化テストステロンのm A R（L N a C P）細胞を発現する細胞の膜上への飽和及び置換の結合を示す。

【0121】

図1 A-Bに関して、 ^3H -テストステロンのL N C a P細胞の膜への飽和結合（1 A）及び置換結合（1 B）を示す。（A）飽和結合。細胞膜は、Kampa, M et al. (2002), ibid に従い、 2 mg/ml の最終濃度に調製した。これらを、 100 倍を超える非標識のアンドロゲン（D H T）の存在下又は非存在下で $2\sim 50\text{ nM}$ に変化させた6つの濃度の ^3H -テストステロンとともに 4°C で一晩培養した。図は Scatchard 座標におけるデータの解析を示す。図は3通りに行った典型的な実験の結果を表す。（1 B）置換結合。細胞膜（ 200 マイクログラム）を、約 5 nm の ^3H -テストステロン単独（B o）と又は $10^{-12}\sim 10^{-6}\text{ M}$ の範囲の指定の濃度の非標識のステロイド（D H T、エストラジオール、プロゲステロン）の存在下で培養した。非特異的な結合を、 5 マイクロモルD H Tを導入してアッセイした。図（2通りに実施した3つの異なる実験の平均）は、指定の濃度のD H Tの存在下の特異的な結合（B s）のD H Tの非存在下の特異的な結合（B o）に対する比率、 $B s/B o$ を示す。

【0122】

前立腺癌細胞株（Kampa et al 2002）において、更にはヒト前立腺腫瘍において高度にがん細胞に発現する（Stathopoulos et al 2003）、アンドロゲンに対する機能的m A Rの同定が報告されている。 1 つの非透過性のテストステロンの類縁体である、テストステロン-B S Aによるこれらの結合部位の活性化は、迅速なアクチン細胞骨格の再構成を誘発して、数分内に前立腺特異抗原（P S A）の分泌を増加させることが示された。アクチン再構成の分子機構を調節する特異的な非ゲノムシグナル伝達カスケードが、同定されている（Papakonstanti et al 2003）。更に、より最近の検討では、B S Aに結合したテストステロンが、a）i A R陰性のD U 1 4 5又はi A R陽性のL N C a Pのどちらかのヒト前立腺癌細胞のアポトーシス、及びb）インビトロ及びインビボの両方での前立腺癌の退行を誘発することが示された（Hatzoglou et al 2005）。これらの発見は、m A Rの活性化因子が前立腺癌のアポトーシス退行のための重要な手段であることを暗示する。しかし、観察されたアクチンの再分布及びアポトーシスの誘発を制御する分子機構は、完全には理解されていない。

【0123】

下記のように、アクチン細胞骨格再構成及びアポトーシスの間のクロストークを詳細に検討するために、i A R陰性のD U 1 4 5前立腺癌細胞株を用いて、活性m A Rを発現することが示された（Hatzoglou et al 2005）。テストステロン-B S A処理によるD U 1 4 5細胞のアクチン再構成及びアポトーシス応答の誘発を調節する分子機構を検討して、前立腺癌細胞のアポトーシス退行におけるアクチン骨格細胞再構成の中心的な調節の役割を示唆する。

【実施例1】

【0124】

テストステロン-B S AはD U 1 4 5細胞の強力なアクチン重合を迅速に誘発する。

L N C a Pヒト前立腺癌細胞におけるm A R部位の活性化は、数分内に、強力なアクチン重合及びマイクロフィラメント再構成による指標として、アクチン細胞骨格の顕著な再構成をもたらすことが認識されている (Kampa et al 2002)。発明者らは、非透過性のテストステロン類縁体及び細胞内アンドロゲン受容体 (i A R) の特異的な阻害剤又はアンタゴニストの両方を用いて、L N C a P細胞のこの事象がm A Rの活性化を通して誘発されたという強力な証拠を提供した。発明者らは、ヒト前立腺癌細胞におけるm A R活性化及びアクチン細胞骨格の間のクロストークに関する究極の実験的証拠を提供する目的で、テストステロン-B S Aが、i A R陰性であるがm A R陽性のD U 1 4 5細胞のアクチン細胞骨格の動態に影響を与え得るかどうかを検討した。図2 A - Bから算出されるように、細胞の 10^{-7} Mのテストステロン-B S A複合体との培養は、T r i t o n - 不溶性 (繊維状) に対するT r i t o n - 可溶性 (単量体) のアクチンの比を45%にまで有意に減少させた。これらの定量的結果は、テスト-B S A処理のD U 1 4 5細胞におけるアクチン細胞骨格の共焦点レーザー走査顕微鏡分析によって全面的に支持された。実際、図3 A - Cに示されるように、マイクロフィラメント構造の完全な垂膜性再分布が10分以内に明白に表れ、少なくとも2時間持続した。これらの結果から、アンドロゲンによるm A Rの活性化が、発現又は細胞内アンドロゲン受容体とは無関係に、前立腺癌細胞における迅速で強力なアクチン細胞骨格再分布を誘発すると断定できる。

