

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **201792520** (13) **A2**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки  
**2018.04.30**

(22) Дата подачи заявки  
**2013.07.26**

(51) Int. Cl. *C12Q 1/68* (2006.01)  
*A61K 31/00* (2006.01)  
*C07K 14/72* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)

**(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ТЕРАПИИ, НАПРАВЛЕННОЙ НА АНДРОГЕННЫЙ РЕЦЕПТОР**

(31) **61/676,842; 61/783,763; 61/829,123**

(32) **2012.07.27; 2013.03.14; 2013.05.30**

(33) **US**

(62) **201590290; 2013.07.26**

(71) Заявитель:  
**АРАГОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,  
ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:  
**Джозеф Джеймс Дэвид, Хэджер  
Джеффри Х., Сенсинтаффар Джон Ли,  
Лу Нхин, Циань Цзин, Смит Николас  
Д. (US)**

(74) Представитель:  
**Медведев В.Н. (RU)**

(57) В настоящем документе описаны модифицированные полипептиды андрогенного рецептора, которые являются резистентными к ингибированию ингибитором андрогенного рецептора. В настоящем документе описаны композиции, комбинации и наборы, содержащие модифицированные полипептиды андрогенного рецептора, а также способы применения модифицированных полипептидов андрогенного рецептора. В настоящем документе также описаны способы применения модифицированных полипептидов андрогенного рецептора в качестве агентов скрининга для выявления и конструирования модуляторов андрогенного рецептора третьего поколения. В настоящем документе также описаны модуляторы андрогенного рецептора третьего поколения, которые ингибируют активность модифицированных полипептидов андрогенного рецептора. Также описаны фармацевтические композиции и лекарственные средства, которые включают описанные в настоящем документе соединения, а также способы применения таких модуляторов андрогенного рецептора самостоятельно или в комбинации с другими соединениями для лечения заболеваний или состояний, включая онкологические заболевания, такие как кастрационно-резистентный рак предстательной железы, которые опосредованы или зависят от андрогенных рецепторов.

**A2**

**201792520**

**201792520**

**A2**

**СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ТЕРАПИИ,  
НАПРАВЛЕННОЙ НА АНДРОГЕННЫЙ РЕЦЕПТОР**

ВКЛЮЧЕНИЕ ПУТЕМ ССЫЛКИ СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ,  
ПОДАННОГО В ВИДЕ ТЕКСТОВОГО ФАЙЛА ЧЕРЕЗ СЕТЬ EFS-WEB

Настоящая заявка содержит список последовательностей, который был подан в виде машиночитаемого текстового файла в формате ASCII через сеть EFS-Web и настоящим полностью включен в данный документ путем ссылки. Текстовый файл, созданный 16 июля 2013 г., имеет имя 38937-725-601\_SEQ.txt и размер 132 Кб.

**ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

Андрогенный рецептор (AR) представляет собой активируемый лигандом транскрипционный регуляторный белок, который опосредует индукцию различных биологических воздействий за счет взаимодействия с эндогенными андрогенами. Эндогенные андрогены включают стероиды, такие как тестостерон и дигидротестостерон. Тестостерон во многих тканях преобразуется в дигидротестостерон под действием фермента 5-альфа-редуктазы.

Взаимодействия андрогенов с андрогенными рецепторами предполагаются при ряде заболеваний или состояний, таких как андроген-зависимые формы рака, вирилизация у женщин и, помимо прочего, угревая сыпь. Соединения, которые снижают воздействие андрогенной сигнализации через андрогенный рецептор и/или снижают концентрации андрогенных рецепторов, применяют для лечения заболеваний или состояний, в которых играют роль андрогенные рецепторы.

**ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ**

В настоящем документе описано выявление модификаций андрогенного рецептора (AR), которые обуславливают резистентность пациентов к лечению антагонистом андрогенного рецептора первого или второго поколения. В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой замену фенилаланина в позиции 876 полипептида AR. В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой F876L. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид AR является резистентным к ингибированию антагонистом

андрогенного рецептора второго поколения, выбранным среди ARN-509, энзалутамида (MDV3100) и RD162. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид AR является резистентным к ингибированию антагонистом андрогенного рецептора первого поколения, выбранным среди бикалутамида, флутамида, гидроксифлутамида или нилутамида. В некоторых вариантах осуществления у пациента имеется рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы, рак молочной железы, рак печени (т.е. гепатоцеллюлярный рак) или рак мочевого пузыря. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой кастрационно-резистентный рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид AR показывает один или более видов активности рецептора AR дикого типа, включая, без ограничений, связывание с коактиватором, связывание с ДНК, связывание с лигандом или ядерную транслокацию. В некоторых вариантах осуществления антагонист первого или второго поколения показывает пониженную антагонистическую активность в отношении модифицированного полипептида AR в сравнении с полипептидом AR дикого типа.

В настоящем документе в некоторых вариантах осуществления описаны способы определения резистентности или потенциальной резистентности субъекта к терапии антагонистом андрогенного рецептора первого или второго поколения, включающие, состоящие из и/или состоящие по существу из: (a) тестирования образца, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид андрогенного рецептора, от субъекта, чтобы определить, модифицирован ли кодированный полипептид андрогенного рецептора по аминокислотной позиции 876 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1; и (b) характеристики субъекта как резистентного или потенциально резистентного к терапии антагонистом андрогенного рецептора первого или второго поколения при наличии у субъекта модификации. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают стадию получения образца от субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводили антагонист

AR первого или второго поколения для лечения рака. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы, рак молочной железы, рак печени (т.е. гепатоцеллюлярный рак) или рак мочевого пузыря. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой кастрационно-резистентный рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают, состоят из и/или состоят по существу из прекращения лечения антагонистом андрогенного рецептора первого или второго поколения при наличии в образце субъекта модификации в позиции 876 в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают, состоят из и/или состоят по существу из продолжения лечения антагонистом андрогенного рецептора первого или второго поколения при отсутствии в образце субъекта модификации в позиции 876 в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает, состоит из и/или состоит по существу из введения антагониста андрогенного рецептора третьего поколения, который ингибирует модифицированный AR при наличии в образце субъекта модификации в позиции 876 в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления антагониста андрогенного рецептора второго поколения выбирают среди ARN-509, энзалутамида (MDV3100) и RD162. В некоторых вариантах осуществления антагониста андрогенного рецептора первого поколения выбирают среди бикалутамида, флутамида, гидроксифлутамида или нилутамида.

В настоящем документе в некоторых вариантах осуществления описаны способы выбора субъекта для терапии антагонистом андрогенного рецептора третьего поколения, включающие, состоящие из и/или состоящие по существу из: (а) тестирования образца, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид андрогенного рецептора, от субъекта, чтобы определить, модифицирован ли кодированный полипептид андрогенного рецептора по аминокислотной позиции 876 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:

1; и (b) характеристики субъекта как кандидата на терапию антагонистом андрогенного рецептора третьего поколения при наличии у субъекта модификации. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают стадию получения образца от субъекта. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают, состоят из и/или состоят по существу из прекращения лечения антагонистом андрогенного рецептора первого или второго поколения при наличии в образце субъекта модификации в позиции 876 в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают, состоят из и/или состоят по существу из продолжения лечения антагонистом андрогенного рецептора первого или второго поколения при отсутствии в образце субъекта модификации в позиции 876 в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает, состоит из и/или состоит по существу из введения антагониста андрогенного рецептора третьего поколения, который ингибирует модифицированный AR при наличии в образце субъекта модификации в позиции 876 в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления антагониста андрогенного рецептора второго поколения выбирают среди ARN-509, энзалутамида (MDV3100) и RD162. В некоторых вариантах осуществления антагониста андрогенного рецептора первого поколения выбирают среди бикалутамида, флутамида, гидроксифлутамида или нилутамида.

В настоящем документе в некоторых вариантах осуществления описаны способы характеристики андрогенного рецептора субъекта, чтобы определить резистентность такого субъекта к ингибированию антагонистом андрогенного рецептора первого или второго поколения, включающие, состоящие из и/или состоящие по существу из: (a) тестирования образца, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид андрогенного рецептора, от субъекта, чтобы определить, модифицирован ли кодированный полипептид андрогенного рецептора по аминокислотной позиции 876 в SEQ ID NO: 1; и (b) при наличии у субъекта модификации по позиции 876 в SEQ ID NO: 1 - характеристики андрогенного рецептора субъекта как резистентного к ингибированию

антагонистом андрогенного рецептора первого или второго поколения. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают стадию получения образца от субъекта. В некоторых вариантах осуществления антагонист первого или второго поколения показывает пониженную антагонистическую активность в отношении модифицированного полипептида AR в сравнении с полипептидом AR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают, состоят из и/или состоят по существу из прекращения лечения антагонистом андрогенного рецептора первого или второго поколения при наличии в образце субъекта модификации в позиции 876 в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают, состоят из и/или состоят по существу из продолжения лечения антагонистом андрогенного рецептора первого или второго поколения при отсутствии в образце субъекта модификации в позиции 876 в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает, состоит из и/или состоит по существу из введения антагониста андрогенного рецептора третьего поколения, который ингибирует модифицированный AR при наличии в образце субъекта модификации в позиции 876 в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления антагониста андрогенного рецептора второго поколения выбирают среди ARN-509, энзалутамида (MDV3100) и RD162. В некоторых вариантах осуществления антагониста андрогенного рецептора первого поколения выбирают среди бикалутамида, флутамида, гидроксифлутамида или нилутамида.

В настоящем документе в некоторых вариантах осуществления описаны способы контроля развития или потенциального развития резистентности к терапии у субъекта, получающего антагонист андрогенного рецептора первого или второго поколения для лечения рака, включающие: (а) тестирование образца, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид андрогенного рецептора, от субъекта, чтобы определить, модифицирован ли кодированный полипептид андрогенного рецептора по аминокислотной позиции 876 в SEQ ID NO: 1; и (b) характеристику субъекта как резистентного или потенциально

резистентного к терапии антагонистом андрогенного рецептора первого или второго поколения при наличии у субъекта модификации. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают стадию получения образца от субъекта. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают, состоят из и/или состоят по существу из прекращения лечения антагонистом андрогенного рецептора первого или второго поколения при наличии в образце субъекта модификации в позиции 876 в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают, состоят из и/или состоят по существу из продолжения лечения антагонистом андрогенного рецептора первого или второго поколения при отсутствии в образце субъекта модификации в позиции 876 в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает, состоит из и/или состоит по существу из введения антагониста андрогенного рецептора третьего поколения, который ингибирует модифицированный AR при наличии в образце субъекта модификации в позиции 876 в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления антагониста андрогенного рецептора второго поколения выбирают среди ARN-509, энзалутамида (MDV3100) и RD162. В некоторых вариантах осуществления антагониста андрогенного рецептора первого поколения выбирают среди бикалутамида, флутамида, гидроксифлутамида или нилутамида.

В настоящем документе в некоторых вариантах осуществления описаны способы оптимизации терапии субъекта, получающего антагонист андрогенного рецептора первого или второго поколения для лечения рака, включающие, состоящие из и/или состоящие по существу из: (a) тестирования образца, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид андрогенного рецептора, от субъекта, чтобы определить, модифицирован ли кодированный полипептид андрогенного рецептора по аминокислотной позиции 876 в SEQ ID NO: 1; и (c) (i) при наличии в образце модификации - прекращения лечения субъекта антагонистом андрогенного рецептора первого или второго поколения, или (ii) при отсутствии в образце модификации - продолжения лечения субъекта антагонистом андрогенного

рецептора первого или второго поколения при отсутствии у субъекта модификации. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают стадию получения образца от субъекта. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают, состоят из и/или состоят по существу из прекращения лечения антагонистом андрогенного рецептора первого или второго поколения при наличии в образце субъекта модификации в позиции 876 в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают, состоят из и/или состоят по существу из продолжения лечения антагонистом андрогенного рецептора первого или второго поколения при отсутствии в образце субъекта модификации в позиции 876 в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает, состоит из и/или состоит по существу из введения антагониста андрогенного рецептора третьего поколения, который ингибирует модифицированный AR при наличии в образце субъекта модификации в позиции 876 в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления антагониста андрогенного рецептора второго поколения выбирают среди ARN-509, энзалутамида (MDV3100) и RD162. В некоторых вариантах осуществления антагониста андрогенного рецептора первого поколения выбирают среди бикалутамида, флутамида, гидроксифлутамида или нилутамида.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид AR содержит, состоит из и/или состоит по существу из замены или делеции аминокислоты в позиции 876 в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид AR содержит, состоит из и/или состоит по существу из замены фенилаланина на аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из лейцина, изолейцина, валина, аланина, глицина, метионина, серина, треонина, цистеина, триптофана, лизина, аргинина, гистидина, пролина, тирозина, аспарагина, глутамина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты в позиции 876 в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид AR содержит, состоит из и/или состоит по существу из замены фенилаланина на аминокислоту,



выбранную среди глицина, аланина, валина, лейцина и изолейцина в позиции 876 в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид AR содержит, состоит из и/или состоит по существу из замены фенилаланина на лейцин в позиции 876 в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид AR содержит, состоит из и/или состоит по существу из делеции нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную позицию 876 в SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированный полипептид AR, имеет (i) мутацию тимина (t) на цитозин (c) в позиции нуклеиновой кислоты, соответствующей позиции нуклеиновой кислоты 2626 в последовательности нуклеотидов, представленной в SEQ ID NO: 18; (ii) мутацию цитозина (c) на аденин (a) в позиции нуклеиновой кислоты, соответствующей позиции нуклеиновой кислоты 2628 в последовательности нуклеотидов, представленной в SEQ ID NO: 18; или (ii) мутацию цитозина (c) на гуанин (g) в позиции нуклеиновой кислоты, соответствующей позиции нуклеиновой кислоты 2628 в последовательности нуклеотидов, представленной в SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления способа образец нуклеиновой кислоты представляет собой РНК или ДНК. В некоторых вариантах осуществления способа образец нуклеиновой кислоты представляет собой геномную ДНК. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает, состоит из и/или состоит по существу из выделения мРНК из образца РНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту выделяют из образца клеток опухоли, полученной от субъекта. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец биопсии опухоли, образец крови, образец сыворотки, образец лимфы или образец аспирата костного мозга, полученные от субъекта. В некоторых вариантах осуществления образец содержит циркулирующие опухолевые клетки. В некоторых вариантах осуществления образец содержит клетки диссеминированной опухоли. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту перед тестированием очищают из образца. В некоторых

вариантах осуществления нуклеиновую кислоту перед тестированием амплифицируют.

В некоторых вариантах осуществления способа тестирование включает, состоит из и/или состоит по существу из проведения амплификации в полимеразной цепной реакции (ПЦР) образца нуклеиновой кислоты, кодирующей позицию 876 в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления ПЦР-амплификация включает, состоит из и/или состоит по существу из применения пары олигонуклеотидных праймеров, которые фланкируют область, кодирующую аминокислотную позицию 876 в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает секвенирование амплифицированной с помощью ПЦР нуклеиновой кислоты с применением методик, известных специалистам в данной области.

В некоторых вариантах осуществления тестирование включает, состоит из и/или состоит по существу из приведения нуклеиновой кислоты в контакт со специфичным к последовательности нуклеиновой кислоты зондом, причем специфичный к последовательности нуклеиновой кислоты зонд: (а) связывается с нуклеиновой кислотой, кодирующей модифицированный рецептор, который модифицирован в аминокислотной позиции 876; и (b) не связывается с нуклеиновой кислотой, кодирующей рецептор дикого типа, имеющий фенилаланин в позиции 876 в SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления антагонист андрогенного рецептора первого или второго поколения ингибирует полипептид андрогенного рецептора дикого типа за счет конкурентного антагонизма. В некоторых вариантах осуществления антагониста андрогенного рецептора второго поколения выбирают среди ARN-509, энзалутамида (MDV3100) или RD162.

В некоторых вариантах осуществления субъект имеет заболевание или расстройство, выбранное среди рака, воспалительного расстройства или пролиферативного расстройства. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется AR-опосредованный рак. В некоторых вариантах осуществления рак выбирают из рака предстательной железы, рака молочной железы,

рака печени (т.е. гепатоцеллюлярного рака) или рака мочевого пузыря. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется кастрационно-резистентный рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется солидная опухоль.

В некоторых вариантах осуществления субъект получает лечение антагонистом андрогенного рецептора первого или второго поколения до получения образца от субъекта. В некоторых вариантах осуществления субъект чувствителен к лечению антагонистом андрогенного рецептора первого или второго поколения при его первом введении. В некоторых вариантах осуществления образец для применения в способах представляет собой образец, полученный через 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 1 месяц, 2 месяца, 3 месяца, 4 месяца, 5 месяцев, 6 месяцев, 7 месяцев, 8 месяцев, 9 месяцев, 10 месяцев, 11 месяцев, 12 месяцев, 14 месяцев, 16 месяцев, 18 месяцев, 20 месяцев, 22 месяца или 24 месяца после первого введения антагониста AR первого или второго поколения. В некоторых вариантах осуществления образец получают 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 раз в течение курса лечения антагонистом AR первого или второго поколения. В некоторых вариантах осуществления субъект чувствителен к лечению антагонистом AR первого или второго поколения при его первом введении.

В настоящем документе в некоторых вариантах осуществления описаны способы проведения скрининга соединений, которые выступают в роли антагониста к модифицированному андрогенному рецептору, содержащие, состоящие из и/или состоящие по существу из: (а) экспрессии модифицированного андрогенного рецептора в клетке, причем модифицированный андрогенный рецептор модифицирован в аминокислотной позиции, соответствующей позиции 876 в SEQ ID NO: 1; (b) приведения клетки в контакт с тестируемым соединением; и (c) детекции уровня активности андрогенного рецептора в клетке, причем выраженное снижение активности указывает на способность соединения выступать в роли антагониста к модифицированному AR. В некоторых вариантах

осуществления тестируемое соединение показывает полную активность в качестве антагониста к модифицированному AR. В некоторых вариантах осуществления тестируемое соединение не показывает активность в качестве агониста к модифицированному AR. В настоящем документе в некоторых вариантах осуществления описан ингибитор андрогенного рецептора третьего поколения, выявленный способами, описанными в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления применяемая в способе модификация полипептида AR представляет собой замену или делецию аминокислоты в позиции 876 полипептида андрогенного рецептора. В некоторых вариантах осуществления применяемая в способе модификация полипептида AR представляет собой замену фенилаланина на аминокислоту, выбранную среди лейцина, изолейцина, валина, аланина, глицина, метионина, серина, треонина, цистеина, триптофана, лизина, аргинина, гистидина, пролина, тирозина, аспарагина, глутамина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты, в аминокислотной позиции 876 полипептида андрогенного рецептора. В некоторых вариантах осуществления применяемая в способе модификация полипептида AR представляет собой замену фенилаланина на аминокислоту, выбранную среди глицина, аланина, валина, лейцина и изолейцина, в аминокислотной позиции 876 полипептида андрогенного рецептора. В некоторых вариантах осуществления применяемая в способе модификация полипептида AR представляет собой замену фенилаланина на лейцин в аминокислотной позиции 876 полипептида андрогенного рецептора.

В некоторых вариантах осуществления используемая в способе клетка испытывает недостаточность по экспрессии андрогенного рецептора дикого типа, экспрессирует низкий уровень андрогенного рецептора дикого типа или экспрессирует модифицированный рецептор AR. В некоторых вариантах осуществления клетка выбрана среди HeLa, CV1, COS7, HepG2, HEK-293, DU145, PC3, TSY-PR1, LNCaP, CWR, VCaP и LAPC4. В некоторых вариантах осуществления клетка содержит репортерный ген, функционально связанный с чувствительным к андрогену промотором. В некоторых вариантах осуществления активность

полипептида AR определяют путем анализа экспрессии репортерного гена. В некоторых вариантах осуществления промотор содержит чувствительный к андрогену элемент. В некоторых вариантах осуществления чувствительный к андрогену элемент представляет собой 4XARE или элемент пробазина. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой пробазин, простатспецифический антиген, MMTV LTR, FASN, STEAP4, TMPRSS2, ORM1 или промотор NKX3.1. В некоторых вариантах осуществления репортерный ген кодирует белок, выбранный среди люциферазы, флуоресцентного белка, биолюминесцентного белка или фермента.

В настоящем документе в некоторых вариантах осуществления описан выделенный полипептид андрогенного рецептора или его вариант, имеющий активность андрогенного рецептора, содержащий модификацию в аминокислотной позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, причем модификация придает резистентность к антагонисту андрогенного рецептора на модифицированном полипептиде андрогенного рецептора или варианте. В некоторых вариантах осуществления модификация содержит замену аминокислоты в позиции 876 в сравнении с андрогенным рецептором дикого типа, представленным в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления замена представляет собой F876L. В некоторых вариантах осуществления модификация содержит делецию аминокислотной позиции 876. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид AR имеет последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид AR представляет собой рекомбинантный полипептид. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид AR содержит замену аминокислоты в позиции 876 в сравнении с андрогенным рецептором дикого типа, представленным в SEQ ID NO: 1, и одну или более дополнительных аминокислотных замен. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид AR содержит замену аминокислоты в позиции 876, которая представляет собой F876L. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид AR содержит одну или более дополнительных

аминокислотных замен, выбранных среди одной или более аминокислотных замен, связанных с кастрационно-резистентным раком предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления одну или более дополнительных аминокислотных замен выбирают среди одной или более замен в аминокислотных позициях 701, 741, 874 и 877 в сравнении с андрогенным рецептором дикого типа, представленным в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления одну или более дополнительных аминокислотных замен выбирают среди T877A, W741C, W741L, W741R, L701H и H874Y. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид AR представляет собой рекомбинантный полипептид. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид AR содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 5, или вариант, который имеет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с полипептидом, имеющим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, причем аминокислота в позиции 876 не является фенилаланином.

В настоящем документе в некоторых вариантах осуществления описана выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая модифицированный полипептид андрогенного рецептора, предложенный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой молекулу ДНК или РНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой молекулу кДНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой продукт ПЦР-амплификации. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой рекомбинантную молекулу. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой синтетическую молекулу. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит последовательность нуклеиновых кислот, представленную в SEQ ID NO: 19, или вариант, который имеет по меньшей мере или по меньшей мере приблизительно 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%,

96%, 97%, 98%, 99% или более идентичность последовательности с полипептидом, имеющим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, причем кодон нуклеиновой кислоты, кодирующий аминокислоту в позиции 876, не кодирует фенилаланин.

В настоящем документе в некоторых вариантах осуществления представлен вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей модифицированный полипептид андрогенного рецептора, предложенный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вирусный или плазмидный вектор. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота функционально связана с промотором. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой конститутивный или индуцируемый промотор. В настоящем документе в некоторых вариантах осуществления описана клетка-хозяин, содержащая вектор. В некоторых вариантах осуществления клетка представляет собой прокариотическую клетку или эукариотическую клетку. В настоящем документе в некоторых вариантах осуществления описан мутантный полипептид AR, экспрессируемый клеткой-хозяином.

В настоящем документе в некоторых вариантах осуществления описана фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор андрогенного рецептора третьего поколения, выявленный способами, предложенными в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый эксципиент. В настоящем документе в некоторых вариантах осуществления описаны примеры применения ингибитора андрогенного рецептора третьего поколения, выявленного способами, предложенными в настоящем документе, для производства лекарственного средства. В настоящем документе в некоторых вариантах осуществления описаны способы лечения, включающие введение требующему лечения субъекту терапевтически эффективного количества фармацевтической композиции, причем композиция содержит подходящий фармацевтический носитель. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется AR-опосредованный рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы, рак молочной железы, рак печени (т.е. гепатоцеллюлярный рак) или рак

мочевого пузыря. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой кастрационно-резистентный рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления у субъекта экспрессируется мутантный AR. В некоторых вариантах осуществления мутантный AR содержит замену или делецию аминокислоты в аминокислотной позиции 876 в полипептиде андрогенного рецептора. В некоторых вариантах осуществления замена представляет собой F876L. В некоторых вариантах осуществления антагонист AR третьего поколения вводят с дополнительным терапевтическим агентом. В некоторых вариантах осуществления антагонист AR третьего поколения и дополнительный терапевтический агент вводят последовательно, одновременно или попеременно. В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент выбирают среди гормонов, агонистов или антагонистов рецептора гормонов, кортикостероидов, противорвотных агентов, анальгетиков, противораковых агентов, противовоспалительных агентов, ингибиторов киназ, ингибиторов HSP90, ингибиторов гистондеацетилазы (HDAC). В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический агент представляет собой агонист или антагонист гонадотропин-высвобождающего гормона (GnRH). В некоторых вариантах осуществления агонист GnRH представляет собой лейпролид, бусерелин или гозерелин.

В настоящем документе в некоторых вариантах осуществления описан микрочип, содержащий мутантный полипептид AR, предложенный в настоящем документе, или нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный полипептид AR, предложенный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид AR содержит модификацию по аминокислоте 876. В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой аминокислотную замену, которая представляет собой F876L.

В настоящем документе в некоторых вариантах осуществления описаны наборы, содержащие мутантный полипептид AR, предложенный в настоящем документе. В настоящем документе в некоторых вариантах осуществления описан набор, содержащий



выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую мутантный полипептид AR, предложенный в настоящем документе. В настоящем документе в некоторых вариантах осуществления описаны наборы, содержащие один или более реагентов для детекции мутантного полипептида AR, содержащего модификацию в аминокислотной позиции 876. В настоящем документе в некоторых вариантах осуществления описан набор, содержащий один или более реагентов для детекции нуклеиновой кислоты, кодирующей мутантный полипептид AR, содержащий модификацию в аминокислотной позиции 876. В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой аминокислотную замену, которая представляет собой F876L. В некоторых вариантах осуществления набор содержит пару олигонуклеотидных праймеров, которые фланкируют область нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислоту 876 полипептида AR. В некоторых вариантах осуществления набор содержит олигонуклеотидный праймер, который (a) связывается с нуклеиновой кислотой, кодирующей модифицированный рецептор AR, который модифицирован в аминокислотной позиции 876; и (b) не связывается с нуклеиновой кислотой, кодирующей AR дикого типа, имеющий фенилаланин в аминокислотной позиции 876. В некоторых вариантах осуществления наборы содержат микрочип, содержащий (a) модифицированный полипептид AR, имеющий модификацию, которая представляет собой F876S, или его часть, содержащую модификацию, которая представляет собой F876S; или (b) молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую мутантный полипептид AR, имеющий модификацию, которая представляет собой F876S, или его часть, содержащую модификацию, которая представляет собой F876S.