10

【実施例2】

20

【0125】

アクチン再構成は、テストステロン-B S A誘発のD U 1 4 5細胞のアポトーシス応答のために必要である。

テスト-B S Aによるm A Rの活性化がL N C a P及びD U 1 4 5前立腺癌細胞株の両方におけるアポトーシスの有意な誘発をもたらすという報告がある。発明者らは、m A B S活性化による、アクチン細胞骨格再構成及びアポトーシスの間の可能性のあるクロストークを分析する目的で、アクチン再構成を阻止する特異的な薬剤の存在下で、D U 1 4 5細胞のアポトーシス応答を検討した。アクチン再分布を阻止するサイトカラシンB (10^{-6} M) 又はファラシジン (10^{-6} M) との細胞の培養は、テスト-B S Aで処理したD U 1 4 5細胞のアポトーシス応答を明白に阻止することを示した (図4)。F A C S分析は、これらの観察を全面的に支持した。これらの結果から、アクチン再分布が、テストステロン膜結合部位の活性化により、D U 1 4 5前立腺癌細胞のアポトーシス応答へと導くシグナル伝達事象を調節することができる、必要な段階であることが断定される。この説は、アクチン再構成が、T N F α 誘発の抗アポトーシス応答におけるN F k Bの転位及び転写調節を調節する、重要なシグナル伝達段階であることを示す、先に公開されたデータ (Papakonstanti and Stournaras, Mol Biol cell, 2004) と一致するものである。

30

【実施例3】

【0126】

D U 1 4 5細胞におけるm A Rの活性化は、F A K / P I - 3 K / R a c 1経路を誘発しない。

40

L N C a P細胞におけるm A Rの活性化が、F A K / P I - 3 K / C d c 4 2 / R a c 1を含む非ゲノムシグナル伝達経路を迅速に誘発して、アクチン再構成へと導くことは示されている (Papakonstanti et al. Mol Endocrinol 2003)。意外にも、i A R陰性のD U 1 4 5細胞では、この経路は、迅速な非ゲノムアクチンシグナル伝達の媒介に関わらないと考えられる。実際、図5 A - Bに示されるように、F A KはD U 1 4 5細胞に構造的にリン酸化されていた。細胞をテスト-B S Aと培養した場合、明白な更なるF A Kリン酸化も、下流のシグナル伝達分子P I - 3 K、及びR a c 1の活性化もどちらも記録できなかった。これらの結果と一致して、D U 1 4 5細胞の特異的P I - 3 K阻害剤である、ワートマニン (wortmannin) との培養は、テストステロン処理により誘発されたアクチン重合に影響を与えず、P I - 3 Kシグナル伝達がこれらの細胞におけるテストステロン誘

50

発の迅速なアクチン再構成に関わらないことを示唆した。これらの発見は、図 2 A - B に示す迅速なアクチン再構成を調節する、代替的な非ゲノムシグナル伝達カスケードの存在を暗示している。

【実施例 4】

【0127】

D U 1 4 5 細胞の m A R の活性化は、迅速な R h o A 及び R O C K 活性化を誘発する。

D U 1 4 5 細胞における非ゲノムのテストステロン信号伝達を媒介する代替的機構を探して、発明者らは、R h o - G T P アーゼの可能性のある迅速な活性化を分析した。実際、そのようなアクチン再構成の過程を調節するシグナル伝達エフェクターの中で、R h o ファミリーの小さい G T P アーゼが最も理解された。古典的に、原形質膜受容体は、頻繁にリン酸化を介して特異的なグアニン交換因子 (G E F) を活性化して、これは R h o - G T P アーゼの G T P との順次的な結合をもたらす。活性な R h o G T P アーゼは、R h o コイルド-コイルドキナーゼ (R O C K 1) 及び/又は p 2 1 - 活性化キナーゼ (P a k 1) へのシグナル伝送を続ける。活性化した P a k 1 及び R O C K 1 は、各々 L i m - キナーゼ 1 及び 2 (L i m k 1 及び L i m k 2) をリン酸化及び活性化する。L i m k 1 及び L i m k 2 は、2 つの N - 末端 L i m ドメイン及び C - 末端キナーゼドメインから構成される密接に関連するタンパク質である。L i m ドメインは、アクチン細胞骨格と相互作用する細胞質タンパク質に頻繁に見い出されるタンパク質-結合モチーフである。最終的に、L i m k 1 及び L i m k 2 は、不活性化されてアクチン重合を生じさせる、コフィリン及びアクチン脱重合因子 (A D F) のような、アクチン脱重合タンパク質をリン酸化する。図 6 A - B に示すように、D U 1 4 5 細胞の 10^{-7} M テストステロン-B S A での処理は、R h o A の極めて速い (3 分以内) 活性化を誘発して、これは 3 0 分後の最大活性を 2 時間まで持続させた。R h o A 活性化の下流のエフェクターを更に分析するために、テストステロン-B S A で活性化した D U 1 4 5 細胞を、特異的 R O C K 阻害剤 Y 2 7 6 3 2 で処理して、アクチン再分布を G / 総アクチン比を用いて定量的に記録した。図 6 B に示すように、テストステロン誘発の迅速なアクチン重合は、Y 2 7 6 3 2 の存在下で全面的に阻止されて、R O C K が、D U 1 4 5 細胞における m A R 活性化の非ゲノムシグナル伝達の R h o A エフェクターであることを示した。

【実施例 5】

【0128】

R h o / R O C K シグナル伝達カスケードの阻止は、アクチン再構成及びアポトーシス誘発の両方を防止する。

図 4 に示すように、アクチン再分布は、m A R の活性化による D U 1 4 5 前立腺癌細胞のアポトーシス応答へと導くシグナル伝達事象を調節する、必要な段階であると考えられる。発明者らはこ、の現象を更に検討するために、新規に同定されるシグナル伝達カスケードを阻止して、アクチン再構成を導く阻害剤の存在下で、D U 1 4 5 細胞のアポトーシス応答を分析した。興味深いことに、図 6 A - B に示すように、D U 1 4 5 細胞の Y 2 7 6 3 2 との培養は、テスト-B S A 処理によるプロ-アポトーシス細胞の応答の無効化をもたらした。図の結果を考慮して、R h o / R O C K シグナル伝達カスケードの阻止が、アクチン再構成及びアポトーシス誘発の両方を防止することが示された。これらの結果は、アクチン再分布が、m A B S に活性化された D U 1 4 5 細胞のアポトーシス応答の制御における重要な調節役として機能するという説を支持する。他方で、ワートマニン (wortmannin) との細胞の培養は、テスト-B S A 誘発のアポトーシス応答になんら影響が見られず、P I - 3 K シグナル伝達が i A R 陰性の D U 1 4 5 細胞のアポトーシス細胞応答に関与しないという証拠を支持した。

【0129】

下記の原料、方法及び科学的文献は本発明を理解することの助けとなるであろう。

原料

R P M I 1 6 4 0 及びウシ胎仔血清 (F B S) は Gibco-BRL (MD, USA) から入手した。ローダミン-ファロイジン及び S L O W F A D E A n t i f a d e キットは、Molecu

lar Probe Inc. (Eugene, OR) から入手した。

【0130】

ECL ウェスタンブロットキットは、Amersham (Arlington Heights, IL, USA) から入手した。テストステロン-3-(O-カルボキシメチル) オキシム-BSA (テストステロン-BSA と称す) は Sigma (St. Louis, MO) から入手した。テストステロン-BSA は、10 回の各実験の所定の濃度で培養培地に溶解した。次いでこの保存溶液を炭 (30 mg/ml) 及びデキストラン (0.03 mg/ml) の溶液で 30 分間室温にて処理して、15 分間 3000 x で遠心分離に付し、0.22 µm のフィルターに通して、ステロイド無しの何れの汚染の可能性も取り除いた。処理したテストステロン-BSA は全検討を通して順次用いた。全ての他の化学物質は、通常の市販の供給源から得られる最も精製された等級で入手した。