В настоящем документе в некоторых вариантах осуществления описаны системы детекции модифицированного AR, который является резистентным к ингибированию антагонистом AR первого или второго поколения у субъекта, содержащие: (a) образец, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид AR, от субъекта; и (b) микроматрицу, содержащую нуклеиновую кислоту, кодирующую мутантный полипептид AR или его часть, который модифицирован в аминокислотной позиции, соответствующей

аминокислотной позиции 876 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления микроматрица содержится на микрочипе. В настоящем документе в некоторых вариантах осуществления описаны системы детекции модифицированного AR, который является резистентным к ингибированию антагонистом AR первого или второго поколения у субъекта, содержащие: (a) образец, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид AR, от субъекта; и (b) специфичный к последовательности нуклеиновой кислоты зонд, причем специфичный к последовательности нуклеиновой кислоты зонд: (i) связывается с нуклеиновой кислотой, кодирующей модифицированный AR, который модифицирован в аминокислотной позиции 876; и (ii) не связывается с нуклеиновой кислотой, кодирующей AR дикого типа, имеющий фенилаланин в аминокислотной позиции 876. В настоящем документе в некоторых вариантах осуществления описаны системы детекции модифицированного AR, который является резистентным к ингибированию антагонистом AR первого или второго поколения у субъекта, содержащие: (a) образец, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид AR, от субъекта; и (b) пару олигонуклеотидных праймеров, которые фланкируют область нуклеиновой кислоты, кодирующую аминокислоту 876 полипептида AR.

В настоящем документе в некоторых вариантах осуществления описаны выделенные антитела, которые связываются с модифицированным полипептидом андрогенного рецептора, предложенным в настоящем документе, причем антитело не связывается или связывается с меньшей аффинностью с полипептидом AR дикого типа, имеющим последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления модифицированный полипептид AR содержит модификацию по аминокислоте 876. В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой аминокислотную замену, которая представляет собой F876L.

В настоящем документе в некоторых вариантах осуществления представлены способы поддерживающей терапии у пациента, имеющего рак, включающие: (a) применение к пациенту схемы

поддерживающей терапии, включающей введение терапевтически эффективной дозы антагониста AR первого или второго поколения; и (b) контроль пациента через заданные интервалы времени в течение курса схемы поддерживающей терапии, чтобы определить, есть ли у субъекта мутация в эндогенном гене, кодирующем рецептор AR, которая приводит к модификации в аминокислотной позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления контроль включает: тестирование образца, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид AR, от субъекта, чтобы определить, модифицирован ли кодированный полипептид AR в аминокислотной позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают прекращение схемы поддерживающей терапии при наличии у субъекта мутации или продолжение схемы поддерживающей терапии при отсутствии у субъекта модификации. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают введение антагониста AR третьего поколения, который ингибирует модифицированный AR при наличии у субъекта модификации. В некоторых вариантах осуществления модификация в полипептиде AR представляет собой F876L. В некоторых вариантах осуществления антагонист AR первого или второго поколения ингибирует полипептид AR дикого типа за счет конкурентного антагонизма. В некоторых вариантах осуществления антагониста AR второго поколения выбирают среди ARN-509, энзалутамида (MDV3100) и RD162. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы, рак молочной железы, рак мочевого пузыря или гепатоцеллюлярный рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой кастрационно-резистентный рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления заданный интервал времени представляет собой каждую неделю, каждый месяц, каждые 2 месяца, каждые 3 месяца, каждые 4 месяца, каждые 5 месяцев,

каждые 6 месяцев, каждые 7 месяцев, каждые 8 месяцев, каждые 9 месяцев, каждые 10 месяцев, каждые 11 месяцев или каждый год.

Другие цели, особенности и преимущества полипептидов, нуклеиновых кислот, соединений, способов и композиций, описанных в настоящем документе, станут понятны из представленного ниже подробного описания. Однако следует понимать, что подробное описание и конкретные примеры, хотя они и указывают конкретные варианты осуществления, приведены только в качестве примера, поскольку различные изменения и модификации в рамках сущности и объема настоящего описания будут очевидны специалистам в данной области из данного подробного описания.

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ РИСУНКОВ**

На **Фиг. 1** показана резистентность к ARN-509 и энзалутамиду. (A) Пролиферация клеток LNCaP и LNCaP ARN-509r1. Клетки LNCaP и LNCaP ARN-509r1 культивировали в присутствии среды с пониженным содержанием гормона в течение 2 дней с последующим добавлением лиганда. Пролиферацию количественно оценивали с помощью люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo® (Promega Corp.) после обработки соединением в течение 7 дней. (B) Анализ на пролиферацию агониста для клеток линий LNCaP/AR-Luc, LNCaP/AR-Luc ENZr2 и LNCaP ARN-509r2. Клетки культивировали в присутствии среды с пониженным содержанием гормона в течение 2 дней с последующей обработкой лигандом в течение 7 дней. Пролиферацию количественно оценивали с помощью люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo®. (C) Анализ на пролиферацию антагониста для клеток родительских линий и клеток линий, резистентных к антагонистам андрогенного рецептора 2-го поколения. Клетки культивировали в присутствии среды с пониженным содержанием гормона в течение 2 дней с последующей обработкой лигандом в присутствии R1881 (конечная концентрация = 100 пМ). Пролиферацию количественно оценивали с помощью люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo. (D) Схематическое представление структуры домена AR, на котором показаны аминокислоты, мутация по которым приводит к изменению активности лигандов при кастрационно-резистентном раке

предстательной железы (CRPC).

На **фиг. 2** показаны уровни AR в клетках родительских линий и клетках линий, резистентных к антагонистам андрогенного рецептора 2-го поколения. Белковые экстракты создавали из клеток, культивированных в среде с пониженным содержанием гормона в течение 3 дней. Уровни белка AR анализировали также с помощью вестерн-блоттинга. Уровни AR оценивали количественно, нормировали на  $\alpha$ -тубулин и выражали относительно клеток LNCaP.

На **фиг. 3** показано, что ARN-509 и энзалутамид являются частичными агонистами AR F876L. (A) Активность ARN-509 и энзалутамида в качестве агониста и антагониста транскрипции на AR дикого типа или F876L. Измеряли транскрипционную активацию репортера 4X ARE-люциферазы в присутствии повышающейся концентрации соединения в отсутствие или в присутствии 1 нМ R1881 (для AR дикого типа) или 5 нМ R1881 (для AR F876L). (B) Измеряли активность в качестве агониста транскрипции антиандрогенов 1-го и 2-го поколений и преднизона на AR-зависимой активации репортера 4X ARE-люциферазы для AR дикого типа и AR F876L, T877A, F876L/T877A, L701H, H874Y и W741C AR во временно трансфицированных клетках HepG2.

На **фиг. 4** показана активность ARN-509 и энзалутамида в качестве агониста и антагониста на VP16-AR (A) и VP16-AR F876L (B). Контролировали активность репортера 4X ARE-люциферазы в присутствии повышающейся концентрации соединения в отсутствие или в присутствии 90 пМ R1881 (для VP16-AR дикого типа) или 1 нМ R1881 (для VP16-AR F876L).

На **фиг. 5** показаны результаты конкурентного анализа связывания AR дикого типа (A) в сравнении с AR F876L (B). Анализ связывания с  $^3\text{H}$ -R1881 проводили в экстрактах клеток PC3, экспрессирующих AR дикого типа или AR F876L. Данные представляют результаты 3 независимых экспериментов. Интервалы ошибок, СПС;  $n = 2$ .

На **фиг. 6** показаны уровни AR в клеточных линиях с избыточной экспрессией AR. Белковые экстракты получали из клеток LNCaP, LNCaP/AR(cs), LNCaP/SR $\alpha$ F876L и LNCaP/pCDNAF876L, культивированных в среде с пониженным содержанием гормона в

течение 3 дней. Уровни белка AR анализировали также с помощью вестерн-блоттинга. Уровни AR оценивали количественно, нормировали на актин и выражали относительно клеток LNCaP.

На **фиг. 7** показано, что AR F876L придает ARN-509 и энзалутамиду частичную активность в качестве агониста. (А) Пролиферация клеток LNCaP/AR(cs) и LNCaP/SR $\alpha$ F876L. Клетки культивировали в присутствии среды с пониженным содержанием гормона в течение 2 дней с последующей обработкой лигандом в течение 7 дней. Пролиферацию количественно оценивали с помощью люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo. (В) Пролиферация клеток LNCaP/AR(cs), LNCaP/SR $\alpha$ F876L и LNCaP/pCDNAF876L. Клетки культивировали в среде с пониженным содержанием гормона в течение 2 дней с последующей обработкой лигандом в течение 7 дней. Для анализов на активность в качестве антагонистов добавляли соединения в присутствии 200 пМ R1881 (конечная концентрация 100 пМ). Пролиферацию количественно оценивали с помощью люминесцентного анализа CellTiter-Glo®.

На **фиг. 8** показаны результаты анализа взаимодействия N/C-концов AR. Индуцированное лигандом взаимодействие N/C-концов контролировали посредством двухгибридного анализа на клетках HerG2. Антагонисты анализировали при 8 мкМ, R1881 – при 1 нМ.

На **фиг. 9** показан результат анализа AR с иммунопреципитацией хроматина (ChIP) для генов-мишеней AR. Анализы ChIP проводили на клетках LNCaP/AR(cs) и LNCaP/SR $\alpha$ F876L, инкубированных в среде с пониженным содержанием гормона в течение 3 дней с последующей обработкой лигандом в течение 4 часов. Клетки обрабатывали антагонистом 10 мкМ в присутствии или в отсутствие 1 нМ R1881. Данные для AR и неспецифического контроля IgG представлены в виде процентной доли вводных данных.

На **фиг. 10** показано, что мутация AR F876L придает резистентность к ARN-509 и энзалутамиду *in vivo*. Опухолевые ксенотрансплантаты LNCaP/AR(cs) и LNCaP/SR $\alpha$ F876L. Кастрированные самцы мышей с опухолями ежедневно получали лечение несущей средой или 30 мг/кг/день соединения. Рост

опухоли для каждой группы представлен в виде среднего объема опухоли  $\pm$  СПС.

На **фиг. 11** показан график дозирования для открытого исследования фазы 1/2 по безопасности, фармакокинетике и подтверждению правильности концепции ARN-509 у пациентов с прогрессирующим метастазирующим кастрационно-резистентным раком предстательной железы на поздних стадиях.

На **фиг. 12** показан результат выявления AR-F876L у пациентов, получавших лечение ARN-509. (А) Ответ простатспецифического антигена (ПСА) у 29 пациентов, проанализированных на мутацию F876L. Конечная точка линии ответа ПСА представляет собой момент времени, в который проводили скрининг плазмы пациента на мутацию F876L с применением анализа BEAMing. Применяемую в данном исследовании плазму исходно собирали, чтобы определить фармакокинетику ARN-509, и как таковые образцы не готовили с применением методологии для достижения максимального отношения цодНК к ДНК лимфоцитов. (В) Ответ ПСА у пациента, положительного на F876L. Ответ ПСА у пациента 7 на указанном цикле лечения. Циркулирующую плазму анализировали на F876L в указанные стрелками моменты времени. Образцы плазмы, не содержащие обнаружимого количества мутанта, отмечены как «д.т.», наличие мутации F876L представлено как «м.». Образец плазмы считали положительным на мутацию, если процентная доля гранул с мутантом превышала пороговое значение (0,02%), а число мутантных копий оценивали  $\geq 0,5$  (число геномных эквивалентов в образце плазмы  $\times$  доля гранул с мутантом =  $\geq 0,5$ ).

На **фиг. 13** показано относительное количество простатспецифического антигена (ПСА), обнаруженное в ходе клинического исследования фазы 1/2 ARN-509 у каждого из трех пациентов (7, 10 и 13), имеющих обнаружимые соматические мутации F876L в AR. Стрелки указывают на образец, в котором была (-и) обнаружена (-ы) мутация (-и).

#### **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ**

##### **НЕКОТОРАЯ ТЕРМИНОЛОГИЯ**

Если не указано иное, все технические и научные термины,

применяемые в настоящем документе, имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в области техники, к которой относится объект изобретения, представленный в пунктах формулы изобретения. Все патенты, заявки на патенты, опубликованные заявки и публикации, последовательности GENBANK, веб-сайты и другие опубликованные материалы, на которые даны ссылки в тексте полного описания, представленного в настоящем документе, если не указано иное, полностью включены в настоящий документ путем ссылки. В случае наличия множества определений для терминов, представленных в настоящем документе, преваляющими являются приведенные в данном разделе. При предоставлении ссылки на URL или другой такой идентификатор или адрес следует понимать, что такие идентификаторы могут изменяться и конкретная доступная в сети интернет информация может появляться и исчезать, однако эквивалентная информация известна и может быть легко доступна, например, при поиске в сети интернет и/или в соответствующих базах данных. Ссылки на них подтверждают доступность и публичное распространение такой информации. По существу процедуры для культивации клеток, инфицирования клеток, наработки антител и способы молекулярной биологии являются способами, широко применяемыми в данной области. Такие стандартные методики можно найти, например, в справочном руководстве, таком как, например, Sambrook et al. (2000 г.) и Ausubel et al. (1994 г.).

В рамках настоящего документа применение форм единственного числа включает ссылки на множественное число, если из контекста четко не следует иное. В настоящей заявке применение формы единственного числа включает объекты во множественном числе, если явным образом не указано иное. В рамках настоящего документа применение союза «или» означает «и/или», если не указано иное. Более того, применение термина «включая», а также других форм (например, «включают», «включает» и «включал») не имеет ограничительного характера.

В настоящем документе диапазоны и количества могут выражаться как «приблизительно» конкретное значение или диапазон. «Приблизительно» также включает точное количество.



Таким образом, «приблизительно 5 мкг» означает «приблизительно 5 мкг», а также «5 мкг». По существу термин «приблизительно» включает количество, которое можно ожидать в пределах погрешности эксперимента.

В настоящем документе термин «полипептид андрогенного рецептора (AR)» относится к любому белку или полипептиду андрогенного рецептора, включая, без ограничений, полученный рекомбинантным способом белок, полученный синтетическим способом белок, нативный белок андрогенного рецептора и белок андрогенного рецептора, экстрагированный из клеток или тканей. Полипептид AR включает родственные полипептиды от разных видов, включая, без ограничений, животных человеческого и нечеловеческого происхождения. Полипептиды AR нечеловеческого происхождения включают, без ограничений, полипептиды AR отличных от человека приматов (например, шимпанзе и человекообразных обезьян), представителей мышиных (например, мышь и крыса), псовых (собака), кошачьих (кошка), заячьих (кролик), птичьих (птица), бычьих (корова), овечьих (овца), свиных (свинья), лошадиных (лошадь), рыбьих (рыба), лягушачьих (лягушка), а также полипептидов AR других млекопитающих и немлекопитающих. Примеры полипептидов AR включают, например, SEQ ID NOS: 1-17. Полипептид андрогенного рецептора включает андрогенный рецептор дикого типа, изоформы аллельных вариантов, соматические мутации, включая присутствующие в опухолях, синтетические молекулы из нуклеиновых кислот, выделенный из человеческих тканей и клеток белок, а также их модифицированные формы. Предложенные в настоящем документе полипептиды андрогенного рецептора могут быть дополнительно модифицированы путем модификации первичной аминокислотной последовательности, путем делеции, добавления или замены одной или более аминокислот. Полипептид андрогенного рецептора включает любой полипептид AR или его часть, имеющую активность AR, включая, например, слитые полипептиды лиганд-связывающего домена AR и гетерологического ДНК-связывающего домена.

В настоящем документе термины «мутантный полипептид андрогенного рецептора (AR)», «мутантный белок AR»,

«модифицированный полипептид AR» или «модифицированный белок AR» применяются в настоящем документе как взаимозаменяемые и относятся к полипептиду андрогенного рецептора, который модифицирован по одной или более аминокислотным позициям. Примеры модификаций включают, без ограничений, замены, делеции или добавления аминокислот.

В настоящем документе термин «антиандрогенный» относится к группе соединений-антагонистов рецептора гормона, которые способны предотвращать или ингибировать биологические воздействия андрогенов в нормально чувствительных тканях организма.

В настоящем документе термины «ингибитор AR» и «антагонист AR» применяются как взаимозаменяемые в настоящем документе и относятся к агенту, который ингибирует или снижает по меньшей мере один тип активности полипептида AR. Примеры типов активности полипептида AR включают, без ограничений, связывание с коактиватором, связывание с ДНК, связывание с лигандом или ядерную транслокацию.

В настоящем документе термин «полный антагонист» относится к антагонисту, который в эффективной концентрации по существу полностью ингибирует активность полипептида AR. В настоящем документе термин «частичный антагонист» относится к антагонисту, который способен частично ингибировать активность полипептида AR, но который даже в наивысшей концентрации не является полным антагонистом. Под термином «по существу полностью» понимается ингибирование активности полипептида AR по меньшей мере приблизительно на 80%, по меньшей мере приблизительно на 90%, по меньшей мере приблизительно на 95%, по меньшей мере приблизительно на 96%, по меньшей мере приблизительно на 97%, по меньшей мере приблизительно на 98%, по меньшей мере приблизительно на 99% или более.

В настоящем документе термины «ингибитор AR третьего поколения» и «антагонист AR третьего поколения» применяются как взаимозаменяемые в настоящем документе и относятся к агенту, который ингибирует по меньшей мере один тип активности полипептида AR, содержащего одну или более аминокислотных

модификаций, которые придают резистентность к ингибированию антагонистом AR второго поколения, таким как, например, ARN-509 (номер CAS 956104-40-8), энзалутамид (также известный как MDV3100; номер CAS: 915087-33-1) или RD162 (номер CAS 915087-27-3). В некоторых вариантах осуществления ингибитор AR третьего поколения ингибирует по меньшей мере один тип активности полипептида AR дикого типа, такой как, без ограничений, связывание с коактиватором, связывание с ДНК, связывание с лигандом или ядерная транслокация. В некоторых вариантах осуществления ингибитор AR третьего поколения ингибирует активность мутантного полипептида AR, которая также ингибируется ингибитором AR первого или второго поколения.

В настоящем документе фраза «резистентный к ингибированию» относится к снижению способности антагониста AR ингибировать (т.е. выступать в качестве антагониста) один или более типов активности модифицированного полипептида AR в сравнении с полипептидом AR дикого типа. Например, антагонист AR является менее эффективным при ингибировании модифицированного полипептида AR в сравнении с полипептидом AR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления сниженная антагонистическая активность в отношении модифицированного полипептида AR составляет приблизительно 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% в сравнении с антагонистической активностью в отношении полипептида AR дикого типа. Примеры типов активности полипептида AR включают, без ограничений, связывание с коактиватором, связывание с ДНК, связывание с лигандом или ядерную транслокацию. В некоторых вариантах осуществления антагонист AR неспособен к связыванию или связывается со сниженной аффинностью с модифицированным полипептидом AR.

В настоящем документе термины «ингибитор AR второго поколения» и «антагонист AR второго поколения» применяются как взаимозаменяемые в настоящем документе и относятся к агенту, который показывает активность полного антагониста к полипептиду AR дикого типа, но не показывает активность полного антагониста к полипептиду AR, содержащему одну или более аминокислотных

модификаций, которые придают резистентность к ингибированию, таких как модификация в аминокислотной позиции 876 в полипептиде AR. В некоторых вариантах осуществления ингибитор AR второго поколения не показывает активность полного антагониста к полипептиду AR, имеющему аминокислотную замену, которой является F876L. В некоторых вариантах осуществления ингибитор AR второго поколения индуцирует активность AR (т.е. является агонистом AR) при концентрациях, которые эквивалентны или превышают концентрацию, необходимую для ингибирования AR дикого типа. Ингибиторы AR второго поколения отличаются от ингибиторов AR первого поколения, таких как бикалутамид и флутамид, тем, что ингибиторы AR второго поколения функционируют как полные антагонисты в клетках, экспрессирующих повышенные уровни AR, таких как, например, клетки кастрационно-резистентного рака предстательной железы (CRPC). Ингибиторы AR первого поколения, такие как бикалутамид и флутамид, при CRPC функционируют как агонисты. Примеры ингибиторов AR второго поколения включают ARN-509, энзалутамид и RD162. В некоторых вариантах осуществления ингибитор AR второго поколения представляет собой агонист мутантного полипептида AR, предложенного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления ингибитор AR второго поколения связывается с полипептидом AR в сайте связывания лиганда полипептида AR или рядом с ним.

Термин «нуклеиновая кислота» относится к дезоксирибонуклеотидам, дезоксирибонуклеозидам, рибонуклеозидам или рибонуклеотидам и их полимерам либо в одноцепочечной, либо в двухцепочечной форме. Если нет конкретных ограничений, термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги природных нуклеотидов, которые имеют свойства связывания, аналогичные нуклеиновой кислоте, на которую дана ссылка, и метаболизируются образом, аналогичным встречающимся в естественных условиях нуклеотидам. Если нет иных конкретных ограничений, термин также относится к аналогам олигонуклеотидов, включая ПНК (пептидонуклеиновая кислота), аналогам ДНК, применяемым в антисмысловой технологии (например,

тиофосфаты, фосфорамидаты). Если не указано иное, конкретная последовательность нуклеиновых кислот также неявным образом охватывает ее консервативно модифицированные варианты (включая, без ограничений, замены вырожденных кодонов) и комплементарные последовательности, а также явным образом указанную последовательность. В частности, замены вырожденных кодонов достигают путем создания последовательностей, в которых третья позиция одного или более выбранных (или всех) кодонов заменяется на остатки со смешанными основаниями и/или дезоксиинозиновые остатки (Batzer et al. (1991 г.) *Nucleic Acid Res.* 19:5081; Ohtsuka et al. (1985 г.) *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608; и Cassol et al. (1992 г.) *Mol. Cell. Probes* 6, 327-331; и Rossolini et al. (1994 г.) *Mol. Cell. Probes* 8:91-98).

Термин «аминокислота» относится к встречающимся в естественных условиях и не встречающимся в естественных условиях аминокислотам, а также к аналогам аминокислот и миметикам аминокислот, которые функционируют аналогично встречающимся в естественных условиях аминокислотам. Кодированными в естественных условиях аминокислотами являются 20 распространенных аминокислот (аланин, аргинин, аспарагин, аспарагиновая кислота, цистеин, глутамин, глутаминовая кислота, глицин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, фенилаланин, пролин, серин, треонин, триптофан, тирозин и валин), а также пиролизин и селеноцистеин. Термин «аналоги аминокислот» относится к агентам, которые имеют такую же базовую химическую структуру, как и встречающаяся в естественных условиях аминокислота, т.е. содержат  $\alpha$ -углерод, связанный с водородом, карбоксильную группу, аминогруппу и R-группу, такую как гомосерин, норлейцин, метионинсульфоксид, метионинметилсульфоний. Такие аналоги имеют модифицированные R-группы (такие как норлейцин) или модифицированные пептидные структуры, но сохраняют такую же базовую химическую структуру, как и встречающаяся в естественных условиях аминокислота.

Ссылки на аминокислоты в настоящем документе даны с использованием либо их распространенных известных трехбуквенных обозначений, либо однобуквенных символов, рекомендованных

Комиссией по биохимической номенклатуре ИЮПАК-ИЮБ. Аналогичным образом, ссылки на нуклеотиды даны с использованием их общепринятых однобуквенных кодов.

Термины «полипептид», «пептид» и «белок» в настоящем документе применяются как взаимозаменяемые и относятся к полимеру из аминокислотных остатков. Термины применимы как к полимерам из встречающихся в естественных условиях аминокислот, так и к аминокислотным полимерам, в которых один или более из аминокислотных остатков представляет собой не встречающуюся в естественных условиях аминокислоту, например аналог аминокислоты. Термины охватывают аминокислотные цепи любой длины, включая полноразмерные белки, причем аминокислотные остатки связаны ковалентными пептидными связями.

В настоящем документе термин «модификация» относится к модификации последовательности аминокислот полипептида или последовательности нуклеотидов в молекуле нуклеиновой кислоты и включает делеции, вставки и замены аминокислот и нуклеотидов соответственно.

Для определения процентной доли гомологии двух аминокислотных последовательностей или двух нуклеиновых кислот последовательности можно выровнять для целей оптимального сравнения (например, в последовательность первой аминокислотной или нуклеотидной последовательности вводят гэпы для оптимального выравнивания со второй аминокислотной или нуклеотидной последовательностью). Затем можно выполнить сравнение аминокислотных остатков или нуклеотидов в соответствующих аминокислотных позициях или нуклеотидных позициях. Когда позиция в первой последовательности занята тем же аминокислотным остатком или нуклеотидом, что и соответствующая позиция во второй последовательности, молекулы являются идентичными по этой позиции. Процентная доля гомологии между двумя последовательностями представляет собой функцию числа идентичных позиций, общих для последовательностей (т.е. % гомологии = число идентичных позиций/полное число позиций (например, перекрывающихся позиций)×100). В некоторых вариантах

осуществления две последовательности имеют одинаковую длину.

Для определения процентной доли гомологии между двумя последовательностями применяют алгоритм, описанный в публикации Karlin and Altschul (1990 г.) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268, с модификациями из публикации Karlin and Altschul (1993 г.) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877. Такой алгоритм встроен в программы NBLAST и XBLAST, описанные в публикации Altschul et al. (1990 г.) *J. Mol. Biol.* 215:403-410. Поиск нуклеотидов по алгоритму BLAST проводят с использованием программы NBLAST с параметрами score = 100, wordlength = 12 для получения нуклеотидных последовательностей, гомологичных молекулам нуклеиновой кислоты, описанным или раскрытым в настоящем документе. Поиск белков по алгоритму BLAST проводят в программе XBLAST с параметрами score = 50, wordlength = 3. Для получения выравниваний с гэпами для целей сравнения используют алгоритм Gapped BLAST, описанный в публикации Altschul et al. (1997 г.) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST применяют параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST). Дополнительная информация представлена на веб-сайте Национального центра биотехнологической информации (по адресу [ncbi.nlm.nih.gov](http://ncbi.nlm.nih.gov) в сети интернет). Белки, подходящие для применения в способах, описанных в настоящем документе, также включают белки, имеющие от 1 до 15 изменений аминокислот, например 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 аминокислотных замен, делеций или добавлений, в сравнении с аминокислотной последовательностью любого белка, описанного в настоящем документе. В других вариантах осуществления измененная аминокислотная последовательность является по меньшей мере на 75% идентичной, например на 77%, 80%, 82%, 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичной аминокислотной последовательности любого белка, описанного в настоящем документе. Такие белки с вариантами последовательности являются подходящими для способов, описанных в настоящем документе при условии, что измененная аминокислотная последовательность сохраняет достаточную

биологическую активность для обеспечения функциональности в композициях и способах, описанных в настоящем документе. При выполнении аминокислотных замен замены должны быть консервативными аминокислотными заменами. Среди распространенных аминокислот, например, «консервативной аминокислотной заменой» может быть замена среди аминокислот внутри каждой из следующих групп: (1) глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин, (2) фенилаланин, тирозин и триптофан, (3) серин и треонин, (4) аспарат и глутамат, (5) глутамин и аспарагин и (6) лизин, аргинин и гистидин. Специалистам в данной области будет понятно, что по существу отдельные аминокислотные замены в незначимых областях полипептида по существу не изменяют биологическую активность (см., например, Watson *et al.* *Molecular Biology of the Gene*, 4-я редакция, 1987 г., The Benjamin/Cummings Pub. co., с. 224). Таблица BLOSUM62 представляет собой матрицу аминокислотных замен, полученную из приблизительно 2000 локальных множественных выравниваний сегментов белковых последовательностей, представляющих высококонсервативные области более чем 500 групп родственных белков (Henikoff *et al.* (1992 г.) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10915-10919). Соответственно, частоты замен из BLOSUM62 применяют, чтобы определить консервативные аминокислотные замены, которые в некоторых вариантах осуществления вводят в аминокислотные последовательности, описанные или раскрытые в настоящем документе. Хотя аминокислотные замены можно конструировать на основе только химических свойств (как описано выше), фраза «консервативная аминокислотная замена» предпочтительно относится к замене, представленной значением BLOSUM62, превышающим -1. Например, аминокислотная замена является консервативной, если замена характеризуется значением BLOSUM62, равным 0, 1, 2 или 3. В соответствии с данной системой предпочтительные консервативные аминокислотные замены характеризуются значением BLOSUM62, равным по меньшей мере 1 (например, 1, 2 или 3), в то время как более предпочтительные консервативные аминокислотные замены характеризуются значением BLOSUM62, равным по меньшей мере 2 (например, 2 или 3).