10

【0131】

細胞及び培養条件

転移性脳腫瘍 (DMSZ, Braunschweig, Germany) から単離した DU145 ヒト前立腺癌細胞は、2~9 代継代の間で検討した。細胞は、10% 熱不活性化ウシ胎仔血清を添加した RPMI 培地で 37 °C にて空气中 5% CO₂ の湿潤雰囲気下で培養した。それらは、何れかの実験の前に、1 週間継代培養して、無血清培地で 24 時間培養した。

【0132】

可溶性及び不溶性アクチンの免疫ブロットアッセイ

10⁻⁷ M テストステロン-BSA での処理の後、細胞を、0.5 mL のトリトン抽出緩衝液 (0.3% のトリトン X-100、5 mM のトリス-HCl、2 mM の EGTA、300 mM のショ糖、400 µM の PMSF、10 µM のロイペプチン、2 µM のファロイジン、pH 7.4) 中で氷上 5 分間培養した。トリトン可溶性タンパク質を、等量の 6% 過塩素酸 (PCA) で沈殿化した。トリトン不溶性画分は、1 mL の 3% PCA で沈殿化した。各画分の等量を SDS 電気泳動に付して、LKB 電気泳動装置 (LKB, Bromma, Sweden) を用いてタンパク質をニトロセルロース膜へ転移した。次いで、膜を抗アクチンモノクローナル抗体と培養して、続いて適切な標識した第 2 の抗体と培養した。ブロットは、拡張した化学蛍光システムを用いて展開して、バンド強度は、PC ベースのイメージ分析 (Image Analysis, Inc., Ontario, Canada) により定量化した。

20

【0133】

共焦点レーザー走査顕微鏡法

線維状 (F) アクチンの直接蛍光顕微鏡検査法を、各々 1 時間及び 2 時間の 10⁻⁷ M テストステロン-BSA で処理した DU145 細胞のローダミン-ファロイジン染色により実施した。サンプルは、共焦点レーザー走査モジュール (Leica Lasertechnik, Heidelberg, Germany) で分析した。

30

【0134】

アポトーシスの定量的測定

Apoptosis Assay (Biocolor Ltd., Belfast, N. Ireland) を製造者取扱説明書に従い、アポトーシスを定量化するために用いた。このキットは、ホスファチジルセリンが外葉に転移した場合に膜「フリップフロップ」事象を受けるアポトーシス細胞を赤く染色する色素を用いている。アポトーシスの検出は、倒立顕微鏡下で容易に観察できる。アポトーシスの定量化に関して、標識した細胞内の色素の量を順次的に溶液中に放出して、濃度を色フィルターマイクロプレート測色計 (Dynatech MicroElisa reader Chantilly, VA) を用いて、550 nm の波長で (基準フィルター; 620 nm) 測定することができる。

40

【0135】

Etienne-Manneville, S., and Hall, A. (2002) Nature 420(6916), 629-35; Schmidt, A., and Hall, A. (2002) Genes Dev 16(13), 1587-609; Amano, M., Fukata, Y., and Kaibuchi, K. (2000) Exp Cell Res 261(1), 44-51; Jaffer, Z. M., and Chernoff, J. (2002) Int J Biochem Cell Biol 34(7), 713-7; Amano, T., Tanabe, K., Eto, T., Nar

50

umiya, S., and Mizuno, K. (2001) Biochem J 354(Pt 1), 149-59; Edwards, D. C., Sanders, L. C., Bokoch, G. M., and 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., and Narumiya, S. (1999) Science 285(5429), 895-8; Ohashi, K., Nagata, K., Maekawa, M., Ishizaki, T., Narumiya, S., and Mizuno, K. (2000) J Biol Chem 275(5), 3577-82; Sumi, T., Matsumoto, K., and Nakamura, T. (2001) J Biol Chem 276(1), 670-6; Bach, I. (2000) Mech Dev 91(1-2), 5-17; 及び Arber, S., Barbayannis, F. A., Hanser, H., Schneider, C., Stanyon, C. A., Bernard, O., and Caroni, P. (1998) Nature 393(6687), 805-9も参照されたい。

【0136】

10

本明細書に引用する全ての参照文献の開示は参照して組み込まれる。本発明はその好ましい態様に関して詳細に記述するものである。しかし、当業者であれば、この開示を考慮して本発明の精神及び範囲を逸脱することなく修正及び改良を行うことができることを理解されるであろう。

【0137】

参照による組み込み

本出願全体を通して引用されているすべての参考文献（参照文献、登録済み特許、公開特許出願、及び審査中の特許出願を含む）の内容は、それらの全体を参照して明白に本明細書に組み込まれる。

【0138】

20

均等物

当業者は、本明細書に記述の本発明の特定の態様に対する多くの均等物を認識、又は通常の実験だけを使用して確認することができる。そのような均等物は、添付の特許請求の範囲に包含されることが意図されている。

【図面の簡単な説明】

【0139】

【図1】図1A-Bは、mAR (LNaCP) 細胞を発現する細胞の膜上のトリチル化テストステロンの飽和及び置換の結合を示すグラフである。

【図2】図2A-Bは、テストステロン処理後のC U 1 4 5細胞における修飾及び重合化したアクチンを示すグラフである。（テストステロン処理後のD U 1 4 5細胞における単量体の修飾及び重合化アクチン。35mm皿無血清培地で培養したD U 1 4 5細胞は10⁻⁷Mテストステロン-B S Aと異なる期間培養した。細胞下分画後、単量体及び全アクチンは定量的な免疫プロットアッセイにより測定した。図Aは2時間以内のG/全アクチン比の減少を表す。重合化の効果は、図Bの繊維状アクチン値の増加に反映される。）

30

【図3】図3A-Cは、アクチン細胞骨格構築へのアンドロゲン効果の形態学的分析を示す顕微鏡写真である。（アクチン細胞骨格構築へのアンドロゲン効果の形態学的分析。アクチンフィラメントの再分布はローダミン-ファロイジン染色により測定した。（A）D U 1 4 5未処理細胞（7セクションの平均）、（B）テストステロン-B S Aで1時間処理したD U 1 4 5細胞（5セクションの平均）、（C）テストステロン-B S Aで2時間処理したD U 1 4 5細胞（7セクションの平均）の共焦点レーザー走査顕微鏡分析（倍率x63）。）

40

【図4】図4は、多種の化合物へ暴露された細胞における細胞死（アポトーシス）を示すグラフである。

【図5】図5A-Bは、テストステロン-B S A複合体への暴露後の多種のシグナル伝達分子の活性を示すグラフである。

【図6】図6Aはゲルの発現、図6Bはグラフである。共に、D U 1 4 5細胞をテストステロン-B S A複合体で処理した場合、R h o A及びR O C Kのシグナル伝達分子が活性化されることを示す。

【図 1】

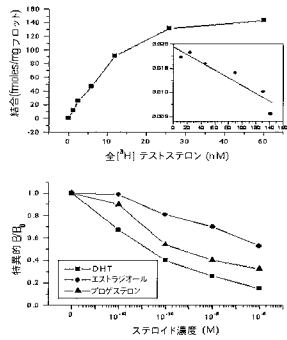


図1 A-1B

【図 2】

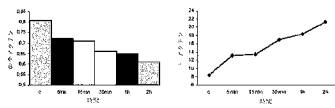


Fig. 1. Modification of monomeric and polymerized actin in DU145 cells after testosterone treatment. DU145 cells, cultured in 35 mm dishes, in serum free medium, were incubated with ¹²⁵I testosterone BSA for different time periods. Monomeric and total actin were measured by quantitative immunoblot analysis after subcellular fractionation. Figure 1 shows the decrease of the G/F ratio within a time period of five hours. The polymerization effect is reflected by the increase of filamentous actin values in figure 2.

図 2 A-B

【図 5】

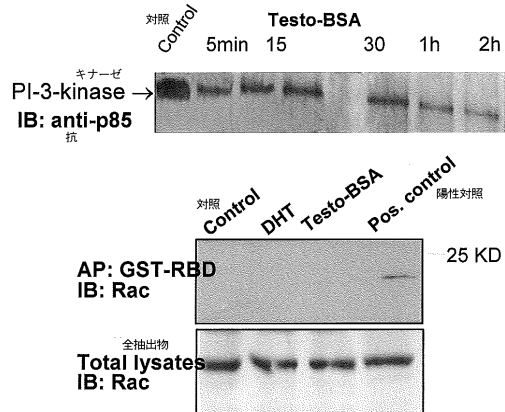


図 5 A-5 B

【図 3】

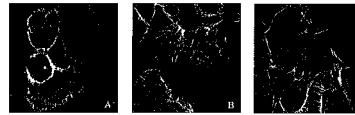


Fig. 2. Morphological analysis of androgen effects on actin cytoskeleton organization. The redistribution of actin filaments was determined by rhodamine-phalloidin staining. Confocal laser scanning microscopy analysis (magnification $\times 63$) of (A) DU145 untreated cells (average of 7 sections), (B) DU145 cells treated for 1h with testosterone-BSA (average of 5 sections), (C) DU145 cells treated for 2h with testosterone-BSA (average of 7 sections).