В настоящем документе термин «соответствующие остатки» относится к остаткам, попадающим в выровненные локусы. Родственные или варианты полипептиды выравнивают любым способом, известным специалистам в данной области. Такие способы, как правило, максимизируют совпадения и включают способы, такие как применение выравниваний вручную и с применением множества доступных программ для выравнивания (например, BLASTP), а также другие способы, известные специалистам в данной области. Выравнивая последовательности полипептидов, специалист в данной области может выявить соответствующие остатки, применяя в качестве указателей консервативные и идентичные аминокислотные остатки. Соответствующие позиции также могут быть основаны на структурных выравниваниях, например, с применением выравниваний структуры белка с помощью компьютерного моделирования. В других случаях можно выявить соответствующие области.

В настоящем документе ссылки на «аллельный вариант» или «аллельную вариацию» относятся к полипептиду, кодируемому геном, который отличается от эталонной формы гена (т.е. кодируется аллелем). Как правило, эталонная форма гена кодирует форму дикого типа и/или преобладающую форму полипептида в популяции или одном стандартном члене вида. Как правило, аллельные варианты, которые включают варианты между и среди видов, имеют степень аминокислотной идентичности по меньшей мере 80%, 90% или более с формой дикого типа и/или преобладающей формой полипептида из того же вида; степень идентичности зависит от гена и от того, проводится ли сравнение внутри вида или между видами. По существу внутривидовые аллельные варианты имеют идентичность по меньшей мере приблизительно 80%, 85%, 90% или 95% или более с формой дикого типа и/или преобладающей формой, включая идентичность 96%, 97%, 98%, 99% или более с формой дикого типа и/или преобладающей формой полипептида.

В настоящем документе термин «видовые варианты» относится к вариантам одного и того же полипептида между и среди видов. По существу межвидовые варианты имеют идентичность по меньшей

мере приблизительно 60%, 70%, 80%, 85%, 90% или 95% или более с формой дикого типа и/или преобладающей формой другого вида, включая идентичность 96%, 97%, 98%, 99% или более с формой дикого типа и/или преобладающей формой полипептида.

В настоящем документе термины «лечить», «проведение лечения», «лечение» и другие грамматические эквиваленты включают ослабление, смягчение или облегчение одного или более симптомов заболевания или состояния, облегчения, профилактики или уменьшения выраженности, степени тяжести или частоты одного или более дополнительных симптомов заболевания или состояния, облегчения или профилактики лежащих в основе метаболических причин одного или более симптомов заболевания или состояния, ингибирования заболевания или состояния, такого как, например, остановка развития заболевания или состояния, облегчения течения заболевания или состояния, обращения развития заболевания или состояния, облегчения состояния, вызванного заболеванием или состоянием, или ингибирование симптомов заболевания или состояния профилактически и/или терапевтически. В не имеющем ограничительного характера примере для пользы профилактики описанное в настоящем документе соединение-ингибитор AR третьего поколения вводят лицу с риском развития конкретного расстройства, предрасположенного к развитию конкретного расстройства, или лицу, сообщающему об одном или более физиологических симптомах расстройства. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящем документе соединение-ингибитор AR третьего поколения вводят субъекту после лечения одним или более терапевтическими агентами. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящем документе соединение-ингибитор AR третьего поколения вводят субъекту в комбинации с лечением одним или более терапевтическими агентами.

В настоящем документе термины «предотвращение» или «профилактика» относятся к снижению риска развития заболевания или состояния.

В настоящем документе термины «эффективное количество», «терапевтически эффективное количество» или «фармацевтически

эффективное количество» относятся к количеству соединения-ингибитора AR, которое достаточно для лечения расстройства. В некоторых вариантах осуществлении результатом является снижение и/или ослабление признаков, симптомов или причин расстройства или любое другое желательное изменение биологической системы. Например, «эффективным количеством» для терапевтического применения является количество композиции, содержащей описанное в настоящем документе соединение-ингибитор AR, необходимое для обеспечения клинически значимого ослабления расстройства. Соответствующее «эффективное» количество в любом отдельном случае определяют с применением любой подходящей методики (например, исследования с увеличением дозы).

В настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый» относится к материалу (например, носителю или разбавителю), который не подавляет биологическую активность или свойства описанного в настоящем документе соединения-ингибитора AR и является относительно нетоксичным (т.е. материал вводят лицу, что не вызывает нежелательных биологических воздействий или взаимодействия нежелательным образом с любым из компонентов композиции, в которой он содержится).

В настоящем документе термин «контроль» относится к образцу, который по существу идентичен тестируемому образцу, за исключением того, что он не проходил обработку по тестируемому параметру, или если речь идет об образце плазмы, который может быть взят у обычного добровольца, не имеющего исследуемого состояния. Контроль также может представлять собой внутренний контроль.

В настоящем документе термины «субъект», «лицо» и «пациент» применяются как взаимозаменяемые. Ни один из этих терминов не следует интерпретировать как требующий наблюдения профессионального медработника (например, врача, медсестры, помощника врача, санитаря, работника больницы). В настоящем документе «субъект» может относиться к любому животному, включая млекопитающих (например, человека или животное, не относящееся к человеку) и немлекопитающих. В одном варианте осуществления способов и композиций, предложенных в настоящем

документе, млекопитающее представляет собой человека.

В настоящем документе термин «приведение в контакт» относится к действию касания, установления контакта или приведения веществ в непосредственную близость друг к другу. «Приведение в контакт» может быть достигнуто путем смешивания компонентов в текучей или полутекучей смеси.

**Общее описание: функция AR и резистентность к лекарственному средству при раке**

Андрогенный рецептор (AR) является членом суперсемейства стероидных и ядерных рецепторов. В данном обширном семействе белков известны лишь пять стероидных рецепторов позвоночных, которые включают андрогенный рецептор, эстрогенный рецептор, прогестероновый рецептор, глюкокортикоидный рецептор и минералокортикоидный рецептор. AR представляет собой растворимый белок, который функционирует как внутриклеточный транскрипционный фактор. Функция AR регулируется путем связывания андрогенов, которое инициирует последовательные конформационные изменения рецептора, которые влияют на взаимодействия рецептор-белок и взаимодействия рецептор-ДНК.

AR в основном экспрессируется в тканях-мишенях андрогена, таких как предстательная железа, скелетные мышцы, печень и центральная нервная система (ЦНС), с наивысшим уровнем экспрессии, наблюдаемым в предстательной железе, надпочечнике и эпидидимисе. В некоторых случаях AR активируется путем связывания эндогенных андрогенов, включая тестостерон и 5 $\alpha$ -дигидротестостерон (5 $\alpha$ -DHT).

AR представляет собой ядерный рецептор с массой 110 кДа, который при активации андрогенами опосредует транскрипцию генов-мишеней, модулирующих рост и дифференцировку эпителиальных клеток предстательной железы. AR кодируется геном AR, размещенным на X-хромосоме в Xq11-12. Ген AR содержит 8 экзонов, кодирующих полноразмерный андрогенный рецептор. Аналогично другим стероидным рецепторам, несвязанный AR в основном размещен в цитоплазме и связан с комплексом белков теплового шока (HSP) за счет взаимодействий с лиганд-связывающим доменом. При связывании агониста AR проходит через

серию конформационных изменений: белки теплового шока отделяются от AR, и трансформированный AR проходит димеризацию, фосфорилирование и транслокацию в ядро, которые опосредуются сигналом внутриядерной локализации. Затем транслоцированный рецептор связывается с чувствительным к андрогену элементом (ARE), который характеризуется двумя шестинуклеотидными гексамерными консенсусными последовательностями полусайта 5'-TGTTCT-3', размещенными как инвертированные повторы, разделенные тремя случайными нуклеотидами, и размещен в промоторной или энхансерной области генов-мишеней AR. Рекрутинг других корегуляторов транскрипции (включая коактиваторы и корепрессоры) и механизма транскрипции дополнительно обеспечивает соответствующую модуляцию регулируемой AR экспрессии гена. Данные процессы инициируют лиганд-индуцированными конформационными изменениями в лиганд-связывающем домене.

Сигнализация AR имеет большое значение для развития и сохранения мужских репродуктивных органов, включая предстательную железу, так как у генетических самцов с утратой функции вследствие мутаций AR и генно-инженерных мышей с дефектами AR предстательная железа не развивается. Данная зависимость клеток предстательной железы от сигнализации AR сохраняется даже после неопластической трансформации. Снижение уровня андрогенов (например, с применением агонистов гонадотропин-высвобождающего гормона (GnRH)) продолжает оставаться основой лечения рака предстательной железы. Однако снижение уровня андрогенов, как правило, эффективно в течение ограниченного периода времени, и рак предстательной железы вновь обретает способность к развитию, несмотря на низкие уровни андрогенов в системе кровообращения.

Рак предстательной железы является наиболее распространенной формой рака у мужчин. Рак предстательной железы представляет приблизительно 29 процентов всех новых диагностируемых случаев рака и 10 процентов смертей от рака у мужчин. Кроме того, для американских мужчин существует вероятность приблизительно 17 процентов развития инвазивного

рака предстательной железы в течение их жизни. При первичном диагнозе большая процентная доля случаев рака предстательной железы относится к категории низкого или среднего риска, что означает относительно низкий риск смертности (до 24%) в течение 10 лет без значительного вмешательства. Однако пациенты с поздними стадиями и метастазирующим раком предстательной железы имеют среднюю выживаемость 2,5-3 года и получают агрессивное лечение, включая хирургическую терапию и химическую кастрацию.

Учитывая, что для большинства клеток опухоли предстательной железы их пролиферация и выживаемость зависят от AR, лечение по существу состоит из введения агентов, которые блокируют продукцию тестостерона (например, агонистов GnRH) по отдельности или в комбинации с антиандрогенами (например, бикалутамидом), который играет роль антагониста при воздействии на любой остаточный тестостерон. К сожалению, зачастую при исходном успехе, который проявляется падением уровня простатспецифического антигена (ПСА) и регрессией видимой опухоли (в случае ее наличия), метастазирующие опухоли неизбежно становятся резистентными к гормональной терапии, и на этой стадии не существует эффективного лечения.

Резистентный к видам гормональной терапии рак предстательной железы в настоящее время называют «кастрационно-резистентным», предполагая, что он пересек черту, когда лекарственные препараты, направленные на любой участок андрогенной оси, могли бы иметь какой-либо клинический эффект. Доклинический и клинический опыт указывает на то, что AR является эффективной терапевтической мишенью даже в случае кастрационно-резистентного рака. Была получена информация о том, что мутации AR наблюдаются максимум в 33 процентах случаев рака предстательной железы и чаще всего наблюдаются после лечения в AR-зависимом кастрационно-резистентном состоянии. Были найдены мутации, которые изменяют специфичность и эффективность связывания с лигандом и которые приводят к независимой от лиганда активности рецептора. Конкретные мутации варьируются в широких пределах, но, предположительно, зависят от схемы лечения. Кроме того, положительная регуляция самого AR

была связана с прогрессированием в кастрационно-резистентное состояние как у пациентов, так и в животных моделях.

Два агента - абиратерона ацетат (Zytiga; номер CAS 154229-19-3) и MDV3100 (энзалутамид; номер CAS 915087-33-7) - недавно использовали в клиническом испытании поздней стадии для лечения мужчин с кастрационно-резистентным раком предстательной железы (CRPC). Мишенью абиратерона ацетата является 7- $\alpha$ -гидроксилаза/17,20-лиаза (CYP17A), таким образом ингибируя остаточный биосинтез андрогенов. MDV3100 представляет собой антиандроген, выявленный при скрининге на сильный антиандроген без активности в качестве агониста в контексте избыточной экспрессии AR. Показатели клинической эффективности MDV3100 и абиратерона ацетата поддерживают гипотезу о том, что AR продолжает стимулировать рост и выживаемость клеток кастрационно-резистентного рака предстательной железы. К сожалению, аналогично андроген-аблирующим видам терапии первого поколения, продолжительное лечение абиратерона ацетатом или антагонистами AR второго поколения в конечном итоге приводит к резистентности.

Резистентность к абиратерона ацетату и MDV3100 наблюдали как в моделях рака предстательной железы, так и у пациентов. Предварительные данные указывают на то, что, аналогично кастрационно-резистентному раку предстательной железы, резистентность к антиандрогенам второго поколения развивается по множеству механизмов, и считается, что в этих условиях AR остается терапевтической мишенью. Как в моделях с ксенотрансплантатами, так и у пациентов в популяциях с резистентностью была отмечена положительная регуляция CYP17A и присутствие пикограммовых уровней андрогенов. Положительная регуляция CYP17A, предположительно, стимулирует резистентность посредством активации AR внутриопухолевым синтезом андрогенов. В других случаях резистентность коррелирует с повышенными уровнями AR, а также ядерной локализацией. Кроме того, резистентность к терапии второго поколения могут обуславливать множество путей клеточной сигнализации, которые активируют AR в отсутствие эндогенных лигандов. Наблюдение того, что опухоли с

высокими уровнями активированного Src плохо отвечают на лечение MDV3100 и абиратерона ацетатом, подтверждают данную гипотезу. К настоящему времени не были описаны мутации AR, придающие резистентность к MDV3100, ARN-509 или абиратерону.

ARN-509 представляет собой синтетическое тиогидантоиновое соединение, открытое с применением подходов медицинской химии на основе корреляций структура-активность (SAR) при выявлении нестероидных антиандрогенов, которые сохраняют активность полного антагониста в условиях повышенной экспрессии AR. ARN-509 показывает противоопухолевую активность в кастрационно-чувствительных и резистентных моделях с ксенотрансплантатами рака предстательной железы и антиандрогенное воздействие у собак с фенокопией кастрации.

***Выявление резистентных к ингибитору AR клеточных линий и мутантный полипептид AR***

В настоящем документе описаны рабочие примеры, демонстрирующие продукцию резистентных к лекарственному средству клеточных линий. В некоторых вариантах осуществления предложенные способы используются для создания клеточной линии, которая является резистентной к ингибированию антагонистом AR второго поколения, таким как, без ограничений, ARN-509, энзалутамид (MDV3100) или RD162. В некоторых вариантах осуществления предложенные способы используются для создания клеточной линии, которая является резистентной к ингибированию антагонистом AR, который ингибирует продукцию андрогена и показывает связывание с рецептором AR. В некоторых вариантах осуществления антагонист AR, который ингибирует продукцию андрогена, представляет собой ингибитор CYP17A и показывает связывание с AR. В некоторых вариантах осуществления антагонист AR, который ингибирует продукцию андрогена и показывает связывание с AR, представляет собой галетерон (ТОК001) или абиратерона ацетат. В некоторых вариантах осуществления антагонист AR, который ингибирует продукцию андрогена и показывает связывание с AR, представляет собой ТАК-700.

Как описано в настоящем документе, резистентные клеточные линии создавали *in vivo* в клеточном ксенотрансплантате



кастрационно-резистентного рака предстательной железы (CRPC) и *in vitro* в клеточных линиях чувствительного к андрогенам рака предстательной железы путем обработки повышающимися концентрациями антиандрогенных лекарственных средств ARN-509 или MDV3100. По результатам анализов клеточной пролиферации и транскрипции клеточные линии разделяли на два отдельных класса.

Клеточные линии класса 1 экспрессировали повышенный уровень AR в сравнении с их родительскими клеточными линиями и пролиферировали в отсутствие добавленных андрогенов. Лиганд-независимый рост клеток класса 1 не изменялся в присутствии ARN-509, MDV3100 или бикалутамида. Синтетический андроген R1881 ингибировал пролиферацию в клетках класса 1, а либо MDV3100, либо ARN-509 проявляли к нему антагонистическую активность, что указывает на то, что AR в данных клеточных линиях по-прежнему связывается с MDV3100 и ARN-509.

Резистентные клеточные линии класса 2 оставались андроген-зависимыми по росту, аналогично их родительским клеточным линиям. Несмотря на то что ARN-509 и MDV3100 ингибировали пролиферацию родительской клеточной линии, оба соединения показывали активность в качестве агониста и стимулировали пролиферацию клеточных линий класса 2. Анализ нуклеиновой кислоты, кодирующей AR в клеточных линиях класса 2, позволил выявить, что клеточные линии экспрессировали мутантный AR с мутацией в лиганд-связывающем домене. Мутация представляла собой мутацию с потерей смысла тимидина (Т) на цитозин (С), которая приводила к аминокислотной замене фенилаланина в позиции 876 AR дикого типа на лейцин (F876L).

Как описано в настоящем документе в примерах, были выявлены мутации в гене AR в образцах плазмы от пациентов с раком предстательной железы, участвующих в клинических исследованиях фазы 1/2 ARN-509. Выявленные мутации включают мутацию с потерей смысла тимидина (Т) на цитозин (С) в позиции 2988 (первая позиция кодона, кодирующего фенилаланин, который кодируется в экзоне 8 гена AR) и мутацию с потерей смысла цитозина (С) на аланин (А) в позиции 2990 (третья позиция кодона, кодирующего фенилаланин) в аминокислотной замене

фенилаланина в позиции 876 AR дикого типа на лейцин (F876L). У пациентов, у которых были выявлены данные мутации, на протяжении исследования также наблюдали повышающиеся уровни простатспецифического антигена (ПСА), что указывает на повышающуюся резистентность к лечению.

В настоящем документе описаны мутантные полипептиды AR, которые содержат аминокислотную замену фенилаланина в позиции 876 AR дикого типа на лейцин (F876L), и кодирующие полипептиды нуклеиновые кислоты. В настоящем документе также описаны способы продукции нуклеиновых кислот и полипептидов мутантного AR, описанные в настоящем документе. В настоящем документе также описаны композиции, комбинации и наборы, содержащие нуклеиновые кислоты и полипептиды мутантного AR, описанные в настоящем документе. Также предложены способы применения мутантных полипептидов AR для выявления молекул, взаимодействующих с мутантным AR, включая андрогенные ингибиторы, включая соединения-ингибиторы AR третьего поколения. Также предложены композиции, содержащие молекулы, взаимодействующие с мутантным AR, включая их фармацевтические композиции. Также предложены способы лечения с применением выявленных молекул, взаимодействующих с мутантным AR. В настоящем документе также описаны нуклеиновые кислоты мутантного AR, которые являются синтетическими нуклеиновыми кислотами. В настоящем документе также описаны нуклеиновые кислоты мутантного AR, которые являются молекулами кДНК. В настоящем документе также описаны мутантные полипептиды AR, продуцируемые нуклеиновыми кислотами мутантного AR, которые являются синтетическими нуклеиновыми кислотами. В настоящем документе также описаны мутантные полипептиды AR, продуцируемые нуклеиновыми кислотами мутантного AR, которые являются молекулами кДНК. В настоящем документе также описаны нуклеиновые кислоты мутантного AR, которые не содержат геномной ДНК AR. В настоящем документе также описаны нуклеиновые кислоты мутантного AR, которые являются неметилованными. В настоящем документе также описаны нуклеиновые кислоты мутантного AR, которые не содержат интронные последовательности AR. В

настоящем документе также описаны нуклеиновые кислоты мутантного AR, которые содержат последовательность нуклеотидов из одного или более экзонов геномной последовательности AR. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты мутантного AR содержат последовательность нуклеотидов, которая кодирует фенилаланин в позиции, соответствующей позиции 876 полипептида AR дикого типа.

Как описано в настоящем документе, выявление мутации в позиции 876 в AR, такой как, например, F876L, позволяет выполнить конструирование и скрининг ингибиторов, эффективных для ингибирования мутантного AR, имеющего одну или более мутаций резистентности. Такие ингибиторы могут подходить для клинических и терапевтических сфер применения. В некоторых вариантах осуществления ингибиторы могут подходить для лечения рака, такого как, например, AR-опосредованный рак, такой как, например, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак печени (т.е. гепатоцеллюлярный рак) или рак мочевого пузыря, такой как, например, резистентный к лекарственному средству рак предстательной железы, молочной железы, печени (т.е. гепатоцеллюлярный рак) или мочевого пузыря.

Как описано в настоящем документе, в некоторых вариантах осуществления субъекты проходят скрининг на выявление мутации в позиции 876 в AR, такой как, например, F876L. В некоторых вариантах осуществления выявление такой мутации позволяет назначить лечение рака или модифицировать лечение рака. В некоторых вариантах осуществления выявление такой мутации применяют для разделения субъектов на группы конкретной терапии, такой как, например, терапии ингибитором, который ингибирует активность мутантного AR (т.е. ингибитора AR третьего поколения). В некоторых вариантах осуществления выявление такой мутации применяют для характеристики субъекта как имеющего высокий риск рецидива заболевания или состояния, такого как, например, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак печени (т.е. гепатоцеллюлярный рак) или рак мочевого пузыря. В некоторых вариантах осуществления выявление такой мутации применяют для характеристики субъекта как не

имеющего чувствительности к конкретному ингибитору AR, такому как, например, ARN-509, MDV3100 или RD162. В некоторых вариантах осуществления выявление такой мутации применяют для характеристики субъекта как не имеющего чувствительности к ингибитору AR, который представляет собой ингибитор CYP17A, такой как, например, галетерон (ТОК001), ТАК-700 или абиратерона ацетат.

#### **Мутантные полипептиды AR**

В настоящем документе предложены мутантные полипептиды AR. В некоторых вариантах осуществления выделенные мутантные полипептиды AR представляют собой выделенные мутантные полипептиды AR. В некоторых вариантах осуществления выделенные мутантные полипептиды AR представляют собой ненативные мутантные полипептиды AR. В некоторых вариантах осуществления выделенные мутантные полипептиды AR представляют собой рекомбинантные мутантные полипептиды AR. В некоторых вариантах осуществления предложенные в настоящем документе мутантные полипептиды AR показывают активность андрогенного рецептора. Например, мутантные полипептиды AR связываются с чувствительными к андрогену элементами и стимулируют экспрессию чувствительных к AR генов. В некоторых вариантах осуществления мутантные полипептиды AR содержат одну или более аминокислотных замен, которые придают резистентность к проявлению полного антагонизма антиандрогеном. В некоторых вариантах осуществления мутантные полипептиды AR содержат одну или более аминокислотных замен, которые придают резистентность к проявлению полного антагонизма ингибитором AR второго поколения, таким как, без ограничений, ARN-509, энзалутамид (MDV3100) или RD162. В некоторых вариантах осуществления мутантные полипептиды AR содержат одну или более аминокислотных замен, которые придают резистентность к ингибированию ARN-509. В некоторых вариантах осуществления мутантные полипептиды AR содержат одну или более аминокислотных замен, которые придают резистентность к ингибированию энзалутамидом (MDV3100). В некоторых вариантах осуществления мутантные полипептиды AR содержат одну или более аминокислотных замен, которые придают резистентность к

ингибированию RD162.

В некоторых вариантах осуществления обработка предложенного в настоящем документе мутантного полипептида AR ингибитором AR второго поколения индуцирует активность AR. Например, ингибитор AR второго поколения действует как агонист мутантного полипептида AR. В некоторых вариантах осуществления обработка предложенного в настоящем документе мутантного полипептида AR ARN-509 индуцирует активность AR. В некоторых вариантах осуществления обработка предложенного в настоящем документе мутантного полипептида AR энзалутамидом (MDV3100) индуцирует активность AR. В некоторых вариантах осуществления обработка предложенного в настоящем документе мутантного полипептида AR RD162 индуцирует активность AR.

В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит модификацию в позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 полипептида AR дикого типа, представленного в SEQ ID NO: 1 (номер доступа P10275), или соответствующей позиции в полипептиде AR дикого типа, представленном в SEQ ID NO: 2 (номер доступа NP\_000035.2). В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой замену аминокислоты фенилаланин в позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 полипептида AR дикого типа, представленного в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид андрогенного рецептора (AR) не содержит фенилаланин в позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 полипептида AR дикого типа, представленного в SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой замену аминокислоты фенилаланин в позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 полипептида AR дикого типа, представленного в SEQ ID NO: 1, и замененную аминокислоту выбирают среди лейцина, изолейцина, валина, аланина, глицина, метионина, серина, треонина, цистеина, триптофана, лизина, аргинина, гистидина, пролина, тирозина, аспарагина, глутамина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты. В некоторых вариантах осуществления мутантный

полипептид андрогенного рецептора (AR) содержит лейцин, изолейцин, валин, аланин, глицин, метионин, серин, треонин, цистеин, триптофан, лизин, аргинин, гистидин, пролин, тирозин, аспарагин, глутамин, аспарагиновую кислоту или глутаминовую кислоту в позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 полипептида AR дикого типа, представленного в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой замену аминокислоты фенилаланин в позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 полипептида AR дикого типа, представленного в SEQ ID NO: 1, и замененную аминокислоту выбирают среди лейцина, изолейцина, валина, аланина, глицина, метионина и триптофана. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид андрогенного рецептора (AR) содержит лейцин, изолейцин, валин, аланин, глицин, метионин или триптофан в позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 полипептида AR дикого типа, представленного в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой замену аминокислоты фенилаланин на лейцин в позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 полипептида AR дикого типа, представленного в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит лейцин в позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 полипептида AR дикого типа, представленного в SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления модификация содержит делецию аминокислоты фенилаланин в позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 полипептида AR дикого типа, представленного в SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит последовательность аминокислот, представленную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит полипептид, имеющий лейцин в позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876, и имеющий 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность аминокислотной последовательности с полипептидом, имеющим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит

полипептид, не имеющий фенилаланин в позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876, и имеющий 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность аминокислотной последовательности с полипептидом, имеющим последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5.

В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит модификацию в аминокислотной позиции 876 и модификацию в одной или более дополнительных аминокислотных позициях. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит модификацию в аминокислотной позиции 876 и модификацию в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более аминокислотных позициях. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит модификацию в позиции 876 и модификацию в одной дополнительной аминокислотной позиции. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит лейцин в аминокислотной позиции 876 и модификацию в 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более дополнительных аминокислотных позициях. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит лейцин в позиции 876 и модификацию в одной дополнительной аминокислотной позиции. В некоторых вариантах осуществления модификация в аминокислотной позиции 876 является заменой, которая представляет собой F876L.