図 3 A-C

【図 4】

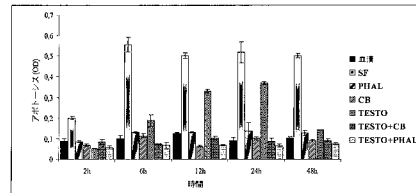


図 4

【図 6】

RhoA / ROCK は、DU145細胞のTesto-BSA処理により活性化される。

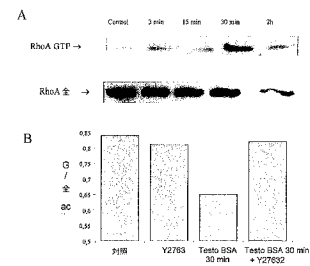


図 6 A-6 B

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US07/07913
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: G01N 33/53(2006.01),33/566(2006.01) USPC: 435/7.2,7.21,7.93;436/501 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/7.2,7.21,7.93;436/501 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NIFLI et al. Monomeric and oligomeric flavanols are agonists of membrane androgen receptors. Experimental Cell Research. 2005, Vol. 309, pages 329-339, see entire document.	1-4
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 06 June 2008 (06.06.2008)		Date of mailing of the international search report 08 JUL 2008
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Lisa Cook <i>J. Roberts for</i> Telephone No. (571) 272-0500

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US07/07913

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 5-49
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US07/07913

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:
East and West Patent database
STN - biosis, caplus, embase, medline, japio
Palm inventor name search

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード (参考)
G 0 1 N 33/53 (2006.01) G 0 1 N 33/53 D
A 6 1 K 45/00 (2006.01) A 6 1 K 45/00

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ロバート エル ブキャナン
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0 2 2 0 5 ボストン ピー. オー. ボックス 5 5 7 4

(72)発明者 クリストス ストゥーナラス
ギリシャ共和国 7 0 0 1 3 エイジー ミロナス ヘリクリオン ヴート アネムー 6

Fターム(参考) 4B063 QA18 QQ08 QQ27 QQ33 QQ42 QQ75 QQ79 QR07 QR13 QR32
QR45 QR48 QR66 QR77 QX01
4C084 AA17 NA14 ZB212 ZB262 ZC422
4C085 LL11

专利名称(译)	检测膜雄激素受体 (MAR) 药物		
公开(公告)号	JP2009532060A	公开(公告)日	2009-09-10
申请号	JP2009504216	申请日	2007-03-30
[标]申请(专利权)人(译)	MEDI-点击顺SA		
申请(专利权)人(译)	Medikushisu上课.二.		
[标]发明人	ニコラスバコプロス コンスタンティノスアレヴィゾプロス ロバートエルブキャナン クリストスストウナラス		
发明人	ニコラス バコプロス コンスタンティノス アレヴィゾプロス ロバート エル ブキャナン クリストス ストウナラス		
IPC分类号	C12Q1/02 A61K49/00 C12Q1/48 C12Q1/42 C12Q1/68 G01N33/53 A61K45/00		
FI分类号	C12Q1/02 A61K49/00.A C12Q1/48.Z C12Q1/42 C12Q1/68 G01N33/53.D A61K45/00		
F-TERM分类号	4B063/QA18 4B063/QQ08 4B063/QQ27 4B063/QQ33 4B063/QQ42 4B063/QQ75 4B063/QQ79 4B063/QR07 4B063/QR13 4B063/QR32 4B063/QR45 4B063/QR48 4B063/QR66 4B063/QR77 4B063/QX01 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZB212 4C084/ZB262 4C084/ZC422 4C085/LL11		
代理人(译)	佐伯 宪生		
优先权	60/788878 2006-04-03 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了用于检测调节膜雄激素受体 (mAR) 的药剂的方法。在一个方面，本发明提供了用于检测和任选地鉴定配体结合mAR的方法。根据本发明的一种测定检测选择性结合mAR的试剂与结合经典细胞内雄激素受体 (iAR或AR) 相关。本发明具有广泛的有用应用，包括提供筛选化学文库的方法，所述化学文库优先结合mAR的化学物质。