В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит модификацию в позиции 876 и модификацию в дополнительной аминокислотной позиции, что придает резистентность к антагонисту AR первого или второго поколения или антагонисту AR, который ингибирует продукцию андрогена. В некоторых вариантах осуществления модификация в аминокислотной позиции дополнительно к модификации в аминокислотной позиции 876 повышает резистентность полипептида AR к антагонисту AR первого или второго поколения или антагонисту AR, который ингибирует продукцию андрогена, в сравнении с полипептидом AR, содержащим только модификацию в аминокислотной позиции 876. В некоторых вариантах осуществления модификация в аминокислотной

позиции 876 является заменой, которая представляет собой F876L.

В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит модификацию в позиции 876 и модификацию, выбранную среди модификаций AR, описанных, например, в публикациях Grasso et al. (2012 г.) *Nature* 487(7406):239-43; Ning et al. (2012 г.) *Urology* 80(1):216-8; Cong et al. (2012 г.) *Gene* 500(2):220-3; Hay et al. (2012 г.) *PLoS One* 2012;7(3):e32514; Koochekpour (2010 г.) *Asian J Androl.* 12(5):639-57; Waltering et al. (2012 г.) *Mol Cell Endocrinol.* 360:38-43; Robbins (2012 г.) *Mol Cell Endocrinol.* 352(1-2):26-33; или Gottlieb et al. (2012 г.) *Hum Mutat.* 33(5):887-94. В некоторых вариантах осуществления модификация в аминокислотной позиции 876 является заменой, которая представляет собой F876L.

В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит модификацию в позиции 876 и модификацию, выбранную среди модификаций AR, связанных с кастрационно-резистентным раком предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления модификация, связанная с кастрационно-резистентным раком предстательной железы, представляет собой аминокислотную замену, такую как, например, T877A, W741C, W741L, W741R, L701H или H874Y. В некоторых вариантах осуществления модификация в аминокислотной позиции 876 является заменой, которая представляет собой F876L.

В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит модификацию в аминокислотной позиции 876 и модификацию в аминокислотной позиции 877. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит лейцин в позиции 876 и модификацию в аминокислотной позиции 877. В некоторых вариантах осуществления модификация в аминокислотной позиции 877 представляет собой замену аминокислоты треонин. В некоторых вариантах осуществления замененную аминокислоту в аминокислотной позиции 877 выбирают среди лейцина, изолейцина, валина, аланина, фенилаланина, глицина, метионина, серина, цистеина, триптофана, лизина, аргинина, гистидина, пролина, тирозина, аспарагина, глутамина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты. В некоторых вариантах осуществления



замененная аминокислота в аминокислотной позиции 877 представляет собой аланин. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит модификацию в позиции 876 и аланин в аминокислотной позиции 877. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит лейцин в позиции 876 и аланин в аминокислотной позиции 877.

В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит модификацию в позиции 876 и модификацию в аминокислотной позиции 741. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит лейцин в позиции 876 и модификацию в аминокислотной позиции 741. В некоторых вариантах осуществления модификация в аминокислотной позиции 741 представляет собой замену аминокислоты триптофан. В некоторых вариантах осуществления замененную аминокислоту в аминокислотной позиции 741 выбирают среди лейцина, изолейцина, валина, аланина, фенилаланина, глицина, метионина, серина, треонина, цистеина, лизина, аргинина, гистидина, пролина, тирозина, аспарагина, глутамина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты. В некоторых вариантах осуществления замененная аминокислота в аминокислотной позиции 741 представляет собой лейцин, цистеин или аргинин. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит модификацию в позиции 876 и лейцин в аминокислотной позиции 741. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит модификацию в позиции 876 и цистеин в аминокислотной позиции 741. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит модификацию в позиции 876 и аргинин в аминокислотной позиции 741. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит лейцин в позиции 876 и лейцин в аминокислотной позиции 741. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит лейцин в позиции 876 и цистеин в аминокислотной позиции 741. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит лейцин в позиции 876 и аргинин в аминокислотной позиции 741.

В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид

AR содержит модификацию в позиции 876 и модификацию в аминокислотной позиции 701. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит лейцин в позиции 876 и модификацию в аминокислотной позиции 701. В некоторых вариантах осуществления модификация в аминокислотной позиции 701 представляет собой замену аминокислоты лейцин. В некоторых вариантах осуществления замененную аминокислоту в аминокислотной позиции 701 выбирают среди изолейцина, валина, аланина, фенилаланина, глицина, метионина, гистидина, серина, треонина, цистеина, лизина, аргинина, триптофана, пролина, тирозина, аспарагина, глутамина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты. В некоторых вариантах осуществления замененная аминокислота в аминокислотной позиции 701 представляет собой гистидин. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит модификацию в позиции 876 и гистидин в аминокислотной позиции 701. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит лейцин в позиции 876 и гистидин в аминокислотной позиции 701.

В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит модификацию в позиции 876 и модификацию в аминокислотной позиции 874. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит лейцин в позиции 876 и модификацию в аминокислотной позиции 874. В некоторых вариантах осуществления модификация в аминокислотной позиции 874 представляет собой замену аминокислоты гистидин. В некоторых вариантах осуществления замененную аминокислоту в аминокислотной позиции 874 выбирают среди лейцина, изолейцина, валина, аланина, фенилаланина, глицина, метионина, серина, треонина, цистеина, лизина, аргинина, триптофана, пролина, тирозина, аспарагина, глутамина, аспарагиновой кислоты и глутаминовой кислоты. В некоторых вариантах осуществления замененная аминокислота в аминокислотной позиции 874 представляет собой тирозин. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит модификацию в позиции 876 и тирозин в аминокислотной позиции 874. В некоторых вариантах

осуществления мутантный полипептид AR содержит лейцин в позиции 876 и тирозин в аминокислотной позиции 874.

В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR представляет собой вариант полипептида AR, который содержит модификацию в позиции 876 и одной или более дополнительных аминокислотных позициях относительно полипептида AR дикого типа, представленного в SEQ ID NO: 1. Примеры вариантов включают, например, видовые варианты, аллельные варианты, варианты сплайсинга РНК и варианты, содержащие консервативные и неконсервативные аминокислотные мутации. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида AR содержит полиглутаминовый тракт от приблизительно 6 последовательных остатков глутамина до приблизительно 39 последовательных остатков глутамина. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида AR содержит полиглутаминовый тракт от приблизительно 16 последовательных остатков глутамина до приблизительно 29 последовательных остатков глутамина. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида AR содержит полиглутаминовый тракт из приблизительно 21 последовательного остатка глутамина. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида AR содержит полиглутаминовый тракт из приблизительно 22 последовательных остатков глутамина. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида AR содержит полиглутаминовый тракт из приблизительно 23 последовательных остатков глутамина. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида AR содержит полиглициновый тракт от приблизительно 10 последовательных остатков глицина до приблизительно 27 последовательных остатков глицина. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида AR содержит полиглициновый тракт из приблизительно 23 последовательных остатков глицина. В некоторых вариантах осуществления вариант полипептида AR содержит полиглициновый тракт из приблизительно 24 последовательных остатков глицина.

В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит часть мутантного полипептида AR, представленного в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления часть

показывает активность полипептида AR. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит ДНК-связывающий домен полипептида AR и лиганд-связывающий домен полипептида AR, содержащий модификацию в аминокислотной позиции 876 мутантного полипептида AR, представленного в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR состоит по существу из ДНК-связывающего домена полипептида AR и лиганд-связывающего домена полипептида AR, содержащего модификацию в аминокислотной позиции 876 мутантного полипептида AR, представленного в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит последовательность аминокислот от приблизительно аминокислотной позиции 554 до приблизительно аминокислотной позиции 919 мутантного полипептида AR, представленного в SEQ ID NO: 5. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит лиганд-связывающий домен мутантного полипептида AR. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR состоит по существу из лиганд-связывающего домена мутантного полипептида AR. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит последовательность аминокислот от приблизительно аминокислотной позиции 554 до приблизительно аминокислотной позиции 919.

В некоторых вариантах осуществления полипептид AR представляет собой слитый белок, содержащий лиганд-связывающий домен полипептида AR, содержащий модификацию в аминокислотной позиции 876 полипептида AR дикого типа, представленного в SEQ ID NO: 1, связанный с гетерологическим полипептидом. В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой аминокислотную замену, которая представляет собой F876L. Способы создания слитых белков известны в данной области и включают стандартные рекомбинантные методики работы с ДНК. Например, в некоторых вариантах осуществления фрагменты ДНК, кодирующие разные полипептидные последовательности, связываются вместе с сохранением рамки считывания в соответствии с традиционными методиками, например, с использованием для связывания тупых или ступенчатых концов, расщепление

рестрикционным ферментом для получения соответствующих концов, при необходимости заполнение липких концов, обработка щелочной фосфатазой для предотвращения нежелательных соединений и ферментативное связывание. В некоторых вариантах осуществления слитый ген можно синтезировать по стандартным методикам, включая использование автоматических синтезаторов ДНК. В некоторых вариантах осуществления ПЦР-амплификацию фрагментов генов можно проводить с применением якорных праймеров, которые дают комплементарные липкие концы между двумя последовательными фрагментами генов, которые впоследствии можно гибридизировать и повторно амплифицировать для создания химерной генной последовательности (см., например, *Current Protocols in Molecular Biology*, ред. Ausubel et al. John Wiley & Sons: 1992 г.). В некоторых вариантах осуществления в продаже доступны векторы экспрессии, которые кодируют фрагмент для слияния (например, полипептид GST). Кодирующую модифицированный полипептид AR нуклеиновую кислоту можно клонировать в такой вектор экспрессии так, что фрагмент для слияния свяжется с сохранением рамки считывания с модифицированным полипептидом AR.

В некоторых вариантах осуществления полипептид AR представляет собой слитый белок, содержащий лиганд-связывающий домен полипептида AR, содержащий модификацию в аминокислотной позиции 876 полипептида AR дикого типа, представленного в SEQ ID NO: 1, связанный с гетерологическим ДНК-связывающим доменом. В некоторых вариантах осуществления полипептид AR представляет собой слитый белок, содержащий лиганд-связывающий домен мутантного полипептида AR, представленного в SEQ ID NO: 5, связанный с гетерологическим ДНК-связывающим доменом. В некоторых вариантах осуществления гетерологический ДНК-связывающий домен представляет собой ДНК-связывающий домен GAL4. В некоторых вариантах осуществления гетерологический ДНК-связывающий домен представляет собой ДНК-связывающий домен LexA. В некоторых вариантах осуществления лиганд-связывающий домен полипептида AR, содержащий модификацию в аминокислотной позиции 876 полипептида AR дикого типа, представленного в SEQ

ID NO: 1, связан с гетерологическим ДНК-связывающим доменом посредством пептидного линкера. В некоторых вариантах осуществления полипептид AR представляет собой слитый белок, содержащий лиганд-связывающий домен мутантного полипептида AR, представленного в SEQ ID NO: 5, связанный с гетерологическим ДНК-связывающим доменом посредством пептидного линкера.

В некоторых вариантах осуществления полипептид AR представляет собой слитый белок, содержащий лиганд-связывающий домен полипептида AR, содержащий модификацию в аминокислотной позиции 876 полипептида AR дикого типа, представленного в SEQ ID NO: 1, связанный с гетерологическим пептидом, для применения в анализе белкового взаимодействия, такого как, без ограничений, дрожжевой двухгибридный анализ, двухгибридная система на основе клеток млекопитающих (M2H), анализ Ферстеровского (флуоресцентного) резонансного переноса энергии (FRET), биолюминесцентный анализ резонансного переноса энергии (BRET) или анализ гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF®). В некоторых вариантах осуществления полипептид AR представляет собой слитый белок, содержащий лиганд-связывающий домен мутантного полипептида AR, представленного в SEQ ID NO: 5, связанный с гетерологическим пептидом, для применения в анализе белкового взаимодействия, таком как, без ограничений, дрожжевой двухгибридный анализ, двухгибридная система на основе клеток млекопитающих (M2H), анализ Ферстеровского (флуоресцентного) резонансного переноса энергии (FRET), биолюминесцентный анализ резонансного переноса энергии (BRET) или анализ гомогенной флуоресценции с временным разрешением (HTRF®).

В некоторых вариантах осуществления лиганд-связывающий домен полипептида AR, содержащий модификацию в аминокислотной позиции 876 полипептида AR дикого типа, представленного в SEQ ID NO: 1, связан с обнаружимым полипептидом. В некоторых вариантах осуществления лиганд-связывающий домен мутантного полипептида AR, представленного в SEQ ID NO: 5, связан с обнаружимым полипептидом. В некоторых вариантах осуществления лиганд-связывающий домен полипептида AR, содержащий модификацию

в аминокислотной позиции 876 полипептида AR дикого типа, представленного в SEQ ID NO: 1, связан с флуоресцентным белком, таким как, без ограничений, зеленый (GFP), красный (RFP), голубой (CFP), желтый (YFP) или синий (BFP) флуоресцентный белок. В некоторых вариантах осуществления лиганд-связывающий домен мутантного полипептида AR, представленного в SEQ ID NO: 5, связан с флуоресцентным белком, таким как, без ограничений, зеленый (GFP), красный (RFP), голубой (CFP), желтый (YFP) или синий (BFP) флуоресцентный белок. В некоторых вариантах осуществления лиганд-связывающий домен полипептида AR, содержащий модификацию в аминокислотной позиции 876 полипептида AR дикого типа, представленного в SEQ ID NO: 1, связан с биолюминесцентным белком. В некоторых вариантах осуществления лиганд-связывающий домен мутантного полипептида AR, представленного в SEQ ID NO: 5, связан с биолюминесцентным белком. В некоторых вариантах осуществления лиганд-связывающий домен полипептида AR, содержащий модификацию в аминокислотной позиции 876 полипептида AR дикого типа, представленного в SEQ ID NO: 1, связан с пептидной меткой. В некоторых вариантах осуществления лиганд-связывающий домен мутантного полипептида AR, представленного в SEQ ID NO: 5, связан с пептидной меткой. В некоторых вариантах осуществления пептидная метка представляет собой эпитопную метку, распознаваемую специфичным к метке антителом. В некоторых вариантах осуществления метка представляет собой эпитопную метку, такую как, без ограничений, с-тус, V-5, гемагглютинин (HA), FLAG. В некоторых вариантах осуществления метка представляет собой аффинную метку, такую как, без ограничений, биотин, метку strep-tag, хитин-связывающий белок (CBP), мальтоза-связывающий белок (MBP), глутатион-S-трансферазу (GST) или полигистидиновую метку.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложена матрица, содержащая мутантный полипептид AR, предложенный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR связан с микрочипом. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR связан непосредственно с микрочипом. В некоторых вариантах

осуществления мутантный полипептид AR связан с микрочипом опосредованно посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложена микрочиповая матрица, содержащая мутантный полипептид AR, предложенный в настоящем документе.

#### **Нуклеиновые кислоты**

В настоящем документе предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие мутантные полипептиды AR. В настоящем документе предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие любой из мутантных полипептидов AR, описанных в настоящем документе. Способы получения нуклеиновых кислот, которые кодируют конкретные полипептиды, известны в данной области и включают стандартные молекулярно-биологические методики. В настоящем документе предложены примеры нуклеиновых кислот, кодирующих мутантные полипептиды AR, предложенные в настоящем документе. Следует понимать, что вследствие вырожденности генетического кода существует множество вариантов нуклеиновых кислот, которые кодируют один и тот же полипептид. Нуклеиновые кислоты, которые кодируют предложенные в настоящем документе мутантные полипептиды AR, охватывают такие варианты. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты мутантного AR представляют собой синтетические нуклеиновые кислоты. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты мутантного AR представляют собой молекулы кДНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты мутантного AR не содержат геномной ДНК. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты мутантного AR являются неметилированными. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты мутантного AR не содержат интронные последовательности геномной ДНК AR. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты мутантного AR содержат последовательность нуклеотидов из двух или более экзонов геномной последовательности AR, включая экзон 8 или его часть, содержащую нуклеотидную последовательность, кодирующую позицию 876 полипептида AR. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновые кислоты мутантного AR содержат последовательность нуклеотидов, которая кодирует фенилаланин в



позиции, соответствующей позиции 876 полипептида AR дикого типа.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая мутантные полипептиды AR, содержит модификацию относительно нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид AR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая мутантный полипептид AR, содержит модификацию, в которой кодированный полипептид содержит замену аминокислоты фенилаланин в позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 полипептида AR дикого типа, представленного в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая мутантный полипептид AR, содержит модификацию, в которой кодированный полипептид не содержит фенилаланина в позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 полипептида AR дикого типа, представленного в SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления модификация нуклеиновой кислоты представляет собой мутацию с потерей смысла или делецию одного или более кодонов, которые кодируют полипептид. В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой мутацию с потерей смысла, которая изменяет кодон нуклеиновой кислоты, который кодирует фенилаланин в аминокислотной позиции 876 полипептида AR. В некоторых вариантах осуществления кодон нуклеиновой кислоты, который кодирует фенилаланин в аминокислотной позиции 876 полипептида AR, представляет собой TTC или TTT. В некоторых вариантах осуществления кодон нуклеиновой кислоты, который кодирует фенилаланин в аминокислотной позиции 876 полипептида AR, представляет собой TTC. В некоторых вариантах осуществления кодон нуклеиновой кислоты, который кодирует фенилаланин в аминокислотной позиции 876 полипептида AR, представляет собой TTT. В некоторых вариантах осуществления модификация изменяет кодон нуклеиновой кислоты, который кодирует фенилаланин в аминокислотной позиции 876 полипептида AR, с TTC на кодон нуклеиновой кислоты, который кодирует лейцин. В некоторых вариантах осуществления модификация изменяет кодон нуклеиновой

кислоты, который кодирует фенилаланин в аминокислотной позиции 876 полипептида AR, с TTT на кодон нуклеиновой кислоты, который кодирует лейцин. В некоторых вариантах осуществления кодон нуклеиновой кислоты, который кодирует лейцин, выбирают среди TTA, TTG, CTT, CTC, CTA или CTG.

В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой мутацию с потерей смысла, которая содержит замену тимина (T) на цитозин (C). В некоторых вариантах осуществления модификация изменяет кодон нуклеиновой кислоты, который кодирует фенилаланин в аминокислотной позиции 876 полипептида AR, с TTC на CTC. В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой мутацию с потерей смысла, которая содержит замену тимина (T) на цитозин (C) в нуклеотидной позиции 2626 нуклеотидной последовательности AR, представленной в SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой мутацию с потерей смысла, которая содержит замену тимина (T) на аденин (A). В некоторых вариантах осуществления модификация изменяет кодон нуклеиновой кислоты, который кодирует фенилаланин в аминокислотной позиции 876 полипептида AR, с TTT на TTA. В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой мутацию с потерей смысла, которая содержит замену тимина (T) на аденин (A) в нуклеотидной позиции 2628 нуклеотидной последовательности AR, представленной в SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой мутацию с потерей смысла, которая содержит замену тимина (T) на гуанин (G). В некоторых вариантах осуществления модификация изменяет кодон нуклеиновой кислоты, который кодирует фенилаланин в аминокислотной позиции 876 полипептида AR, с TTT на TTG. В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой мутацию с потерей смысла, которая содержит замену тимина (T) на гуанин (G) в нуклеотидной позиции 2628 нуклеотидной последовательности AR, представленной в SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления модификация содержит

мутацию с потерей смысла, которая содержит замену тимина (Т) на цитозин (С) в первой позиции кодона, который кодирует F876 полипептида AR, и вторую мутацию с потерей смысла, которая содержит замену тимина (Т) на аденозин (А) в третьей позиции кодона, который кодирует F876 полипептида AR. В некоторых вариантах осуществления модификация изменяет кодон нуклеиновой кислоты, который кодирует фенилаланин в аминокислотной позиции 876 полипептида AR, с ТТТ на СТА. В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой мутацию с потерей смысла, которая содержит замену тимина (Т) на цитозин (С) в нуклеотидной позиции 2626, и вторую мутацию с потерей смысла, которая содержит замену тимина (Т) на аденозин (А) в нуклеотидной позиции 2628 нуклеотидной последовательности AR, представленной в SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления модификация содержит мутацию с потерей смысла, которая содержит замену тимина (Т) на цитозин (С) в первой позиции кодона, который кодирует F876 полипептида AR, и вторую мутацию с потерей смысла, которая содержит замену тимина (Т) на гуанин (G) в третьей позиции кодона, который кодирует F876 полипептида AR. В некоторых вариантах осуществления модификация изменяет кодон нуклеиновой кислоты, который кодирует фенилаланин в аминокислотной позиции 876 полипептида AR, с ТТТ на СТG. В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой мутацию с потерей смысла, которая содержит замену тимина (Т) на цитозин (С) в нуклеотидной позиции 2626, и вторую мутацию с потерей смысла, которая содержит замену тимина (Т) на гуанин (G) в нуклеотидной позиции 2628 нуклеотидной последовательности AR, представленной в SEQ ID NO: 18.

В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая мутантный полипептид AR, содержит последовательность нуклеотидов, представленную в SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая мутантный полипептид AR, содержит нуклеиновую кислоту, имеющую 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность нуклеотидной последовательности с нуклеиновой

кислотой, имеющей последовательность нуклеотидов, представленную в SEQ ID NO: 19, где кодированный мутантный AR содержит модификацию относительно полипептида AR дикого типа в позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая мутантный полипептид AR, содержит нуклеиновую кислоту, имеющую 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность нуклеотидной последовательности с нуклеиновой кислотой, имеющей последовательность нуклеотидов, представленную в SEQ ID NO: 19, где кодированный мутантный AR не содержит фенилаланин в позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая мутантный полипептид AR, содержит нуклеиновую кислоту, имеющую 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность нуклеотидной последовательности с нуклеиновой кислотой, имеющей последовательность нуклеотидов, представленную в SEQ ID NO: 19, где кодированный мутантный AR содержит лейцин в позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876.

В некоторых вариантах осуществления предложенная в настоящем документе нуклеиновая кислота, кодирующая мутантный полипептид AR, представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту. В некоторых вариантах осуществления предложенная в настоящем документе нуклеиновая кислота, кодирующая мутантный полипептид AR, представляет собой молекулу ДНК. В некоторых вариантах осуществления предложенная в настоящем документе нуклеиновая кислота, кодирующая мутантный полипептид AR, представляет собой молекулу кДНК. В некоторых вариантах осуществления предложенная в настоящем документе нуклеиновая кислота, кодирующая мутантный полипептид AR, представляет собой молекулу РНК. В некоторых вариантах осуществления предложенная в настоящем документе нуклеиновая кислота, кодирующая мутантный полипептид AR, представляет собой молекулу ингибиторной РНК (т.е. РНКи). В некоторых вариантах осуществления предложенная в настоящем документе нуклеиновая кислота представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая комплементарна или

связывается с нуклеиновой кислотой, кодирующей мутантный полипептид AR.

В некоторых вариантах осуществления предложенная в настоящем документе нуклеиновая кислота, кодирующая мутантный полипептид AR или его часть, содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислоту в позиции 876, которая не является фенилаланином. В некоторых вариантах осуществления предложенная в настоящем документе нуклеиновая кислота, кодирующая мутантный полипептид AR или его часть, содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую лейцин в аминокислотной позиции 876.

В некоторых вариантах осуществления предложенная в настоящем документе нуклеиновая кислота представляет собой олигонуклеотид, который кодирует часть мутантного полипептида AR. В некоторых вариантах осуществления предложенная в настоящем документе нуклеиновая кислота представляет собой олигонуклеотид, который кодирует часть мутантного полипептида AR, которая содержит нуклеотидный кодон, кодирующий аминокислоту, соответствующую аминокислотной позиции 876. В некоторых вариантах осуществления кодон кодирует аминокислоту, которая не является фенилаланином. В некоторых вариантах осуществления кодон кодирует аминокислоту, которая представляет собой лейцин.

В некоторых вариантах осуществления предложенная в настоящем документе нуклеиновая кислота представляет собой вектор, который содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую любой из предложенных в настоящем документе мутантных полипептидов AR. В некоторых вариантах осуществления предложенная в настоящем документе нуклеиновая кислота, которая представляет собой вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую любой из предложенных в настоящем документе мутантных полипептидов AR, является вектором экспрессии. В некоторых вариантах осуществления предложенная в настоящем документе нуклеиновая кислота, которая представляет собой вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую любой из предложенных в настоящем документе мутантных полипептидов AR, функционально связана с промотором для экспрессии мутантных полипептидов AR.

В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой плазмидный вектор. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления вирусный вектор представляет собой ДНК- или РНК-вирусный вектор. Примеры вирусных векторов включают, без ограничений, вектор на основе вируса осповакцины, аденовируса, аденоассоциированного вируса (AAV), ретровируса или вируса герпеса.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложена матрица, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую любой из мутантных полипептидов AR, предложенных в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления мутантная нуклеиновая кислота AR связана с микрочипом. В некоторых вариантах осуществления мутантная нуклеиновая кислота AR связана непосредственно с микрочипом. В некоторых вариантах осуществления мутантная нуклеиновая кислота AR связана с микрочипом опосредованно посредством линкера. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе предложена матрица в форме микрочипа, содержащая нуклеиновую кислоту, кодирующую любой из мутантных полипептидов AR, предложенных в настоящем документе.

#### **Получение нуклеиновых кислот и полипептидов**

В некоторых вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая предложенный в настоящем документе мутантный полипептид AR, создана стандартными рекомбинантными способами. В некоторых вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая предложенный в настоящем документе мутантный полипептид AR, создана путем амплификации мутантной последовательности AR из геномной ДНК. В некоторых вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая предложенный в настоящем документе мутантный полипептид AR, создана полимеразной цепной реакцией с применением праймеров, специфичных к последовательности AR. В некоторых вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая предложенный в настоящем документе мутантный

полипептид AR, создана обратной транскрипцией мРНК, кодирующей мутантный полипептид AR.

В некоторых вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая предложенный в настоящем документе мутантный полипептид AR, вводится в вектор экспрессии и экспрессируется в клетке-хозяине или неклеточном экстракте. В некоторых вариантах осуществления выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая предложенный в настоящем документе мутантный полипептид AR, функционально связана с промотором для экспрессии кодирующего полипептида в клетке или неклеточном экстракте. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой конститутивный промотор. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой индуцируемый промотор.

В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая предложенный в настоящем документе мутантный полипептид AR, является «экзогенной» для клетки, что означает, что она является чужеродной для клетки, в которую вводят вектор, или что последовательность гомологична последовательности в клетке, но в позиции внутри нуклеиновой кислоты клетки-хозяина, в которой последовательность обычно не присутствует. Векторы включают плазмиды, космиды, вирусы (бактериофаги, вирусы животных и вирусы растений) и искусственные хромосомы (например, искусственные дрожжевые хромосомы). Специалист в данной области будет в достаточной мере оснащен, чтобы сконструировать вектор с использованием стандартных рекомбинантных методик, которые описаны в публикациях Sambrook et al., 1989 г. и Ausubel et al., 1996 г., обе из которых включены в настоящий документ путем ссылки.

Способы экспрессии белка в клетке хорошо известны в данной области и включают, например, экспрессию в клетках, таких как животные и растительные клетки. Примеры животных клеток для экспрессии мутантных полипептидов AR, предложенных в настоящем документе, без ограничений, включают бактерии, дрожжи, клетки насекомых и клетки млекопитающих, такие как, например, клетки человека, приматов, грызунов, бычьих и овечьих. В некоторых

вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая мутантный AR, встроена в геном клетки-хозяина.

В некоторых вариантах осуществления способ экспрессии мутантного полипептида AR, предложенного в настоящем документе, включает культивирование клетки-хозяина, содержащей вектор экспрессии, кодирующий мутантный полипептид AR так, что мутантный полипептид AR продуцируется клеткой. В некоторых способах нуклеиновая кислота, кодирующая мутантный полипептид, соединена с нуклеиновой кислотой, кодирующей сигнальную последовательность так, что сигнальная последовательность экспрессируется в виде слитого пептида с мутантным полипептидом AR. В некоторых вариантах осуществления сигнальная последовательность обеспечивает секрецию мутантного полипептида AR клеткой-хозяином.

В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR выделен из клетки-хозяина, экспрессирующей мутантный полипептид. В некоторых вариантах осуществления из клетки-хозяина готовят экстракт и мутантный полипептид AR выделяют с помощью способов очистки, таких как, без ограничений, хроматография или иммуноаффинность с антителом, которое специфично к полипептидам AR или специфично, в частности, к мутантному полипептиду AR.

#### **Антитела**

В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с мутантным полипептидом AR, предложенным в настоящем документе, и связывается с меньшей аффинностью или не связывается с полипептидом AR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления антитело связывается с мутантным полипептидом AR при наличии ингибитора второго поколения, такого как, без ограничений, ARN-509, энзалутамид (MDV3100) или RD162.

В некоторых вариантах осуществления предложенный в настоящем документе мутантный полипептид AR детектируется с применением антител, которые специфически распознают мутантные полипептиды AR, но не распознают полипептиды AR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления предложенный в настоящем документе мутантный полипептид AR детектируется с применением



антител, которые специфически распознают мутантный полипептид AR, имеющий лейцин в аминокислотной позиции 876, но не распознают полипептиды AR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления антитела вырабатываются против одной или более аллельных форм мутантного полипептида AR, предложенного в настоящем документе. Методики применения специфического белка или олигопептида в качестве антигена для стимуляции антител, которые специфически распознают эпитопы на пептиде или белке, хорошо известны. В одном варианте осуществления последовательность ДНК желательной аллельной формы гена-мишени клонируют путем вставки в соответствующий вектор экспрессии и транслируют в белок в прокариотической или эукариотической клетке-хозяине. Белок можно извлечь и применять в качестве антигена для стимуляции продукции специфических антител. В другом варианте осуществления ДНК желательной аллельной формы гена-мишени амплифицируют с помощью технологии ПЦР и впоследствии транслируют *in vitro* в белок для применения в качестве антигена для стимуляции продукции специфических антител. В другом варианте осуществления последовательность ДНК альтернативных аллелей применяют в качестве основы для создания синтетических пептидов, представляющих аминокислотную последовательность аллелей, для применения в качестве антигена для стимуляции продукции специфических антител.

В некоторых вариантах осуществления антитела создают либо с использованием стандартных методик получения моноклональных антител, либо с использованием экспрессирующих систем рекомбинантного типа. См. по существу публикацию Abbas, Lichtman, and Pober, Cellular and Molecular Immunology, W. B. Saunders Co. (1991 г.). Термин «антитела» призван включать молекулы интактных антител, а также фрагменты или производные антител, такие как Fab и F(ab')<sub>2</sub>, которые способны специфически связываться с антигеном. Продуцируемые таким образом антитела предпочтительно связываются только с мутантным белком, продуцируемым в аллельной форме, которая применялась в качестве антигена для создания антитела. Способы создания аллельспецифических антител также описаны в патенте США № 6200754

и патенте США № 6054273, полное содержание которых включено в настоящий документ путем ссылки.

В некоторых вариантах осуществления предложенное в настоящем документе антитело представляет собой гуманизированное антитело. Термин «гуманизированное антитело» относится к типу сконструированного антитела, гипервариабельные участки (CDR) которого получены из иммуноглобулина от донора, отличного от человека, а остальные полученные из иммуноглобулина части молекулы получены из одного или более иммуноглобулинов человека. В некоторых вариантах осуществления поддерживающие каркас остатки изменяют для сохранения аффинности связывания (см., например, Queen et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:10029-10032 (1989 г.), Hodgson et al. Bio/Technology, 9:421 (1991 г.)). В некоторых вариантах осуществления подходящее человеческое антитело-акцептор выбрано из традиционной базы данных, например базы данных KAVAT®, базы данных Los Alamos или базы данных Swiss Protein, по гомологии с нуклеотидной и аминокислотной последовательностями антитела-донора. В некоторых вариантах осуществления антитело человека, характеризующее гомологией с каркасными областями антитела-донора (на аминокислотной основе), может подходить для создания константной области тяжелой цепи и/или вариабельной каркасной области тяжелой цепи для вставки CDR донора. В некоторых вариантах осуществления подходящее антитело-акцептор, способное дать константные или вариабельные каркасные области легкой цепи, выбирают аналогичным образом. В некоторых вариантах осуществления источником тяжелых и легких цепей антитела-акцептора является одно и то же антитело-акцептор. В некоторых вариантах осуществления источниками тяжелых и легких цепей антитела-акцептора являются разные антитела-акцепторы. На предшествующем уровне техники описаны несколько способов получения таких гуманизированных антител - см., например, патенты EP-A-0239400 и EP-A-054951.

В некоторых вариантах осуществления антитела, специфичные к предложенному в настоящем документе мутантному полипептиду AR, можно применять для детекции наличия предложенного в

настоящем документе мутантного полипептида AR в образце, например анализируемом образце, клеточном образце, клеточном экстракте, биологическом образце или образце пациента, применяя методики, известные в данной области. Данные методики включают, например, вестерн-блоттинг, иммуногистохимию, непрямую иммунофлуоресценцию и микроматрицы с антителами. В некоторых вариантах осуществления антитела, которые специфично распознают мутантный полипептид AR, представляют собой ингибиторы AR третьего поколения. В некоторых вариантах осуществления способность антитела, которое специфично распознает мутантный полипептид AR, к ингибированию биологической активности мутантного полипептида AR, может быть определена с применением способов, описанных в настоящем документе, для выявления ингибиторов AR третьего поколения.

**Диагностические анализы для детекции мутантных полипептидов AR и нуклеиновых кислот, кодирующих мутантные полипептиды AR**

В настоящем документе предложены диагностические способы, которые включают детекцию мутантного полипептида AR у субъекта или нуклеиновой кислоты, кодирующей мутантный полипептид AR у субъекта. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется AR-опосредованное заболевание или состояние. В некоторых вариантах осуществления диагностические способы используют для скрининга субъектов, у которых имеется рак, резистентный к терапии антиандрогеном, таким как антагонист AR первого или второго поколения, выявления субъектов для лечения антиандрогеном, таким как антагонист AR первого или второго поколения, контроля за терапией субъектов, получающих антиандрогенную терапию, такую как антагонист AR первого или второго поколения, оптимизации терапии субъектов, получающих антиандрогенную терапию, такую как антагонист AR первого или второго поколения, а также их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления способы включают выбор субъекта для терапии антагонистом AR третьего поколения. В некоторых вариантах осуществления способы дополнительно включают введение субъекту антагониста AR третьего поколения, как описано в настоящем

документе. В некоторых вариантах осуществления обнаруженный мутантный полипептид AR содержит модификацию в позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 полипептида AR дикого типа, представленного в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления обнаруженный мутантный полипептид AR содержит замену аминокислоты фенилаланин на лейцин в позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 полипептида AR дикого типа, представленного в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления субъект, имеющий мутантный полипептид AR, содержащий модификацию в аминокислотной позиции 876, является резистентным к ингибированию антагонистом первого или второго поколения.

В некоторых вариантах осуществления субъект, имеющий мутантный полипептид AR, содержащий модификацию в аминокислотной позиции 876, является резистентным к ингибированию антагонистом первого или второго поколения. В некоторых вариантах осуществления субъект, имеющий мутантный полипептид AR, содержащий модификацию в аминокислотной позиции 876, является резистентным к ингибированию антагонистом первого и второго поколения. В некоторых вариантах осуществления субъект, имеющий мутантный полипептид AR, содержащий лейцин в аминокислотной позиции 876, является резистентным к ингибированию антагонистом первого или второго поколения. В некоторых вариантах осуществления субъект, имеющий мутантный полипептид AR, содержащий лейцин в аминокислотной позиции 876, является резистентным к ингибированию антагонистом первого и второго поколения. В некоторых вариантах осуществления субъект, имеющий мутантный полипептид AR, содержащий модификацию в аминокислотной позиции 876, является резистентным к ингибированию ингибитором CYP17A, который связывается с AR, таким как, например, галетерон (ТОК001), ТАК-700 или абиратерона ацетат. В некоторых вариантах осуществления субъект, имеющий мутантный полипептид AR, содержащий модификацию в аминокислотной позиции 876, является резистентным к ингибированию ингибитором CYP17A, который связывается с AR, таким как, например, галетерон (ТОК001), ТАК-700 или

абиратерона ацетат.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы характеристики полипептида AR, который является резистентным к ингибированию антагонистом AR второго поколения, у субъекта, включающие: (a) анализ образца, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид AR, от субъекта, чтобы определить, модифицирован ли кодированный полипептид AR по аминокислотной позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1; и (b) характеристику AR как резистентного к ингибированию антагонистом AR второго поколения при наличии у субъекта модификации. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение антагониста AR третьего поколения, предложенного в настоящем документе, для ингибирования мутантного AR. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает невведение антагониста AR второго поколения. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение антагониста AR второго поколения при отсутствии у субъекта модификации. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется кастрационно-резистентный рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию получения образца нуклеиновой кислоты от субъекта.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы характеристики AR, который является резистентным к ингибированию антагонистом AR первого поколения, у субъекта, включающие: (a) анализ образца, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид AR, от субъекта, чтобы определить, модифицирован ли кодированный полипептид AR по аминокислотной позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1; и (b) характеристику AR как резистентного к ингибированию антагонистом AR первого поколения при наличии у

субъекта модификации. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение антагониста AR третьего поколения, предложенного в настоящем документе, для ингибирования мутантного AR. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает невведение антагониста AR второго поколения. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение антагониста AR второго поколения при отсутствии у субъекта модификации. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется кастрационно-резистентный рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает получение образца нуклеиновой кислоты от субъекта.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы характеристики AR, который является резистентным к ингибированию антагонистом AR, который представляет собой ингибитор CYP17A, у субъекта, включающие: (a) анализ образца, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид AR, от субъекта, чтобы определить, модифицирован ли кодированный полипептид AR по аминокислотной позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1; и (b) характеристику AR как резистентного к ингибированию антагонистом AR, который представляет собой ингибитор CYP17A, при наличии у субъекта модификации. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение антагониста AR третьего поколения, предложенного в настоящем документе, для ингибирования мутантного AR. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает невведение антагониста AR второго поколения. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение антагониста AR второго поколения при отсутствии у субъекта модификации. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак. В некоторых вариантах осуществления у субъекта

имеется рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется кастрационно-резистентный рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления ингибитор CYP17A представляет собой галетерон (ТОК001), ТАК-700 или абиратерона ацетат. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает получение образца нуклеиновой кислоты от субъекта.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы выбора субъекта для терапии антагонистом AR второго поколения, включающие (a) анализ образца, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид AR, от субъекта, чтобы определить, модифицирован ли кодированный полипептид AR по аминокислотной позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1; и (b) характеристику субъекта как кандидата на терапию антагонистом AR второго поколения при отсутствии у субъекта модификации. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает характеристику субъекта как не кандидата на терапию антагонистом AR второго поколения при наличии у субъекта модификации. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение антагониста AR третьего поколения, предложенного в настоящем документе, для ингибирования мутантного AR. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется кастрационно-резистентный рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию получения образца нуклеиновой кислоты от субъекта.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы выбора субъекта для терапии антагонистом AR первого поколения, включающие: (a) анализ образца, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид AR, от субъекта, чтобы определить, модифицирован ли кодированный полипептид AR по аминокислотной позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 аминокислотной последовательности, представленной в

SEQ ID NO: 1; и (b) характеристику субъекта как кандидата на терапию антагонистом AR первого поколения при отсутствии у субъекта модификации. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает характеристику субъекта как не кандидата на терапию антагонистом AR первого поколения при наличии у субъекта модификации. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение антагониста AR третьего поколения, предложенного в настоящем документе, для ингибирования мутантного AR. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется кастрационно-резистентный рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию получения образца нуклеиновой кислоты от субъекта.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы выбора субъекта для терапии антагонистом AR, который представляет собой ингибитор CYP17A, включающие: (a) анализ образца, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид AR, от субъекта, чтобы определить, модифицирован ли кодированный полипептид AR по аминокислотной позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1; и (b) характеристику субъекта как кандидата на терапию антагонистом AR, который представляет собой ингибитор CYP17A, при отсутствии у субъекта модификации. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает характеристику субъекта как не кандидата на терапию ингибитором CYP17A при наличии у субъекта модификации. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение антагониста AR третьего поколения, предложенного в настоящем документе, для ингибирования мутантного AR. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется кастрационно-резистентный рак предстательной железы. В



некоторых вариантах осуществления ингибитор CYP17A представляет собой галетерон (ТОК001), ТАК-700 или абиратерона ацетат. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию получения образца нуклеиновой кислоты от субъекта.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы выбора субъекта для терапии антагонистом AR третьего поколения, включающие: (a) анализ образца, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид AR, от субъекта, чтобы определить, модифицирован ли кодированный полипептид AR по аминокислотной позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1; и (b) характеристику субъекта как кандидата на терапию антагонистом AR третьего поколения при наличии у субъекта модификации. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение антагониста AR третьего поколения, предложенного в настоящем документе, для ингибирования мутантного AR. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется кастрационно-резистентный рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию получения образца нуклеиновой кислоты от субъекта.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы определения имеющейся или потенциальной резистентности субъекта к терапии антагонистом AR второго поколения, включающие: (a) анализ образца, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид AR, от субъекта, чтобы определить, модифицирован ли кодированный полипептид AR по аминокислотной позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1; и (b) характеристику субъекта как резистентного или потенциально резистентного к терапии антагонистом AR второго поколения при наличии у субъекта модификации. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение ингибитора AR третьего поколения, предложенного в настоящем

документе, для ингибирования мутантного AR. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется кастрационно-резистентный рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию получения образца нуклеиновой кислоты от субъекта.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы определения имеющейся или потенциальной резистентности субъекта к терапии антагонистом AR первого поколения, включающие: (a) анализ образца, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид AR, от субъекта, чтобы определить, модифицирован ли кодированный полипептид AR по аминокислотной позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1; и (b) характеристику субъекта как резистентного или потенциально резистентного к терапии антагонистом AR первого поколения при наличии у субъекта модификации. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение ингибитора AR третьего поколения, предложенного в настоящем документе, для ингибирования мутантного AR. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется кастрационно-резистентный рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию получения образца нуклеиновой кислоты от субъекта.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы определения имеющейся или потенциальной резистентности субъекта к терапии антагонистом AR, который представляет собой ингибитор CYP17A, включающие: (a) анализ образца, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид AR, от субъекта, чтобы определить, модифицирован ли кодированный полипептид AR по аминокислотной позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1; и (b) характеристику субъекта как резистентного

или потенциально резистентного к терапии антагонистом AR, который представляет собой ингибитор CYP17A, при наличии у субъекта модификации. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение ингибитора AR третьего поколения, предложенного в настоящем документе, для ингибирования мутантного AR. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется кастрационно-резистентный рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления ингибитор CYP17A представляет собой галетерон (ТОК001), ТАК-700 или абиратерона ацетат. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию получения образца нуклеиновой кислоты от субъекта.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы контроля развития или потенциального развития у субъекта, получающего антагонист AR второго поколения для лечения рака, резистентности к терапии, включающие: (a) анализ образца, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид AR, от субъекта, чтобы определить, модифицирован ли кодированный полипептид AR по аминокислотной позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1; и (b) характеристику субъекта как резистентного или потенциально резистентного к терапии антагонистом AR второго поколения при наличии у субъекта модификации. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение антагониста AR третьего поколения, предложенного в настоящем документе, для ингибирования мутантного AR. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется кастрационно-резистентный рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию получения образца нуклеиновой кислоты от субъекта.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы

контроля развития или потенциального развития у субъекта, получающего антагонист AR первого поколения для лечения рака, резистентности к терапии, включающие: (a) анализ образца, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид AR, от субъекта, чтобы определить, модифицирован ли кодированный полипептид AR по аминокислотной позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1; и (b) характеристику субъекта как резистентного или потенциально резистентного к терапии антагонистом AR первого поколения при наличии у субъекта модификации. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение антагониста AR третьего поколения, предложенного в настоящем документе, для ингибирования мутантного AR. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется кастрационно-резистентный рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию получения образца нуклеиновой кислоты от субъекта.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы контроля развития или потенциального развития у субъекта, получающего антагонист AR, который представляет собой ингибитор CYP17A, для лечения рака, резистентности к терапии, включающие: (a) анализ образца, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид AR, от субъекта, чтобы определить, модифицирован ли кодированный полипептид AR по аминокислотной позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1; и (b) характеристику субъекта как резистентного или потенциально резистентного к терапии антагонистом AR, который представляет собой ингибитор CYP17A, при наличии у субъекта модификации. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение антагониста AR третьего поколения, предложенного в настоящем документе, для ингибирования мутантного AR. В некоторых вариантах

осуществления у субъекта имеется рак. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется кастрационно-резистентный рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления ингибитор CYP17A представляет собой галетерон (ТОК001), ТАК-700 или абиратерона ацетат. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию получения образца нуклеиновой кислоты от субъекта.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы оптимизации терапии субъекта, получающего антагонист AR второго поколения для лечения рака, включающие: (a) анализ образца, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид AR, от субъекта, чтобы определить, модифицирован ли кодированный полипептид AR по аминокислотной позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1; и (b) прекращение лечения антагонистом AR второго поколения при наличии у субъекта модификации или продолжение лечения антагонистом AR второго поколения при отсутствии у субъекта модификации. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию получения образца нуклеиновой кислоты от субъекта.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы оптимизации терапии субъекта, получающего антагонист AR первого поколения для лечения рака, включающие: (a) анализ образца, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид AR, от субъекта, чтобы определить, модифицирован ли кодированный полипептид AR по аминокислотной позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1; и (b) прекращение лечения антагонистом AR первого поколения при наличии у субъекта модификации или продолжение лечения антагонистом AR первого поколения при отсутствии у субъекта модификации. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию получения образца нуклеиновой кислоты от субъекта.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы оптимизации терапии субъекта, получающего антагонист AR, который представляет собой ингибитор CYP17A, для лечения рака, включающие: (a) анализ образца, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид AR, от субъекта, чтобы определить, модифицирован ли кодированный полипептид AR по аминокислотной позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1; и (b) прекращение лечения антагонистом AR, который представляет собой ингибитор CYP17A, при наличии у субъекта модификации или продолжение лечения антагонистом AR, который представляет собой ингибитор CYP17A при отсутствии у субъекта модификации. В некоторых вариантах осуществления ингибитор CYP17A представляет собой галетерон (ТОК001), ТАК-700 или абиратерона ацетат. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает стадию получения образца нуклеиновой кислоты от субъекта.

В некоторых вариантах осуществления модифицированный AR является резистентным к проявлению полного антагонизма со стороны антагониста AR второго поколения, такого как, например, ARN-509, энзалутамид (MDV3100) или RD162. В некоторых вариантах осуществления антагонист AR второго поколения, такой как, например, ARN-509, энзалутамид (MDV3100) или RD162, показывает активность в качестве агониста к модифицированному AR. В некоторых вариантах осуществления модифицированный AR является резистентным к проявлению полного антагонизма со стороны антагониста AR первого поколения. В некоторых вариантах осуществления модифицированный AR является резистентным к проявлению полного антагонизма со стороны антагониста AR, который представляет собой CYP17A.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется AR-зависимое или AR-опосредованное заболевание или состояние. В некоторых вариантах осуществления AR-зависимое или AR-опосредованное заболевание или состояние представляет собой доброкачественную гиперплазию предстательной железы, гирсутизм, угревую сыпь, аденомы и неоплазмы предстательной железы,

доброкачественные или злокачественные опухолевые клетки, содержащие AR, сверхволосатость, себорею, эндометриоз, синдром поликистоза яичников, андрогенную плешивость, гипогонадизм, остеопороз, подавление сперматогенеза, либидо, истощение, анорексию, андрогенную поддерживающую терапию при возрастном снижении уровней тестостерона, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак мочевого пузыря, рак печени, рак эндометрия, рак матки, приливы, болезнь Кеннеди, мышечную атрофию и слабость, кожную атрофию, утрату костной ткани, анемию, атеросклероз, сердечно-сосудистое заболевание, утрату энергии, утрату хорошего самочувствия, диабет 2 типа или накопление брюшного жира.

В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется рак. В некоторых вариантах осуществления у субъекта имеется солидная опухоль. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы, рак молочной железы, рак печени или рак мочевого пузыря. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы.

В некоторых вариантах осуществления образец получают из любой ткани или текучей среды организма. Образцы включают, без ограничений, цельную кровь, отторгнутый костный мозг, аспират костного мозга, плевральную текучую среду, перитонеальную текучую среду, центральнospинальную текучую среду, брюшинную текучую среду, панкреатическую текучую среду, цереброспинальную текучую среду, мозговую текучую среду, асцит, перикардальную текучую среду, мочу, слюну, бронхиальный лаваж, пот, слезы, ушной секрет, мокроту, текучую среду гидроцеле, сперму, вагинальный секрет, молоко, амниотическую текучую среду и секреты дыхательного, желудочно-кишечного или мочеполового тракта. В конкретных вариантах осуществления образец представляет собой образец биопсии опухоли. В конкретных вариантах осуществления образец представляет собой образец текучей среды или ткани, которая является частью или связана с лимфатической системой или системой кровообращения. В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец

крови, который представляет собой образец венозной, артериальной, периферической, тканевой или пуповинной крови. В конкретных вариантах осуществления образец представляет собой образец сыворотки. В некоторых вариантах осуществления образец содержит одну или более циркулирующих опухолевых клеток (СТС). В некоторых вариантах осуществления образец содержит одну или более клеток диссеминированной опухоли (DTC, например в образце аспирата костного мозга).

Способы выделения нуклеиновых кислот и белков из клеток, содержащихся в образцах ткани и текучей среды, хорошо известны в данной области. В конкретных вариантах осуществления образец нуклеиновой кислоты, полученный от субъекта, выделяют из клеток, содержащихся в биопсии опухоли субъекта. В конкретных вариантах осуществления образец нуклеиновой кислоты, полученный от субъекта, выделяют из клеток аспирата костного мозга. В конкретных вариантах осуществления образец нуклеиновой кислоты, полученный от субъекта, выделяют из клеток, содержащихся в образце сыворотки. В конкретных вариантах осуществления образец нуклеиновой кислоты, полученный от субъекта, выделяют из клеток, содержащихся в образце лимфы.

В некоторых вариантах осуществления образцы получают от субъекта с помощью любого подходящего средства получения образца с применением хорошо известных стандартных клинических способов. Процедуры получения образцов текучей среды от субъекта хорошо известны. Например, процедуры забора и обработки цельной крови и лимфы хорошо известны и могут использоваться для получения образца для применения в предложенных способах. Как правило, для сбора образца крови добавляют антикоагулирующий агент (например, ЭДТА, или цитрат и гепарин, или CPD (цитрат, фосфат, декстроза), или сравнимые соединения) для предотвращения коагуляции крови. В некоторых примерах образец крови собирают в пробирку для сбора, которая содержит количество ЭДТА для предотвращения коагуляции образца крови.

В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой биопсию ткани и получен, например, с помощью пункционной



биопсии, пункционной биопсии под контролем КТ, аспирационной биопсии, эндоскопической биопсии, бронхоскопической биопсии, бронхиального лаважа, инцизионной биопсии, эксцизионной биопсии, пункционной биопсии, бритвенной биопсии, кожной биопсии, биопсии костного мозга и процедуры электрохирургической эксцизии петлей (LEEP). Как правило, получают некротические стерильные биопсии или образцы более 100 мг, но которые могут быть меньше, например менее 100 мг, 50 мг или менее, 10 мг или менее или 5 мг или менее; или больше, например более 100 мг, 200 мг или более, или 500 мг или более, 1 г или более, 2 г или более, 3 г или более, 4 г или более или 5 г или более. Размер экстрагируемого для анализа образца зависит от ряда факторов, включая, без ограничений, число анализов, которые необходимо выполнить, состояние здоровья образца ткани, тип рака и состояние пациента. В некоторых вариантах осуществления ткань помещают в стерильный сосуд, такой как стерильная пробирка или культуральный планшет, и необязательно погружают в соответствующую среду. Как правило, клетки диссоциируют в клеточные суспензии с помощью средства механической обработки и/или ферментативной обработки, как хорошо известно специалистам в данной области. Как правило, клетки собирают, и затем проводят с ними стандартные процедуры для выделения нуклеиновой кислоты для анализа.

В некоторых вариантах осуществления образцы получают от субъекта через равные интервалы, такие как, например, один день, два дня, три дня, четыре дня, пять дней, шесть дней, одна неделя, две недели, три недели, четыре недели, один месяц, два месяца, три месяца, четыре месяца, пять месяцев, шесть месяцев, один год, раз в день, раз в неделю, два раза в месяц, раз в квартал, два раза в год или раз в год. В некоторых вариантах осуществления сбор образцов проводят через заданное время или через равные интервалы для лечения одним или более противораковыми агентами. В некоторых вариантах осуществления сбор образцов проводят через заданное время или через равные интервалы для лечения антагонистом AR, таким как антагонист AR первого или второго поколения. Например, образец собирают через

заданное время или через равные интервалы до, во время или после лечения или между последовательными курсами лечения. В конкретных примерах образец получают от субъекта до начала противораковой терапии и затем повторно через равные интервалы после начала лечения. В конкретных примерах образец получают от субъекта до начала терапии антагонистом AR, таким как антагонист AR первого или второго поколения, и затем повторно через равные интервалы после начала лечения. В некоторых вариантах осуществления антагониста AR выбирают среди бикалутамида, флутамида, гидроксифлутамида, нилутамида, ARN-509, энзалутамида (MDV3100) и RD162. В некоторых вариантах осуществления антагонист AR представляет собой ингибитор CYP17A. В некоторых вариантах осуществления ингибитор CYP17A выбирают среди галетерона (ТОК001), ТАК-700 или абиратерона ацетата.

Объем образца текучей среды может представлять собой любой объем, подходящий для обнаружения мутантного AR в предложенных способах. В некоторых примерах объем образца текучей среды зависит от конкретного применяемого способа анализа. Например, конкретные способы анализа могут требовать большего или меньшего объема образца текучей среды в зависимости от факторов, таких как, без ограничений, емкость устройства или применяемый способ и уровень пропускной способности способа анализа. В некоторых примерах образец текучей среды разбавляют в соответствующей среде перед применением способа анализа. В некоторых примерах образец текучей среды получают от субъекта и в способе анализа применяют часть или аликвоту образца. Часть или аликвоту можно разбавить в соответствующей среде перед применением способа анализа.

В некоторых вариантах осуществления образец получают от субъекта, который является млекопитающим. Примеры субъектов-млекопитающих, без ограничений, включают приматов, таких как люди, человекообразные обезьяны и обезьяны; грызунов, таких как мыши, крысы, кролики и хорьки; жвачных, таких как козы, коровы, олени и овцы; лошадей, свиней, собак, кошек и других животных. В некоторых вариантах осуществления образец получают от

пациента. В некоторых примерах пациент представляет собой пациента-человека.

В некоторых вариантах осуществления полученный от субъекта образец нуклеиновой кислоты представляет собой образец геномной нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления полученный от субъекта образец нуклеиновой кислоты представляет собой образец РНК. В некоторых вариантах осуществления мРНК выделяют из общей РНК в образце РНК. В некоторых вариантах осуществления проводят обратную транскрипцию образца РНК в кДНК. В некоторых вариантах осуществления образец геномной нуклеиновой кислоты амплифицируют с помощью способа амплификации нуклеиновых кислот. В некоторых вариантах осуществления способ амплификации нуклеиновых кислот представляет собой полимеразную цепную реакцию (ПЦР). В некоторых вариантах осуществления образец геномной нуклеиновой кислоты амплифицируют с помощью набора нуклеотидных праймеров, специфичных к гену AR. В некоторых вариантах осуществления набор нуклеотидных праймеров фланкирует нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислоту 876 полипептида AR. В некоторых вариантах осуществления продукт амплификации представляет собой нуклеиновую кислоту, кодирующую аминокислотную позицию 876 полипептида AR. В некоторых вариантах осуществления специфичный к последовательности праймер конъюгируют с обнаружимой молекулой, такой как флуоресцентная метка, биолюминесцентная метка, хемилюминесцентная метка, радиометка, ферментная метка, обнаружимый субстрат или пептид или молекула, которые связываются со второй обнаружимой молекулой.

В некоторых вариантах осуществления анализ содержит секвенирование образца нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления кодирующую AR нуклеиновую кислоту в образце нуклеиновой кислоты сначала амплифицируют способом, таким как полимеразная цепная реакция (ПЦР), применяя специфичные к последовательности праймеры, и затем амплифицированный ПЦР-фрагмент секвенируют. Примеры способов секвенирования для применения в способах, предложенных в

настоящем документе, хорошо известны в данной области и включают, без ограничений, способы обрыва цепи дидезоксирибонуклеотидами, секвенирование по Максаму-Гилберту, массивно-параллельное опознавательное секвенирование (или MPSS), полони-секвенирование, пиросеквенирование, секвенирование с обрывом цепи красителем Illumina, секвенирование лигированием (SOLiD), ионное полупроводниковое секвенирование, секвенирование с наночастицами ДНК, секвенирование Heliscope и секвенирование отдельных молекул в реальном времени (SMRT).

В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец плазмы или сыворотки, содержащий ДНК (цДНК), РНК (цРНК) или микроРНК циркулирующей опухоли (см., например, Chan et al. (2007 г.) *Br J Cancer*. 96(5):681-5). В некоторых вариантах осуществления кодирующую мутантный AR ДНК анализируют по способу ПЦР-секвенирования BEAMing (гранулы, амплификация, эмульсия, магнит) (см., например, Li et al. (2006 г.) *Nat Methods*. 3(2):95-7; Li et al. (2006 г.) *Nat Methods*. 3(7):551-9; и Diehl et al. (2008 г.) *Nat Med*. 14(9): 985-990). BEAMing представляет собой методику, в которой индивидуальные молекулы ДНК прикрепляют к магнитным гранулам в эмульсиях типа «вода в масле» и затем после компартиментализации подвергают ПЦР-амплификации. Затем мутационный статус связанной с гранулами ДНК определяют путем гибридизации с флуоресцентными аллельспецифичными зондами для мутантных AR или AR дикого типа. После этого для количественного определения уровня мутантной ДНК, присутствующей в плазме или сыворотке, применяют проточную цитометрию (см., например, Higgins et al. (2012 г.) *Clin Cancer Res* 18: 3462-3469).

В некоторых вариантах осуществления анализ образца для детекции наличия кодирующей мутантный AR ДНК содержит детекцию мутации с помощью специфичного к последовательности олигонуклеотидного зонда, который специфичен к нуклеиновой кислоте, которая кодирует мутантный AR, но не AR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления анализ содержит (а) приведение образца в контакт с олигонуклеотидным зондом,

специфичным к нуклеотидной последовательности мутантного AR, где при наличии в образце мутантной нуклеотидной последовательности образуется комплекс зонд-ДНК, и (b) детекцию комплекса зонд-ДНК. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотидный зонд специфичен к нуклеиновой кислоте, кодирующей лейцин в позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 полипептида AR. В некоторых вариантах осуществления специфичный к последовательности зонд конъюгирован с обнаружимой молекулой, такой как флуоресцентная метка, биолюминесцентная метка, хемилюминесцентная метка, радиоизотопная метка, ферментативная метка, обнаружимый субстрат или пептид или молекула, которая связывается со второй обнаружимой молекулой.

В некоторых вариантах осуществления однонуклеотидные изменения обнаружимы за счет ПЦР с применением ПЦР-маркеров рестрикционного полиморфизма амплифицированных последовательностей (CAPS), которые создают сайты рестрикции в мутантных последовательностях (Michaels et al (1998 г.) *Plant J.* 14(3):381-5), или специфичные к последовательности шпилькообразные зонды, прикрепленные к обнаружимым фрагментам, таким как, без ограничений, флуорофор (Mhlanga and Malmberg (2001 г.) *Methods* 25:463-471). В некоторых вариантах осуществления специфичный к последовательности зонд конъюгирован с обнаружимой молекулой, такой как флуоресцентная метка, биолюминесцентная метка, хемилюминесцентная метка, радиоизотопная метка, ферментативная метка, обнаружимый субстрат или пептид или молекула, которая связывается со второй обнаружимой молекулой. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотидный зонд специфичен к нуклеиновой кислоте, кодирующей лейцин в позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 полипептида AR.

В некоторых вариантах осуществления анализ образца для детекции наличия кодирующей мутантный AR ДНК проводят с применением олигонуклеотидной матрицы (см., например, Nastia et al. (1999 г.) *J Med Genet.* 36(10):730-6). В некоторых вариантах осуществления образец, содержащий нуклеиновую кислоту от

субъекта, гибридизуют непосредственно на чип. В некоторых вариантах осуществления образец, содержащий нуклеиновую кислоту от субъекта, амплифицируют по способу амплификации, такому как, без ограничений, полимеразная цепная реакция (ПЦР), и амплифицированную нуклеиновую кислоту гибридизуют на чип. В некоторых вариантах осуществления олигонуклеотидная матрица содержится на микрочипе. В некоторых вариантах осуществления однонуклеотидные изменения обнаружимы с применением микрочипов.

В некоторых вариантах осуществления анализ образца содержит детекцию мутации антителом, специфичным к мутантному полипептиду AR. В некоторых вариантах осуществления способ детекции мутантного полипептида AR включает получение образца от субъекта, причем образец содержит полипептид AR, и тестирование образца на наличие мутантного полипептида AR путем приведения образца в контакт с антителом, которое специфично для связывания с мутантным полипептидом AR и не связывается или связывается со сниженной аффинностью с полипептидом AR дикого типа, причем наличие мутантного полипептида AR создает комплекс антитело-мутантный полипептид AR. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает детекцию комплекса антитело-мутантный полипептид AR. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает детекцию комплекса антитело-мутантный полипептид AR проявляющим реагентом. В некоторых вариантах осуществления специфичное к мутантному AR антитело конъюгировано с обнаружимой молекулой, такой как флуоресцентная метка, биолюминесцентная метка, хемилюминесцентная метка, радиоизотопная метка, ферментативная метка, обнаружимый субстрат или пептид или молекула, которая связывается со второй обнаружимой молекулой (например, вторичным антителом). В некоторых вариантах осуществления связывание специфичного к мутантному AR антитела обнаружимо с помощью анализа на обнаружимую молекулу. В некоторых вариантах осуществления связывание специфичного к мутантному AR антитела детектируется с применением вторичного антитела (например, анти-IgG). В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец биопсии опухоли, образец аспирата

костного мозга, образец крови, образец сыворотки или образец лимфы.

**Выявление молекул, которые взаимодействуют с мутантным андрогенным рецептором**

В настоящем документе предложены способы применения мутантных полипептидов AR для скрининга соединений, которые ингибируют мутантный рецептор (т.е. соединений-ингибиторов AR третьего поколения). В некоторых вариантах осуществления способы используют для выявления соединений-ингибиторов AR третьего поколения для лечения рака. В некоторых вариантах осуществления способы используют для выявления соединений-ингибиторов AR третьего поколения для лечения резистентных раков, таких как рак предстательной железы, резистентный к лечению антагонистами AR второго поколения, такими как ARN-509, энзалутамид (MDV3100) или RD162.

В некоторых вариантах осуществления способ выявления соединений-ингибиторов AR третьего поколения включает (а) экспрессию предложенного в настоящем документе мутантного полипептида AR в клетке, (b) приведение клетки в контакт с тестируемым соединением и (c) детекцию уровня активности AR в клетке. В некоторых вариантах осуществления клетку приводят в контакт с агонистом AR до или одновременно с приведением клетки в контакт с тестируемым соединением. В некоторых вариантах осуществления клетку приводят в контакт с агонистом AR приблизительно на 1 час, 2 часа, 3 часа, 4 часа, 5 часов, 6 часов, 8 часов, 10 часов, 12 часов, 14 часов, 16 часов, 18 часов, 20 часов, 22 часа, 24 часа или более до приведения клетки в контакт с тестируемым соединением. В некоторых вариантах осуществления клетку приводят в контакт с агонистом AR одновременно с приведением клетки в контакт с тестируемым соединением. В некоторых вариантах осуществления агониста AR выбирают среди метилтриенолона (R1881), DHT, миболерона (Mb) и тестостерона. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит аминокислотную замену в позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 полипептида AR дикого типа, представленного в SEQ ID NO: 1. В некоторых

вариантах осуществления мутантный полипептид AR не содержит фенилаланин в аминокислотной позиции 876 в полипептиде. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит лейцин в аминокислотной позиции 876 в полипептиде.

В некоторых вариантах осуществления применяют клеточную линию, которую можно трансфицировать нуклеиновой кислотой, кодирующей мутантный полипептид AR, и в которой можно контролировать активность AR. В некоторых вариантах осуществления клетка не экспрессирует AR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует низкий уровень AR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления клетка экспрессирует эндогенный мутантный полипептид AR. В некоторых вариантах осуществления эндогенный мутантный полипептид AR содержит модификацию в аминокислотной позиции, соответствующей аминокислотной позиции 877 полипептида AR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления эндогенный мутантный полипептид AR содержит модификацию, которая представляет собой замену треонина на аланин в аминокислотной позиции 877 (T877A). В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит модификацию в аминокислотной позиции, соответствующей аминокислотной позиции 874 полипептида AR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит модификацию, которая представляет собой замену гистидина на тирозин в аминокислотной позиции 874 (H874Y). В некоторых вариантах осуществления клетка выбрана среди HeLa, CV1, COS7, HepG2, HEK-293, DU145, PC3 и TSY-PR1. В некоторых вариантах осуществления клеточная линия представляет собой клеточную линию рака предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления клеточную линию выбирают среди CWR, LNCaP, VCaP и LAPC4.

В некоторых вариантах осуществления клетка стабильно экспрессирует мутантный полипептид AR. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая мутантный полипептид AR, встроена в геном клетки.

В некоторых вариантах осуществления уровень активности AR детектируют с применением репортерного гена, функционально



связанного с чувствительным к AR промотором. В некоторых вариантах осуществления чувствительный к AR промотор содержит один или более чувствительных к андрогену элементов (ARE), с которыми связан мутантный полипептид AR. В некоторых вариантах осуществления промотор выбирают среди пробазина (Pb), простатспецифического антигена (ПСА), длинного концевого повтора вируса опухоли молочной железы мышей (MMTV LTR), синтазы жирных кислот (FASN), шестого трансмембранного эпителиального антигена предстательной железы 4 (STEAP4), сериновой трансмембранной протеазы 2 (TMPRSS2), альфа-1-кислого гликопротеина 1 (ORM1) или промотора человеческого гомеобоксного гена NKX3.1. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой синтетический промотор, содержащий один или более ARE.

В некоторых вариантах осуществления чувствительный к AR промотор функционально связан с подходящим репортерным геном, который кодирует обнаружимый белок. Примеры обнаружимых белков, без ограничений, включают люциферазу, флуоресцентные белки, биолюминесцентные белки,  $\beta$ -галактозидазу, щелочную фосфатазу и хлорамфеникол-ацетилтрансферазу. В некоторых вариантах осуществления снижение экспрессии репортерного гена после воздействия тестируемого соединения в сравнении с соответствующим контролем указывает на то, что тестируемое соединение является эффективным для ингибирования мутантного полипептида AR. В некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой базальную экспрессию репортерного гена до воздействия на клетку тестируемого соединения. В некоторых вариантах осуществления экспрессию репортерного гена анализируют с применением клеточного экстракта, полученного из тестируемых клеток.

В некоторых вариантах осуществления уровень активности AR детектируют путем измерения экспрессии одного или более эндогенных чувствительных к андрогену генов в клетке. В некоторых вариантах осуществления чувствительный к андрогену ген регулируется положительно (т.е. индуцируется) в ответ на обработку андрогеном. В некоторых вариантах осуществления

чувствительный к андрогену ген регулируется отрицательно (т.е. подавляется) в ответ на обработку андрогеном. Примеры чувствительных к андрогену генов, без ограничений, включают простатспецифический антиген (ПСА), простатспецифический мембранный антиген (PSMA), простагин, ген snail homolog 2 (SLUG), сериновую трансмембранную протеазу 2 (TMPRSS2), семейство шести трансмембранных эпителиальных антигенов предстательной железы 4 (STEAP4), FK506-связывающий белок 5 (FKBP5), орозомукоидный 1/альфа-1-кислый гликопротеин 1 (ORM1), семейство транспортеров растворенных веществ 35 (SLC35F2/NOV), инсулиноподобный фактор роста 1 (ИФР-1), ИФР-связывающий белок-3 и -5, связывающий ССААТ-энхансер белок-δ, удаленный на хромосоме 10 гомолог фосфатазы и тензина (PTEN), FASN, NKX3.1, AMIGO2, BDNF, CAMK2N1, HPGD, NCAPD3, PLD1, IL-15, IL-18 и ERBB2/HER2.

В некоторых вариантах осуществления уровень активности AR детектируют путем измерения экспрессии одного или более эндогенных генов, которых индуцируют путем обработки андрогеном или агонистом AR. В некоторых вариантах осуществления снижение экспрессии одного или более индуцируемых андрогеном генов после воздействия тестируемого соединения в сравнении с подходящим контролем указывает на то, что тестируемое соединение является эффективным для ингибирования мутантного полипептида AR. Примеры индуцируемых андрогеном генов, без ограничений, включают простатспецифический антиген (ПСА), простагин, ген snail homolog 2 (SLUG), сериновую трансмембранную протеазу 2 (TMPRSS2), семейство шести трансмембранных эпителиальных антигенов предстательной железы 4 (STEAP4), FK506-связывающий белок 5 (FKBP5) и орозомукоидный 1/альфа-1-кислый гликопротеин 1 (ORM1). В некоторых вариантах осуществления экспрессию индуцируемого гена оценивают при наличии агониста AR. В некоторых вариантах осуществления клетки приводят в контакт с андрогенным агонистом до или одновременно с тестируемым соединением.

В некоторых вариантах осуществления уровень активности AR детектируют путем измерения экспрессии одного или более

эндогенных генов, которых подавляют путем воздействия андрогена или агониста AR. В некоторых вариантах осуществления повышение или недостаточность подавления экспрессии одного или более подавленных андрогеном генов после воздействия тестируемого соединения в сравнении с подходящим контролем указывает на то, что тестируемое соединение является эффективным для ингибирования мутантного полипептида AR. В некоторых вариантах осуществления контроль представляет собой базальную экспрессию гена до воздействия на клетку тестируемого соединения. Примеры подавленных андрогеном генов, без ограничений, включают простатспецифический мембранный антиген (PSMA), семейство транспортеров растворенных веществ 35 (SLC35F2/NOV), ИФР-связывающий белок-3 и -5, связывающий ССААТ-энхансер белок- $\delta$ , удаленный на хромосоме 10 гомолог фосфатазы и тензина (PTEN), IL-15, IL-18 и ERBB2/HER2. В некоторых вариантах осуществления экспрессию подавляемого гена оценивают при наличии агониста AR. В некоторых вариантах осуществления клетки приводят в контакт с андрогенным агонистом до или одновременно с тестируемым соединением.

Способы измерения экспрессии эндогенных генов хорошо известны в данной области. Примеры способов измерения экспрессии гена, без ограничений, включают способы анализа белков, такие как, например, иммуногистохимия, иммуноблоттинг (например, вестерн-блоттинг), хроматография, а также способы анализа нуклеиновых кислот, такие как, например, полимеразная цепная реакция (ПЦР), количественная ПЦР (кПЦР), ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР), нозерн-блоттинг.

В некоторых вариантах осуществления активность мутантного полипептида AR измеряют с применением анализа, такого как, без ограничений, анализ связывания коактиватора AR (например, иммунопреципитационные анализы, двухгибридные анализы, анализы Ферстеровского (флуоресцентного) резонансного переноса энергии (FRET), например времяразрешенный FRET-анализ связывания коактиватора андрогенного рецептора LanthaScreen™), анализ конформационного профилирования AR (см., например, Joseph et al. (2009 г.) *PNAS* 106(29):12178-12183), анализ связывания ДНК

AR (см., например, Roche et al. (1992 г.) *Mol. Endocrinol.* 6(12):2229-35), иммунопреципитация хроматина, анализ взаимодействия N/C-концов AR (см., например, Hsu et al. (2005 г.) *Mol. Endocrinology* 19(2) 350-361 и Ghali et al. (2003 г.) *J Clin Endocrinol Metab.* 88(5):2185-93).

В некоторых вариантах осуществления способ выявления соединений-ингибиторов AR третьего поколения включает выбор потенциального соединения-ингибитора AR третьего поколения с применением компьютеризированного моделирования на основе трехмерной структуры кристалла или раствора предложенного в настоящем документе мутантного полипептида AR. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит аминокислотную замену в позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 полипептида AR дикого типа, представленного в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR не содержит фенилаланин в аминокислотной позиции 876 в полипептиде. В некоторых вариантах осуществления мутантный полипептид AR содержит лейцин в аминокислотной позиции 876 в полипептиде. В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение мутантного полипептида AR в контакт с тестируемым соединением и детекцию взаимодействия тестируемого соединения с мутантным полипептидом AR. В некоторых вариантах осуществления тестируемое соединение, которое взаимодействует с мутантным полипептидом AR, классифицируют как кандидат на соединение-ингибитор AR третьего поколения.

В некоторых вариантах осуществления тестируемое соединение для применения в предложенных способах представляет собой член библиотеки соединений. В некоторых вариантах осуществления создание библиотеки тестируемых соединений выполняют любым подходящим способом для получения химических соединений. Термин «библиотека тестируемых соединений» относится к панели, содержащей множество тестируемых соединений. Пример подхода к синтезу молекулярных библиотек малых органических молекул был описан ранее (Carell et al. (1994 г.) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carell et al. (1994 г.) *Angew. Chem. Int. Ed.*

Engl. 33:2061). В некоторых вариантах осуществления предложенные в настоящем документе тестируемые соединения получают с применением любого из множества подходов для работы с комбинаторными библиотеками, известных в данной области, включая: биологические библиотеки; пространственно адресуемые параллельные твердофазные или жидкофазные библиотеки, требующие деконволюции способы работы с синтетическими библиотеками, способ работы с библиотекой типа «одна гранула - одно соединение» и способы работы с синтетическими библиотеками с применением выбора на основе аффинной хроматографии. Подход с использованием биологической библиотеки ограничен пептидными библиотеками, тогда как другие четыре подхода применимы к библиотекам пептидов, непептидных олигомеров или низкомолекулярных соединений (Lam, K. S. (1997 г.) *Anticancer Drug Des.* 12:145). В данной области известны и другие примеры способов синтеза молекулярных библиотек, например описанные в публикациях: Erb et al. (1994 г.). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422; Horwell et al. (1996 г.) *Immunopharmacology* 33:68-; и Gallop et al. (1994 г.); *J. Med. Chem.* 37:1233-. В некоторых вариантах осуществления библиотеки соединений представлены в растворе (например, Houghten (1992 г.) *Biotechniques* 13:412-421) или на гранулах (Lam (1991 г.) *Nature* 354:82-84), чипах (Fodor (1993 г.) *Nature* 364:555-556), бактериях (Ladner, патент США № 5,223,409), спорах (Ladner USP '409), плаزمидах (Cull et al. (1992 г.) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1865-1869) или на фаге (Scott and Smith (1990 г.) *Science* 249:386-390); (Devlin (1990 г.) *Science* 249:404-406); (Cwirla et al. (1990 г.) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378-6382); (Felici (1991 г.) *J. Mol. Biol.* 222:301-310). В некоторых вариантах осуществления комбинаторные полипептиды получают из библиотеки кДНК. Примеры соединений, для которых можно провести скрининг на активность, включают, без ограничений, пептиды, нуклеиновые кислоты, углеводы, малые органические молекулы, а также библиотеки экстрактов из натуральных продуктов.

*Ингибиторы AR, выявленные способами скрининга*

Ингибиторы AR третьего поколения, выявленные с применением

предложенных в настоящем документе способов скрининга, представляют собой модуляторы AR. В некоторых вариантах осуществления ингибитор AR третьего поколения ингибирует или снижает по меньшей мере один тип активности полипептида AR. Примеры типов активности полипептида AR включают, без ограничений, связывание с коактиватором, связывание с ДНК, связывание с лигандом или ядерную транслокацию. В некоторых вариантах осуществления ингибитор AR третьего поколения ингибирует активность полипептида AR приблизительно на 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 100% в сравнении с активностью полипептида AR в отсутствие ингибитора. В некоторых вариантах осуществления соединения-ингибиторы AR третьего поколения, выявленные предложенными в настоящем документе способами, представляют собой обратные агонисты AR, антагонисты AR, расщепители AR, модуляторы транспорта AR и/или ингибиторы связывания ДНК AR. В некоторых вариантах осуществления соединения-ингибиторы AR третьего поколения, выявленные с применением предложенных в настоящем документе способов, представляют собой обратные агонисты AR. В некоторых вариантах осуществления соединения-ингибиторы AR третьего поколения, выявленные с применением предложенных в настоящем документе способов, представляют собой антагонисты AR. В некоторых вариантах осуществления соединения-ингибиторы AR третьего поколения, выявленные с применением предложенных в настоящем документе способов, представляют собой расщепители AR. В некоторых вариантах осуществления соединения-ингибиторы AR третьего поколения, выявленные с применением предложенных в настоящем документе способов, представляют собой модуляторы транспорта AR. В некоторых вариантах осуществления соединения-ингибиторы AR третьего поколения, выявленные с применением предложенных в настоящем документе способов, представляют собой ингибиторы связывания ДНК AR. В некоторых вариантах осуществления ингибитор AR ингибирует по меньшей мере один тип активности полипептида AR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления ингибитор AR ингибирует по меньшей мере один тип активности мутантного полипептида AR.

В некоторых вариантах осуществления соединения-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, имеет минимальную просудорожную активность и/или минимальное воздействие на судорожный порог. В некоторых вариантах осуществления соединения-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, проявляет минимальную модуляцию ГАМК-зависимого хлоридного канала. В некоторых вариантах осуществления соединения-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, проявляет минимальное связывание с ГАМК-зависимым хлоридным каналом. В некоторых вариантах осуществления соединения-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, имеет минимальный антагонизм к ГАМК-зависимому хлоридному каналу. В некоторых вариантах осуществления соединения-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, представляет собой модулятор AR с минимальным взаимодействием с ГАМК-зависимым хлоридным каналом. В некоторых вариантах осуществления соединения-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, представляет собой модулятор AR с минимальным взаимодействием с ГАМК<sub>A</sub>-зависимым хлоридным каналом. В некоторых вариантах осуществления соединения-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, представляет собой модулятор AR с минимальным взаимодействием с ГАМК<sub>A</sub>-зависимым хлоридным каналом и/или минимальным проникновением через гематоэнцефалический барьер. Анализы ГАМК известны и включают, без ограничений, описанные в публикации Ashok K. Mehta and Maharaj K. Ticku «Characterization of the Picrotoxin Site of GABA<sub>A</sub> Receptors» *Current Protocols in Pharmacology* (2000 г.) 1.18.1-1.18.17; авторское право © 2000 John Wiley & Sons, Inc., которая включена в настоящий документ путем ссылки.

В некоторых вариантах осуществления соединения-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в

настоящем документе способов, ингибирует ядерную транслокацию AR. В некоторых вариантах осуществления соединение-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, ингибирует связывание ДНК AR с чувствительным к андрогену элементом. В некоторых вариантах осуществления соединение-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, ингибирует рекрутинг коактиватора в чувствительном к AR промоторе. В некоторых вариантах осуществления соединение-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, не показывает активности в качестве агониста в клетках рака предстательной железы с избыточной экспрессией AR.

В некоторых вариантах осуществления соединение-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, ингибирует рост ксенотрансплантатных моделей кастрационно-чувствительного и кастрационно-резистентного рака предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления соединение-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, ингибирует рост ксенотрансплантатных моделей кастрационно-чувствительного и кастрационно-резистентного рака предстательной железы, экспрессирующих AR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления соединение-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, ингибирует рост ксенотрансплантатных моделей кастрационно-чувствительного и кастрационно-резистентного рака предстательной железы, экспрессирующих мутантный AR, имеющий мутацию F876L. В некоторых вариантах осуществления соединение-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, ингибирует рост ксенотрансплантатных моделей кастрационно-чувствительного и кастрационно-резистентного рака предстательной железы, экспрессирующих AR дикого типа и мутантный AR, имеющий мутацию F876L. В некоторых вариантах осуществления соединение-ингибитор



AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, ингибирует рост ксенотрансплантатных моделей кастрационно-чувствительного и кастрационно-резистентного рака предстательной железы, экспрессирующих мутантный AR, имеющий мутацию T877A (например, ксенотрансплантатные опухоли, образованные из клеток LNCaP). В некоторых вариантах осуществления соединение-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, ингибирует рост ксенотрансплантатных моделей кастрационно-чувствительного и кастрационно-резистентного рака предстательной железы, экспрессирующих AR дикого типа и мутантный AR, имеющий мутацию T877A (например, ксенотрансплантатные опухоли, образованные из клеток LNCaP). В некоторых вариантах осуществления соединение-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, ингибирует рост ксенотрансплантатных моделей кастрационно-чувствительного и кастрационно-резистентного рака предстательной железы, экспрессирующих мутантный AR, имеющий мутацию T877A, и мутантный AR, имеющий мутацию F876L.

#### **Фармацевтические композиции**

В некоторых вариантах осуществления предложена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество ингибитора AR третьего поколения, выявленного с применением предложенных в настоящем документе способов скрининга. В некоторых вариантах осуществления предложено применение ингибитора AR третьего поколения, выявленного с применением предложенных в настоящем документе способов скрининга, для приготовления лекарственного средства.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор AR третьего поколения, также содержит по меньшей мере один фармацевтически приемлемый неактивный ингредиент. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор AR третьего поколения, составлена для внутривенной инъекции, подкожной инъекции, перорального введения или местного введения. В

некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, содержащая ингибитор AR третьего поколения, представляет собой таблетку, драже, капсулу, жидкость, суспензию, гель, коллоид, дисперсию, суспензию, раствор, эмульсию, мазь или лосьон.

Фармацевтические композиции готовят традиционным образом, применяя один или более фармацевтически приемлемых неактивных ингредиентов, которые облегчают подготовку препаратов из активных соединений, которые можно применять фармацевтически. Надлежащий состав зависит от выбранного пути введения. Сводная информация по описанным в настоящем документе фармацевтическим композициям приведена, например, в публикациях Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth Ed (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995 г.); Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975 г.; Liberman, H.A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, New York, N. Y., 1980 г.; и Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Seventh Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 1999 г.), включенных в настоящий документ путем ссылки для настоящего описания.

В настоящем документе предложены фармацевтические композиции на основе ингибитора AR третьего поколения или его фармацевтически приемлемой соли и по меньшей мере одного фармацевтически приемлемого неактивного ингредиента. В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем документе ингибитор AR третьего поколения вводят в виде фармацевтических композиций, в которых ингибитор AR третьего поколения смешан с другими активными ингредиентами, как в комбинированной терапии. В других вариантах осуществления фармацевтические композиции включают другие лекарственные или фармацевтические агенты, носители, адъюванты, консервирующие, стабилизирующие, смачивающие или эмульгирующие агенты, улучшители растворимости, соли для регулирования осмотического давления и/или буферы. В других вариантах осуществления фармацевтические композиции включают другие терапевтически значимые вещества.

В настоящем документе термин «фармацевтическая композиция» относится к смеси ингибитора AR третьего поколения или его фармацевтически приемлемой соли с другими химическими компонентами (т.е. фармацевтически приемлемыми неактивными ингредиентами), такими как носители, эксципиенты, связующие, наполнители, суспендирующие агенты, ароматизаторы, подсластители, облегчающие распад таблетки агенты, диспергирующие агенты, поверхностно-активные вещества, смазывающие вещества, красители, разбавители, солюбилизаторы, увлажняющие агенты, пластификаторы, стабилизаторы, улучшители проницаемости, смачивающие агенты, пеногасящие агенты, антиоксиданты, консерванты или одна или более их комбинаций. Фармацевтическая композиция облегчает введение соединения субъекту, такому как млекопитающее.

Терапевтически эффективное количество может изменяться в широких пределах в зависимости от степени тяжести заболевания, возраста и относительного состояния здоровья субъекта, эффективности применяемого соединения и других факторов. Соединения можно применять по отдельности или в комбинации с одним или более терапевтическими агентами в качестве компонентов смесей.

Описанные в настоящем документе фармацевтические составы вводят субъекту через соответствующие пути введения, включая, без ограничений, пероральный, парентеральный (например, внутривенный, подкожный, внутримышечный), интраназальный, буккальный, топический, ректальный или трансдермальный пути введения. Описанные в настоящем документе фармацевтические составы включают, без ограничений, жидкие водные дисперсии, самоэмульгирующиеся дисперсии, твердые растворы, липосомные дисперсии, аэрозоли, твердые дозированные формы, порошки, составы с быстрым высвобождением, составы с контролируемым высвобождением, быстроплавкие составы, таблетки, капсулы, драже, составы с задержанным высвобождением, составы с продолжительным высвобождением, составы с импульсным высвобождением, многочастичные составы и составы со смешанным быстрым и контролируемым высвобождением.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция дополнительно содержит один или более дополнительных терапевтически активных агентов, включая, без ограничений, кортикостероиды, противорвотные агенты, анальгетики, противораковые агенты, противовоспалительные агенты, ингибиторы киназ, ингибиторы HSP90 и ингибиторы гистондеацетилазы (HDAC).

В некоторых вариантах осуществления предложена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество мутантного полипептида AR, предложенного в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления предложена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество нуклеиновой кислоты, кодирующей мутантный полипептид AR, предложенный в настоящем документе.

#### **Терапевтические способы**

В некоторых вариантах осуществления соединения-ингибиторы AR третьего поколения, выявленные с применением предложенных в настоящем документе способов, вводят для лечения заболевания или состояния. В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны способы лечения AR-зависимого или AR-опосредованного заболевания или состояния у млекопитающего, включающие введение млекопитающему терапевтически эффективного количества соединения-ингибитора AR третьего поколения, выявленного с применением предложенных в настоящем документе способов, или его фармацевтически приемлемой соли.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы, включающие введение соединения-ингибитора AR третьего поколения, выявленные с применением предложенных в настоящем документе способов, субъекту (например, человеку), имеющему заболевание или состояние, которое является AR-опосредованным или AR-зависимым. В некоторых вариантах осуществления предложено применение соединения-ингибитора рецептора AR третьего поколения, выявленного с применением предложенных в настоящем документе способов, для приготовления лекарственного средства для лечения заболевания или состояния, которое является AR-опосредованным или AR-зависимым. В некоторых

вариантах осуществления предложено соединение-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, для лечения заболевания или состояния, которое является AR-опосредованным или AR-зависимым. В некоторых вариантах осуществления субъект (например, человек) в настоящий момент получает один или более дополнительных терапевтически активных агентов, отличных от соединения-ингибитора AR третьего поколения.

В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает введение одного или более дополнительных терапевтически активных агентов, отличных от соединения-ингибитора AR третьего поколения, выявленного с применением предложенных в настоящем документе способов. В некоторых вариантах осуществления один или более дополнительных терапевтически активных агентов, отличных от соединения-ингибитора AR третьего поколения, выявленного с применением предложенных в настоящем документе способов, выбраны из: гормонов, агонистов или антагонистов рецепторов гормонов, кортикостероидов, противорвотных агентов, анальгетиков, противораковых агентов, противовоспалительных агентов, ингибиторов киназ, ингибиторов HSP90, ингибиторов гистондеацетилазы (HDAC). В некоторых вариантах осуществления соединение-ингибитор AR третьего поколения вводят до, одновременно, после или попеременно с одним или более из дополнительных терапевтически активных агентов, отличных от соединения-ингибитора AR третьего поколения.

В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят агонист или антагонист гонадотропин-высвобождающего гормона (GnRH) в комбинации с соединением-ингибитором AR третьего поколения, предложенным в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят агонист рецептора GnRH, такой как лейпролид, бусерелин или гозерелин, в комбинации с соединением-ингибитором AR третьего поколения, предложенным в настоящем документе. Агонисты рецептора GnRH вызывают исходное резкое повышение продукции гормона (т.е. «клиническую вспышку») с последующим ингибированием продукции лютеинизирующего

гормона, что, в свою очередь, вызывает подавление тестостерона и дигидротестостерона, от которых зависит продолжение роста клеток рака предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят агонист или антагонист гонадотропин-высвобождающего гормона (GnRH) в комбинации с соединением-ингибитором AR третьего поколения, предложенным в настоящем документе, для лечения AR-зависимого или AR-опосредованного заболевания или состояния, такого как рак предстательной железы, молочной железы, мочевого пузыря или гепатоцеллюлярный рак. В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят агонист или антагонист гонадотропин-высвобождающего гормона (GnRH) в комбинации с соединением-ингибитором AR третьего поколения, предложенным в настоящем документе, для лечения кастрационно-резистентного рака предстательной железы (CRPC). В некоторых вариантах осуществления субъекту вводят соединение-ингибитор AR третьего поколения, предложенное в настоящем документе, для ослабления или ингибирования исходного резкого повышения продукции гормона, вызванного лечением агонистом рецептора GnRH. В некоторых вариантах осуществления соединение-ингибитор AR третьего поколения вводят до, одновременно, после или попеременно с агонистом или антагонистом рецептора GnRH.

В некоторых вариантах осуществления AR-зависимое или AR-опосредованное заболевание или состояние представляет собой доброкачественную гиперплазию предстательной железы, гирсутизм, угревую сыпь, аденомы и неоплазмы предстательной железы, доброкачественные или злокачественные опухолевые клетки, содержащие андрогенный рецептор, сверхволосатость, себорею, эндометриоз, синдром поликистоза яичников, андрогенную плешивость, гипогонадизм, остеопороз, подавление сперматогенеза, либидо, истощение, анорексию, андрогенную поддерживающую терапию при возрастном снижении уровней тестостерона, рак предстательной железы, рак молочной железы, рак эндометрия, рак матки, рак мочевого пузыря, гепатоцеллюлярный рак, приливы, болезнь Кеннеди, мышечную атрофию и слабость, кожную атрофию, утрату костной ткани,

анемию, атеросклероз, сердечно-сосудистое заболевание, утрату энергии, утрату хорошего самочувствия, диабет 2 типа или накопление брюшного жира. В некоторых вариантах осуществления AR-зависимое или AR-опосредованное заболевание или состояние представляет собой AR-зависимый или AR-опосредованный рак, такой как, например, рак предстательной железы, молочной железы, мочевого пузыря или печени (т.е. гепатоцеллюлярный рак).

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны способы лечения рака у млекопитающего, включающие введение млекопитающему терапевтически эффективного количества соединения-ингибитора AR третьего поколения, выявленного с применением предложенных в настоящем документе способов, или его фармацевтически приемлемой соли. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой гормонозависимый рак. В некоторых вариантах осуществления гормонозависимый рак представляет собой AR-зависимый рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой кастрационно-резистентный рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления способ лечения рака дополнительно включает введение млекопитающему по меньшей мере одного дополнительного противоракового агента.

В некоторых вариантах осуществления соединение-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, применяют для лечения рака предстательной железы у млекопитающего, причем млекопитающее не получало лечения противораковым агентом. В некоторых вариантах осуществления соединение-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, применяют для лечения рака предстательной железы у млекопитающего, причем млекопитающее не получало лечения химиотерапевтическим соединением.

В некоторых вариантах осуществления соединение-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, применяют для лечения рака

предстательной железы у млекопитающего, причем млекопитающему вводили один или более противораковых агентов. Примеры противораковых агентов включают, без ограничений, гормональные терапевтические агенты, включая, без ограничений, антагонисты AR первого и второго поколения (например, бикалутамид, флутамид, гидроксифлутамид, нилутамид, ARN-509, энзалутамид (MDV3100) и RD162) и соединения, которые ингибируют продукцию гормонов (например, андрогена), такие как, например, галетерон (ТОК001), ТАК-700 или абиратерона ацетат, химиотерапевтические соединения, антиметаболиты, противораковые антитела, хирургическую, лучевую и гипертермальную терапию. В некоторых вариантах осуществления соединение-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, применяют для лечения рака предстательной железы у млекопитающего, причем млекопитающему вводили одно или более химиотерапевтических соединений. В некоторых вариантах осуществления соединение-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, применяют для лечения рака предстательной железы у млекопитающего, причем млекопитающему проводили хирургическое лечение. В некоторых вариантах осуществления соединение-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, применяют для лечения рака предстательной железы у млекопитающего, причем млекопитающему проводили лучевую терапию. В некоторых вариантах осуществления соединение-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, применяют для лечения рака предстательной железы у млекопитающего, причем млекопитающему проводили гипертермальную терапию.

В некоторых вариантах осуществления соединение-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, применяют для лечения рака предстательной железы у млекопитающего, причем млекопитающему проводили один или более курсов лечения противораковым агентом.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе



описаны способы лечения рака у млекопитающего, включающие введение млекопитающему терапевтически эффективного количества соединения-ингибитора AR третьего поколения, выявленного с применением предложенных в настоящем документе способов, или его фармацевтически приемлемой соли, причем соединение представляет собой обратный агонист AR, антагонист AR, расщепитель AR, модулятор транспорта AR, ингибитор связывания ДНК AR или их комбинации.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны способы лечения рака у млекопитающего, включающие введение млекопитающему терапевтически эффективного количества соединения-ингибитора AR третьего поколения, выявленного с применением предложенных в настоящем документе способов, или его фармацевтически приемлемой соли, причем соединение представляет собой обратный агонист AR.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны способы лечения рака у млекопитающего, включающие введение млекопитающему терапевтически эффективного количества соединения-ингибитора AR третьего поколения, выявленного с применением предложенных в настоящем документе способов, или его фармацевтически приемлемой соли, причем соединение представляет собой антагонист AR.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны способы лечения рака у млекопитающего, включающие введение млекопитающему терапевтически эффективного количества соединения-ингибитора AR третьего поколения, выявленного с применением предложенных в настоящем документе способов, или его фармацевтически приемлемой соли, причем соединение представляет собой расщепитель AR.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны способы лечения рака у млекопитающего, включающие введение млекопитающему терапевтически эффективного количества соединения-ингибитора AR третьего поколения, выявленного с применением предложенных в настоящем документе способов, или его фармацевтически приемлемой соли, причем соединение представляет собой модулятор транспорта AR.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны способы лечения рака у млекопитающего, включающие введение млекопитающему терапевтически эффективного количества соединения-ингибитора AR третьего поколения, выявленного с применением предложенных в настоящем документе способов, или его фармацевтически приемлемой соли, причем соединение представляет собой ингибитор связывания ДНК AR.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе описаны способы лечения рака у млекопитающего, включающие введение млекопитающему терапевтически эффективного количества соединения-ингибитора AR третьего поколения, выявленного с применением предложенных в настоящем документе способов, или его фармацевтически приемлемой соли, причем соединение представляет собой ингибитор синтеза белка AR.

В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой кастрационно-резистентный рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой резистентный к ARN-509 рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой резистентный к энзалутамиду (MDV3100) рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой резистентный к RD162 рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой резистентный к абиратерона ацетату рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой резистентный к галетерону (ТОК001) рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой резистентный к ТАК-700 рак предстательной железы.

Описанные в настоящем документе фармацевтические составы можно вводить субъекту различными способами множеством путей введения, включая, без ограничений, пероральный, парентеральный (например, внутривенный, подкожный, внутримышечный), буккальный, топический или трансдермальный пути введения.

Описанные в настоящем документе фармацевтические составы включают, без ограничений, жидкие водные дисперсии, самоэмульгирующиеся дисперсии, твердые растворы, липосомные дисперсии, твердые дозированные формы, порошки, составы с быстрым высвобождением, составы с контролируемым высвобождением, быстроплавкие составы, таблетки, капсулы, драже, составы с отсроченным высвобождением, составы с продолжительным высвобождением, составы с импульсным высвобождением, многочастичные составы и составы со смешанным быстрым и контролируемым высвобождением. В некоторых вариантах осуществления соединение-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, вводят перорально. В некоторых вариантах осуществления соединения-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, вводят внутривенно.

В некоторых вариантах осуществления соединения-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, вводят топически. В таких вариантах осуществления соединения-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, составлено в виде различных композиций для местного введения, таких как растворы, суспензии, лосьоны, гели, пасты, шампуни, скрабы, притирания, карандаши с лекарственными препаратами, бандажи с лекарственными препаратами, бальзамы, кремы или мази. Такие фармацевтические соединения могут содержать солюбилизаторы, стабилизаторы, улучшающие тоничность агенты, буферы и консерванты. В одном аспекте антиандрогенное соединение, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, вводят топически на кожу.

В другом аспекте соединения-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, применяют в производстве лекарственного средства для лечения заболевания, расстройства или состояния, в которых активность AR вносит вклад в патологию и/или симптомы

заболевания или состояния. В одном аспекте заболевание или состояние представляет собой любое из заболеваний или состояний, указанных в настоящем документе.

В любом из указанных выше аспектов дополнительно имеются варианты осуществления, в которых: (a) эффективное количество соединения-ингибитора AR третьего поколения, выявленного с применением предложенных в настоящем документе способов, вводят млекопитающему системно; и/или (b) эффективное количество соединения-ингибитора AR третьего поколения вводят млекопитающему перорально; и/или (c) эффективное количество соединения-ингибитора AR третьего поколения вводят млекопитающему внутривенно; и/или (d) эффективное количество соединения-ингибитора AR третьего поколения вводят млекопитающему путем инъекции; и/или (e) эффективное количество соединения-ингибитора AR третьего поколения вводят млекопитающему топически; и/или (f) эффективное количество соединения-ингибитора AR третьего поколения вводят млекопитающему несистемно или локально.

В любом из указанных выше аспектов имеются дополнительные варианты осуществления, содержащие однократные введения эффективного количества соединения-ингибитора AR третьего поколения, выявленного с применением предложенных в настоящем документе способов, включая дополнительные варианты осуществления, в которых (i) соединение-ингибитор AR третьего поколения вводят однократно; (ii) соединение-ингибитор AR третьего поколения вводят млекопитающему многократно в течение одного дня; (iii) непрерывно; или (iv) постоянно.

В любом из указанных выше аспектов имеются дополнительные варианты осуществления, содержащие многократные введения эффективного количества соединения-ингибитора AR третьего поколения, выявленного с применением предложенных в настоящем документе способов, включая дополнительные варианты осуществления, в которых (i) ингибитор AR третьего поколения вводят непрерывно или попеременно: в виде одной дозы; (ii) интервал множества введений составляет каждые 6 часов; (iii) соединение-ингибитор AR третьего поколения вводят

млекопитающему каждые 8 часов; (iv) соединение-ингибитор AR третьего поколения вводят млекопитающему каждые 12 часов; (v) соединение-ингибитор AR третьего поколения вводят млекопитающему каждые 24 часа. В дополнительных или альтернативных вариантах осуществления способ включает перерыв в приеме лекарственного средства, когда введение соединения-ингибитора AR третьего поколения временно приостанавливают или вводимую дозу соединения временно снижают; по окончании перерыва в приеме лекарственного средства дозирование соединения возобновляют. В некоторых вариантах осуществления продолжительность перерыва в приеме лекарственного средства варьируется от 2 дней до 1 года.

Также предложены способы снижения активации AR у млекопитающего, включающие введение млекопитающему соединения-ингибитора AR третьего поколения, выявленного с применением предложенных в настоящем документе способов. В некоторых вариантах осуществления способ включает снижение активации AR в клетках предстательной железы у млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления способ включает снижение активации AR в клетках, отличных от клеток предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления способ снижения активации AR включает снижение связывания андрогенов с андрогенным рецептором. В некоторых вариантах осуществления способ снижения активации AR включает снижение концентрации AR в клетке.

В некоторых случаях в настоящем документе описано применение соединения-ингибитора AR третьего поколения, выявленного с применением предложенных в настоящем документе способов, в производстве лекарственного средства для лечения заболеваний или состояний, которые являются AR-зависимыми или AR-опосредованными. В некоторых вариантах осуществления заболевание или состояние представляет собой рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления AR-зависимое или AR-опосредованное заболевание или состояние описано в настоящем документе.

В некоторых случаях в настоящем документе описано применение соединения-ингибитора AR третьего поколения,

выявленного с применением предложенных в настоящем документе способов, в лечении или профилактике заболеваний или состояний, которые являются AR-зависимыми или AR-опосредованными. В некоторых вариантах осуществления AR-зависимое или AR-опосредованное заболевание или состояние описано в настоящем документе.

В любом из описанных в настоящем документе вариантов осуществления млекопитающее является человеком. В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящем документе соединение-ингибитор AR третьего поколения вводят человеку.

В некоторых вариантах осуществления описанное в настоящем документе соединение-ингибитор AR третьего поколения применяют для снижения, ослабления или устранения активности AR.

В некоторых вариантах осуществления соединения-ингибиторы AR третьего поколения, выявленные с применением предложенных в настоящем документе способов, представляют собой селективные модуляторы AR. В некоторых вариантах осуществления соединения-ингибиторы AR третьего поколения, выявленные с применением предложенных в настоящем документе способов, имеют высокую специфичность к AR и имеют желательные показатели тканеселективной фармакологической активности. Желательные показатели тканеселективной фармакологической активности включают, без ограничений, активность антагониста AR в клетках предстательной железы и отсутствие активности антагониста AR в клетках, отличных от клеток предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления описанные в настоящем документе соединения-ингибиторы AR третьего поколения представляют собой антиандрогены, которые проявляют пренебрежимо малую активность в качестве агониста AR или не проявляют ее совсем.

В некоторых вариантах осуществления в настоящем документе представлены соединения-ингибиторы AR третьего поколения, выявленные с применением описанных в настоящем документе способов, выбранные из активных метаболитов, таутомеров, фармацевтически приемлемых сольватов, фармацевтически приемлемых солей или пролекарств соединения-ингибитора AR, выявленного с применением описанных в настоящем документе

способов.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую соединения-ингибиторы AR третьего поколения, вводят в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими агентами, включая, без ограничений, кортикостероиды, противорвотные агенты, анальгетики, противораковые агенты, противовоспалительные агенты, ингибиторы киназ, ингибиторы HSP90 и ингибиторы гистондеацетилазы (HDAC). В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию, содержащую соединения-ингибиторы AR третьего поколения, вводят в комбинации с противораковым агентом, включая, без ограничений, гормональный терапевтический агент, включая, без ограничений, антагонисты AR первого и второго поколения (например, бикалутамид, флутамид, гидроксифлутамид, нилутамид, ARN-509, энзалутамид (MDV3100) и RD162), соединение, которое ингибирует продукцию гормонов (например, андрогена), такое как ингибитор CYP17A, включая, например, галетерон (ТОК001), ТАК-700 или абиратерона ацетат, химиотерапевтические соединения, антиметаболиты, противораковые антитела, хирургическую, лучевую или гипертермальную терапию. В некоторых вариантах осуществления соединение-ингибитор AR третьего поколения и дополнительный терапевтический агент вводят в одной и той же композиции. В некоторых вариантах осуществления соединение-ингибитор AR третьего поколения и дополнительный терапевтический агент вводят как отдельные композиции. В некоторых вариантах осуществления соединение-ингибитор AR третьего поколения и дополнительный терапевтический агент вводят одновременно, последовательно или попеременно. В некоторых вариантах осуществления соединение-ингибитор AR третьего поколения и дополнительный терапевтический агент вводят через один и тот же путь введения. В некоторых вариантах осуществления соединение-ингибитор AR третьего поколения и дополнительный терапевтический агент вводят через разные пути введения.

#### **Наборы/готовые изделия**

Для применения в описанных в настоящем документе

диагностических и терапевтических сферах применения в настоящем документе также описаны наборы и готовые изделия. Такие наборы могут содержать носитель, упаковку или контейнер, который разделен на секции для приема одного или более контейнеров, таких как флаконы, пробирки и т.п., где каждый из контейнеров содержит один из отдельных элементов для применения в способе, описанном в настоящем документе. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы и пробирки для тестирования. Контейнеры образуют из любого приемлемого материала, включая, например, стекло или пластик.

В некоторых вариантах осуществления предложенные в настоящем документе наборы предназначены для применения при детекции нуклеиновой кислоты, кодирующей мутантный полипептид AR у субъекта, или для детекции мутантного полипептида AR у субъекта (т.е. представляют собой диагностический набор). В некоторых вариантах осуществления наборы используют для выбора пациентов для лечения антагонистом AR третьего поколения, для выявления субъектов, резистентных или потенциально резистентных к антагонисту AR первого или второго поколения, для контроля развития резистентности к терапии антагонистом AR первого или второго поколения или их комбинации. Предложенные в настоящем документе наборы содержат один или более реагентов для детекции нуклеиновой кислоты, кодирующей мутантный полипептид AR, для детекции мутантных полипептидов AR, для детекции активности AR в клетках субъекта, или их комбинации. Примеры реагентов, без ограничений, включают буферы, реагенты для ПЦР, антитела, субстраты для ферментативного окрашивания, хромогены или другие материалы, такие как покровные стекла, контейнеры, титрационные микропланшеты и необязательно инструкции для выполнения способов. Специалистам в данной области будут известны множество других возможных контейнеров и планшетов, а также реагентов, которые можно применять для приведения в контакт с различными материалами. Наборы также могут содержать контрольные образцы, такие как, например, нуклеиновые кислоты или белки, такие как, например, мутантный полипептид AR, предложенный в настоящем документе, или нуклеиновые кислоты,



кодирующие мутантный полипептид AR, предложенный в настоящем документе. В некоторых вариантах осуществления наборы содержат один или более наборов олигонуклеотидных праймеров для детекции экспрессии эндогенного андрогенного гена.

В некоторых вариантах осуществления контейнеры могут содержать один или более антагонистов AR первого или второго поколения или соединения-ингибиторы AR третьего поколения, выявленные с применением описанных в настоящем документе способов, необязательно в композиции или в комбинации с другим агентом, как описано в настоящем документе. Контейнеры необязательно имеют стерильное отверстие для доступа (например, контейнер может представлять собой пакет или флакон с раствором для внутривенного введения, имеющий пробку, которую можно проколоть иглой для подкожной инъекции). Такие наборы необязательно содержат соединение с идентифицирующим описанием, или этикеткой, или инструкциями по их применению в способах, описанных в настоящем документе.

Набор, как правило, содержит один или более дополнительных контейнеров, каждый с одним или более различными материалами (такими как реагенты, необязательно в концентрированной форме, и/или устройства), желательных с коммерческой точки зрения и точки зрения пользователя для применения соединения, описанного в настоящем документе. Не имеющие ограничительного характера примеры таких материалов, без ограничений, включают буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы; этикетки носителя, упаковки, контейнера, флакона и/или пробирки для тестирования с указанием содержимого и/или инструкций по применению, а также листовки-вставки с инструкциями по применению. Как правило, также приложен набор инструкций.

Этикетка может быть нанесена на или приложена к контейнеру. Этикетку можно наносить на контейнер, причем буквы, цифры или другие символы, образующие этикетку, прикреплены, отлиты или вытравлены на самом контейнере; этикетка может быть приложена к контейнеру, если она присутствует в гнезде или носителе, в которых также находится контейнер, например в качестве листовки-вставки. Этикетку можно применять для

указания на то, что содержимое необходимо применять в конкретной терапевтической сфере применения. Этикетка также может содержать указания по применению содержимого, например в способах, описанных в настоящем документе.

Предложены готовые изделия, которые включают упаковочный материал, соединение-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, внутри упаковочного материала и этикетку, которая указывает на то, что соединение, или композиция, или его фармацевтически приемлемая соль, таутомеры, фармацевтически приемлемый N-оксид, фармацевтически активный метаболит, фармацевтически приемлемое пролекарство или фармацевтически приемлемый сольват применяются для снижения, ослабления или устранения воздействий андрогенных рецепторов, или для лечения, профилактики или облегчения одного или более симптомов заболевания или состояния, во время лечения которого можно получить преимущества от снижения или устранения активности андрогенного рецептора.

#### **Продукция резистентных к антиандрогенам клеточных линий**

В настоящем документе предложены способы продукции клеточных линий рака предстательной железы, резистентных к лечению антагонистом AR. В некоторых вариантах осуществления клеточные линии рака предстательной железы резистентны к лечению ARN-509. В некоторых вариантах осуществления клеточные линии рака предстательной железы резистентны к лечению энзалутамидом (MDV3100). В некоторых вариантах осуществления созданные предложенным способом резистентные клеточные линии экспрессируют более высокий уровень AR в сравнении с родительской клеточной линией, применяемой для создания резистентной клеточной линии. В некоторых вариантах осуществления созданные предложенным способом резистентные клеточные линии экспрессируют приблизительно в 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10 раз или более количества AR в сравнении с родительской клеточной линией. В некоторых вариантах осуществления резистентные клеточные линии экспрессируют мутантный белок AR.

В некоторых вариантах осуществления способ включает приведение клеточной линии рака предстательной железы (т.е. родительской клеточной линии) в контакт с антагонистом AR и культивирование клеток в течение заданного периода времени. В некоторых вариантах осуществления способ включает культивирование клеток в повышающихся концентрациях антагониста AR в течение заданного периода времени. В некоторых вариантах осуществления концентрация антагониста AR находится в диапазоне от приблизительно 0,1 мкМ до приблизительно 100 мкМ, таком как, например, от 1 мкМ до приблизительно 10 мкМ. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют при 0,8 мкМ, 1,5 мкМ, 3 мкМ и 6 мкМ антагониста AR. В некоторых вариантах осуществления концентрацию антагониста AR повышают в 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или более раз. В некоторых вариантах осуществления концентрацию антагониста AR повышают в 3 раза. В некоторых вариантах осуществления клетки культивируют в присутствии антагониста AR в течение 1 дня, 2 дней, 3 дней, 4 дней, 5 дней, 6 дней, 1 недели, 2 недель, 3 недель, 4 недель, 1 месяца, 1,5 месяцев, 2 месяцев, 2,5 месяцев, 3 месяцев или более. В некоторых вариантах осуществления клетки разделяют и пересевают каждые 2 дня, каждые 3 дня, каждые 4 дня, каждые 5 дней, каждые 6 дней, каждую неделю или реже. В некоторых вариантах осуществления культуральную среду, содержащую антагонист AR, обновляют каждый день, каждые 2 дня, каждые 3 дня, каждые 4 дня, каждые 5 дней, каждые 6 дней, каждую неделю или реже. В некоторых вариантах осуществления антагонист AR представляет собой антагонист второго поколения. В некоторых вариантах осуществления антагонист AR представляет собой ARN-509. В некоторых вариантах осуществления антагонист AR представляет собой энзалутамид (MDV3100).

В некоторых вариантах осуществления клеточная линия рака предстательной железы представляет собой клеточную линию аденокарциномы предстательной железы человека. В некоторых вариантах осуществления клеточная линия рака предстательной железы представляет собой клеточную линию LNCaP. В некоторых вариантах осуществления в клеточной линии рака предстательной

железы наблюдается избыточная экспрессия андрогенного рецептора. В некоторых вариантах осуществления клеточная линия рака предстательной железы представляет собой линию LNCaP/AR(cs) или LNCaP/AR(cs)-Luc.

#### ПРИМЕРЫ

Данные примеры представлены исключительно в целях иллюстрации и не ограничивают объем формулы настоящего изобретения, представленной в настоящем документе.

#### **Пример 1. Создание резистентной к лекарственному средству клеточной линии *in vivo***

Клеточные линии, резистентные к лечению антиандрогенным соединением ARN-509, создавали *in vivo* в мышах, несущих ксенотрансплантаты опухолей кастрационно-резистентной аденокарциномы предстательной железы человека (LNCaP/AR(cs)). В клеточной линии LNCaP/AR(cs) наблюдается 3-5-кратная избыточная экспрессия андрогенного рецептора (AR) в сравнении с родительской клеточной линией LNCaP, имитируя кастрационно-резистентный рак предстательной железы (Chen et al. (2004 г.) *Nature Medicine* 10:33-39).

Ксенотрансплантаты опухолей LNCaP-AR(cs) выращивали у кастрированных шестинедельных самцов мышей линии SCID Hairless Outbred (SHO, Charles Rivers Laboratories).  $1 \times 10^6$  клеток LNCaP-ARcs в смеси 50% бессывороточной RPMI и 50% Matrigel™ инъецировали подкожно (100 мкл/животное) в правый бок 10 мышам через 3-5 дней после кастрации. Размер опухоли контролировали ежедневно. Когда опухоли достигали среднего объема ~200 мм<sup>3</sup> (приблизительно через 60 дней после инъекции), животным начинали лечение только несущей средой (n=1) или 30 мг/кг ARN-509 (n=9) со схемой дозирования раз в день (т.е. перорально в растворе 15% витамина Е-TPGS и 65% 0,5% вес/об. карбоксиметилцеллюлозы (СМС) в 20 мМ цитратном буфере (рН 4,0)). Исходно лечение ARN-509 индуцировало регрессию опухоли. Через приблизительно 75 дней дозирования одна опухоль возобновила рост и превысила размер на момент начала лечения. Когда резистентная опухоль достигла ~800 мм<sup>3</sup>, мышь умерщвляли и

извлекали опухоль. Клетки опухоли диспергировали вручную путем гомогенизации шприцом 3 мл. Клетки опухоли культивировали в RPMI с добавлением 10% FBS и 10 мкМ ARN-509. Данным способом создали одну резистентную клеточную линию.

**Пример 2. Создание резистентных к лекарственному средству клеточных линий *in vitro***

Клеточные линии, резистентные к лечению анти-AR-соединениями ARN-509 и MDV3100, создавали *in vitro* с применением клеточных линий кастрационно-резистентной аденокарциномы предстательной железы человека LNCaP.

LNCaP (ATCC), LNCaP/AR(cs) (Guo et al. (2006 г.) *Cancer Cell* 0:309-19) и LNCaP/AR-Luc (Tran et al. *Science* (2009 г.) 324(5928):787-90; Ellwood-Yen et al. (2006 г.) *Cancer Res.* 66:10513-6) поддерживали в RPMI 1640 с добавлением 10% FBS (Hyclone). Клетки LNCaP (ATCC), LNCaP/AR(cs) или LNCaP/AR(cs)-Luc культивировали в повышающихся концентрациях либо ARN-509, либо MDV3100 в течение 6 месяцев. Исходно 50 мл клеток высевали в сосуд для культивирования клеток 225 см<sup>2</sup> в концентрации приблизительно 80000 клеток/мл и выращивали в RPMI с добавлением 10% FBS в присутствии 800 нМ ARN-509 или MDV3100. Среду и лекарственное средство меняли дважды в неделю и клетки по мере необходимости пассивировали в сосуды для культивирования клеток 75 см<sup>2</sup>. Концентрацию каждого соединения повышали несколько раз от приблизительно 1,5 мкМ до приблизительно 6 мкМ по мере того, как скорость роста обрабатываемых лекарственным средством клеток повышалась до скорости роста необрабатываемых контрольных клеток. Через приблизительно 6 месяцев селекции в присутствии лекарственного средства клетки поддерживали в RPMI с добавлением 10% FBS и 6 мкМ ARN-509 или MDV3100. После селекции получали 10 независимых клеточных линий, резистентных к ARN-509 и MDV3100. Две линии получали из клеток LNCaP (ATCC), проходивших селекцию в присутствии ARN-509. Четыре клеточные линии получали из клеток LNCaP/AR(cs) - две после обработки ARN-509 и две после обработки MDV3100. Клетки LNCaP/AR(cs)-Luc применяли для получения 4 резистентных клеточных линий - две после обработки

ARN-509 и две после обработки MDV3100.

**Пример 3. Анализы на пролиферацию для тестирования на резистентность к лекарственному средству**

Для тестирования на резистентность клеточных линий к обработке ARN-509 и MDV3100 проводили анализы на пролиферацию клеток.

Анализы на пролиферацию проводили на всех клеточных линиях, резистентных к ARN-509 и MDV3100, путем высевания 16 мкл/лунку клеток с плотностью 50 000 клеток на мл в не содержащей феноловый красный среде RPMI 1640 (с 5% CSS) в 384-луночный планшет для культивирования клеток (плоские черные обработанные TC полистирольные 384-луночные планшеты с прозрачным дном (Corning)) и инкубировали в течение 2 дней при 37°C. Для анализов на активность в качестве агонистов для каждого соединения готовили 11-точечные полулогарифмические разведения в культуральной среде и добавляли к клеткам по 16 мкл каждого разведения. Для ARN-509, MDV3100 и бикалутамида анализ проводили при конечной концентрации в диапазоне от  $3,16 \times 10^{-5}$  М до  $3,18 \times 10^{-10}$  М, тогда как для синтетического андрогена метилтриенолона (R1881) анализ проводили при конечной концентрации в диапазоне от  $3,16 \times 10^{-8}$  М до  $3,18 \times 10^{-13}$  М. Для анализа режима антагониста соединения разводили в культуральной среде, также содержащей 200 пМ R1881 (PerkinElmer, г. Уолтем, штат Массачусетс, США) (конечная [R1881]=100 пМ), и затем добавляли к клеткам (16 мкл). Через 7 дней непосредственно в клеточные культуры добавляли 16 мкл CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay (Promega, г. Мэдисон, штат Висконсин, США) и измеряли люминесценцию в относительных люминесцентных единицах (RLU) в соответствии с инструкциями производителя.

Для анализа режима агонист процентную долю жизнеспособности образцов рассчитывали следующим образом: % жизнеспособности =  $100 \times ([RLU \text{ образца} - RLU \text{ среды без клеток}] / [RLU \text{ обработанных 1881 клеток} - RLU \text{ среды без клеток}])$  (таблица 1A). Для анализа в режиме антагониста процентную долю жизнеспособности образцов рассчитывали следующим образом: %

жизнеспособности =  $100 \times ([RLU \text{ образца} - RLU \text{ день } 0] / [RLU \text{ обработанных R1881 клеток} - RLU \text{ день } 0])$  (таблица 1B).

Таблица 1A

**Анализ на пролиферацию агониста (% жизнеспособности)**

|               | R1881 | Бикалутамид | MDV3100 | ARN-509 |
|---------------|-------|-------------|---------|---------|
| LNCaP         | 100,0 | +           | +       | +       |
| LNCaP/AR (cs) | 100,0 | +           | +       | +       |
| Класс 1       | 100,0 | ++          | ++      | ++      |
| Класс 2       | 100,0 | +           | ++      | ++      |

'+' = < 30, '++' =

> 30

[R1881]=0,1 нМ, [антагонистов]=10

мкМ

Таблица 1B

**Анализ на пролиферацию антагониста (% жизнеспособности)**

|               | R1881 | Бикалутамид | MDV3100 | ARN-509 |
|---------------|-------|-------------|---------|---------|
| LNCaP         | 100,0 | +           | +       | +       |
| LNCaP/AR (cs) | 100,0 | +           | +       | +       |
| Класс 1       | 100,0 | ++          | ++      | ++      |
| Класс 2       | 100,0 | ++          | ++      | ++      |

'+' = < 30, '++' =

> 30

[R1881]=0,1 нМ, [антагонистов]=10

мкМ

В анализах на пролиферацию как ARN-509, так и энзалутамид были полными антагонистами пролиферации во всех трех родительских клеточных линиях LNCaP (таблица 1A, Фиг. 1A). Резистентные клеточные линии разделили на два отдельных класса. В отличие от своих родительских клеточных линий, клетки первого класса линий, резистентных к ARN-509 и MDV3100 (класс 1), пролиферировали в отсутствие добавленных андрогенов. Лиганд-независимый рост клеток не изменялся в присутствии ARN-509, MDV3100 или бикалутамида. Синтетический андроген R1881 ингибирует пролиферацию в клетках класса 1 при высоких

концентрациях. В отношении данной ингибирующей рост активности R1881 антагонистом является как MDV3100, так и ARN-509, что указывает на то, что AR все еще способен связывать MDV3100 и ARN-509 в данных клеточных линиях.

Резистентные клеточные линии класса 1 включали одну клеточную линию, полученную из ксенотрансплантата опухоли LNCaP-AR(cs), 2 клеточные линии, полученные из клеток LNCaP/AR(cs), проходивших селекцию в присутствии ARN-509, 2 клеточные линии, полученные из клеток LNCaP/AR(cs), проходивших селекцию в присутствии MDV3100, 2 клеточные линии, полученные из клеток LNCaP/AR(cs)-Luc, проходивших селекцию в присутствии ARN-509, и одну клеточную линию, полученную из клеток LNCaP/AR(cs)-Luc, проходивших селекцию в присутствии MDV3100.

Резистентные к MDV3100 и ARN-509 клеточные линии второго класса (класс 2) сохраняли зависимость от андрогена в отношении роста, аналогично их родительским клеточным линиям. Однако в отличие от их активности на родительских клеточных линиях ARN-509 и MDV3100 могут стимулировать пролиферацию в клеточных линиях класса 2. Однако бикалутамид не стимулировал пролиферацию в клеточных линиях класса 2. Резистентные клеточные линии класса 2 включали две клеточные линии, полученные из клеток LNCaP, проходивших селекцию в присутствии ARN-509 (LNCaP ARN-509r1 и LNCaP ARN-509r2), и одну клеточную линию, полученную из клеток LNCaP/AR(cs)-Luc, проходивших селекцию в присутствии MDV3100 (LNCaP ENZr2).

Частичная активность в качестве агониста не зависела от соединения, использованного для селекции; ARN-509 и энзалутамид показали частичную активность в качестве агониста во всех трех клеточных линиях независимо от соединения, применяемого для получения резистентных вариантов. В соответствии с пролиферативной активностью ARN-509 или энзалутамид лишь частично выступали в качестве антагонистов андроген-зависимого роста данных резистентных клеточных линий (таблица 1B, Фиг. 1B, C).

**Пример 4. Анализы транскрипции репортера для тестирования на резистентность к лекарственному средству**



Для тестирования на резистентность клеток к обработке ARN-509, MDV3100 и бикалутамидом проводили анализы транскрипции репортера с применением чувствительного элемента ARE, функционально связанного с репортерным геном.

Анализы транскрипции репортера проводили для всех резистентных клеточных линий, высевая 100 мкл клеток с плотностью 250000 клеток/мл в 96-луночные планшеты для культивирования клеток в RPMI 1640 с добавлением 5% очищенной на активированном угле сыворотки и оставляя их на ночь при 37°C для закрепления.

За исключением клеток LNCaP/AR(cs)-Luc, которые содержат встроенный чувствительный к андрогену репортер, клетки временно трансфицировали с применением Lipofectin® (Life Technologies) в соответствии с протоколом производителя. Для клеток LNCaP и LNCaP/AR(cs) проводили тройные трансфекции, применяя 428 нг вектора репортера (pGL4 P<sub>b</sub>-люцифераза (промотор пробазина крысы в pGL4 (Promega, г. Мэдисон, штат Висконсин, США))), 50 нг pRL-CMV (вектор нормализации, Promega, г. Мэдисон, штат Висконсин, США) и 0,7 мкл Lipofectin®. После трансфекции клетки инкубировали в течение 4 часов.

Затем клетки обрабатывали тестируемыми соединениями - ARN-509, MDV3100 и бикалутамидом. Для анализов на активность в качестве агонистов соединения последовательно разводили и добавляли 50 мкл соединения плюс RPMI 1640 с добавлением 5% очищенного на активированном угле FBS к клеткам. Для анализов на активность в качестве антагонистов соединения последовательно разводили и добавляли 50 мкл соединения плюс RPMI с добавлением 5% очищенной на активированном угле сыворотки плюс 3 нМ R1881 к клеткам. Через 48 часов инкубации среду удаляли и клетки лизировали в 40 мкл буфера для лизирования (25 мМ Tris-фосфатный, 2 мМ CDTA, 10% глицерина, 0,5% Triton X-100, 2 мМ DTT). Измеряли активность люциферазы светляка непосредственно после добавления 40 мкл люциферозного буфера (20 мМ трицин, 0,1 мМ ЭДТА, 1,07 мМ (MgCO<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, Mg(OH)<sub>2</sub>•5H<sub>2</sub>O, 2,67 мМ MgSO<sub>4</sub>, 33,3 мМ DTT, 270 мкМ кофермента А,

470 мкМ люциферина, 530 мкМ АТФ). Люциферазу *Renilla* измеряли после добавления 40 мкл коэлюцентеразинового буфера (1,1 М NaCl, 2,2 мМ Na<sub>2</sub>ЭДТА, 0,22 М K<sub>x</sub>PO<sub>4</sub> (pH 5,1), 0,44 мг/мл БСА, 1,3 мМ NaN<sub>3</sub>, 1,43 мкМ коэлюцентеразина, конечная pH доведена до 5,0).

Два класса резистентных к ARN-509 и MDV3100 клеточных линий, выявленных в анализах на пролиферацию, также показывали различные свойства в транскрипционных анализах. В анализах временной трансфекции с применением в качестве репортера рGL4 Рb-люциферазы или анализах с применением в качестве репортера встроенной пробазин-люциферазы (т.е. в клетках, полученных из LNCaP/AR(cs)-Luc) ARN-509 и MDV3100 оказались эффективными антагонистами в андрогеннезависимых резистентных клетках класса 1, что проявлялось снижением активности люциферазы в сравнении с контролями без обработки (таблица 2). Однако бикалутамид показал повышенную активность в качестве агониста в резистентных клетках класса 1 в сравнении с родительскими клетками. В резистентных клетках класса 2 MDV3100 был слабым частичным агонистом в анализе с пробазин-люциферазой в качестве репортера, в то время как бикалутамид и ARN-509 не показали активности в качестве агониста.

Таблица 2А

**Анализ транскрипции репортера как агониста (% макс. активности)**

|              | R1881 | Бикалутамид | MDV3100 | ARN-509 |
|--------------|-------|-------------|---------|---------|
| LNCaP        | > 90  | +           | +       | +       |
| LNCaP/AR(cs) | > 90  | +           | +       | +       |
| Класс 1      | > 90  | ++          | +       | +       |
| Класс 2      | > 90  | +           | ++      | +       |

'+' = < 5, '++'

= > 5

[R1881]=10 нМ, [антагонистов]=50

мкМ

Таблица 2В

**Анализ транскрипции репортера как антагониста (% макс. активности)**

|               | R1881 | Бикалутамид | MDV3100 | ARN-509 |
|---------------|-------|-------------|---------|---------|
| LNCaP         | > 90  | +           | +       | +       |
| LNCaP/AR (cs) | > 90  | +           | +       | +       |
| Класс 1       | > 90  | ++          | +       | ++      |
| Класс 2       | > 90  | +           | ++      | +       |

'+' = < 5, '++' = >

5

[R1881]=10 нМ, [антагонистов]=50

мкМ

**Пример 5. Анализ транскрипции эндогенных генов**

Изучали воздействие обработки R1881, MDV3100 и бикалутамидом на транскрипцию эндогенного гена.

Анализ транскрипции эндогенных генов проводили для всех резистентных линий, высевая 0,5 мл клеток с плотностью 500 000 клеток/мл в 24-луночные планшеты в RPMI, содержащей 5% очищенный на активированном угле FBS (с пониженным содержанием гормона) и выращивая клетки в течение 3 дней при 37°C. Затем клетки обрабатывали в течение 24 ч 10 нМ R1881, 30 мкМ MDV3100 или 30 мкМ бикалутамида.

Выделяли общую РНК с применением набора для выделения общей РНК Aurum™ (BIO-RAD, г. Геркулес, штат Калифорния, США). С РНК (1 мкг) проводили обратную транскрипцию, применяя набор для синтеза кДНК iScript (BIO-RAD, г. Геркулес, штат Калифорния, США), для получения кДНК. Затем проводили ПЦР в реальном времени с применением прибора Applied Biosystems 7900HT и мастер-микса SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, г. Фостер Сити, штат Калифорния, США). ПЦР-реакции проводили в 6 мкл в соответствии с протоколом производителя и протоколом термоциклирования: 95°C в течение 10 минут, затем 40 циклов по 95°C в течение 15 секунд и 58°C в течение 1 минуты. Экспрессию чувствительных к андрогенам генов (PCSA, SLUG, TMPRSS2, STEAP4, FKBP5, ORM1, NOV, FASN, NKX3.1, AMIGO2, BDNF,

САМК2N1, HPGD, NCAPD3, PLD1) нормировали на экспрессию GAPDH и выражали относительно обработанных несущей средой родительских клеточных линий. Результаты по относительной экспрессии представлены в таблице 3А. Используемые для ПЦР праймеры приведены в таблице 3В.

Для эндогенных чувствительных к андрогенам генов получали аналогичные показатели селективной активности в качестве агониста для соединений и классов, но в контексте эндогенных генов транскрипционная активность MDV3100 проявляется более выражено (таблица 3). В резистентных клетках класса 1 бикалутамид демонстрирует выраженную транскрипционную активность, а MDV3100 является слабым агонистом транскрипции. В отличие от этого, в резистентных клетках класса 2 бикалутамид является слабым агонистом транскрипции, в то время как MDV3100 демонстрирует выраженную активность в качестве агониста транскрипции на тестируемых генах.

Таблица 3А

**Активность в транскрипции эндогенных генов (кратность отн. несущей среды)**

|                   |             | PCSA | SLUG | TMPRSS2 | STEAP4 | FKBP5 | ORM1 | NOV |
|-------------------|-------------|------|------|---------|--------|-------|------|-----|
| LNCaP             | DMCO        | 1,0  | 1,0  | 1,0     | 1,0    | 1,0   | 1,0  | 1,0 |
|                   | R1881       | ++   | +++  | ++      | ++++   | ++    | +++  | --  |
|                   | Бикалутамид | +    | +    | +       | +      | +     | -    | +   |
|                   | MDV3100     | +    | +    | +       | -      | +     | +    | +   |
| LNCaP/<br>AR (cs) | DMCO        | 1,0  | 1,0  | 1,0     | 1,0    | 1,0   | 1,0  | 1,0 |
|                   | R1881       | +++  | +++  | ++      | ++++   | ++    | ++++ | --  |
|                   | Бикалутамид | ++   | +    | +       | ++     | +     | +++  | +   |
|                   | MDV3100     | +    | +    | +       | +      | +     | +    | +   |
| Класс 1           | DMCO        | 1,0  | 1,0  | 1,0     | 1,0    | 1,0   | 1,0  | 1,0 |
|                   | R1881       | ++   | +++  | +       | ++++   | +++   | ++++ | --  |
|                   | Бикалутамид | +    | +++  | +       | +++    | ++    | ++   | +   |
|                   | MDV3100     | +    | +    | +       | +      | +     | +    | +   |
| Класс 2           | DMCO        | 1,0  | 1,0  | 1,0     | 1,0    | 1,0   | 1,0  | 1,0 |
|                   | R1881       | +++  | +++  | ++      | ++++   | +++   | ++++ | --  |

|             |     |     |    |     |    |     |   |
|-------------|-----|-----|----|-----|----|-----|---|
| Бикалутамид | +   | +   | +  | +   | +  | +   | + |
| MDV3100     | +++ | +++ | ++ | +++ | ++ | +++ | - |

[R1881]=10 нМ, [антагонистов]=30 мкМ

-- < 0,1, - = 0,1 - 1, + = 1 - 10, ++ = 10 - 50, +++ 50-500,  
++++ > 500

Таблица 3В

**Последовательность олигонуклеотидов для проведения ПЦР в реальном времени для транскрипционного анализа**

| Ген     | Последовательность прямого праймера         | Последовательность обратного праймера        |
|---------|---|--|
| AMIGO2  | AGAGACTCAGAGGCGACCAT<br>(SEQ ID NO: 20)     | ATCAGCAAACACAGCAGCTC<br>(SEQ ID NO: 21)      |
| BDNF    | AGAGCTGTTGGATGAGGACCAGAA<br>(SEQ ID NO: 22) | AGGCTCCAAAGGCACTTGACTACT<br>(SEQ ID NO: 23)  |
| CAMK2N1 | GACCAAGCGGGTTGTTATTGA<br>(SEQ ID NO: 24)    | TGCCTTGTCGGTCATATTTTCA<br>(SEQ ID NO: 25)    |
| FKBP5   | CGGAGAACCAAACGGAAAGG<br>(SEQ ID NO: 26)     | CTTCGCCCACAGTGAATGC<br>(SEQ ID NO: 27)       |
| HPGD    | ACAGCAGCCGGTTTATTGTGCTTC<br>(SEQ ID NO: 28) | TGGCATTTCAGTCTCACACCACTGT<br>(SEQ ID NO: 29) |
| NCAPD3  | ACCACTCACCATCATCTCAAGGCA<br>(SEQ ID NO: 30) | TGCTCTTCTTTGCCAGATCCTCGT<br>(SEQ ID NO: 31)  |
| NOV     | GCCTTACCCTTGCACTTAC<br>(SEQ ID NO: 32)      | GAGCATGCTGTCCACTCTGT<br>(SEQ ID NO: 33)      |
| ORM1    | CTTGCGCATTCCCAAGTCAGATGT<br>(SEQ ID NO: 34) | TTTCCTCTCCTTCTCGTGCTGCTT<br>(SEQ ID NO: 35)  |
| PLD1    | GAGCCTGCTACAGATGGTCA<br>(SEQ ID NO: 36)     | TGTCTACCAGCAGGACGAAG<br>(SEQ ID NO: 37)      |
| PCA     | CCTCCTGAAGAATCGATTCC<br>(SEQ ID NO: 38)     | GAGGTCCACACACTGAAGTT<br>(SEQ ID NO: 39)      |
| SLUG    | TTTCTGGGCTGGCCAAACATAAGC<br>(SEQ ID NO: 40) | ACACAAGGTAATGTGTGGGTCCGA<br>(SEQ ID NO: 41)  |
| STEAP4  | CGGCAGGTGTTTGTGTGTGGAAT<br>(SEQ ID NO: 42)  | AGAAGACACACAGCACAGCAGACA<br>(SEQ ID NO: 43)  |

|         |   |   |
|---------|---|---|
| TMPRSS2 | TAGTGAAACCAGTGTGTCTGCCCA<br>(SEQ ID NO: 44) | AGCGTTCAGCACTTCTGAGGTCTT<br>(SEQ ID NO: 45) |
| FASN    | CGCTCTGGTTCATCTGCTCTG<br>(SEQ ID NO: 46)    | TCATCAAAGGTGCTCTCGTCTG<br>(SEQ ID NO: 47)   |
| NKX3.1  | TGGAGAGGAAGTTCAGCCATCAGA<br>(SEQ ID NO: 48) | AGGAGAGCTGCTTTCGCTTAGTCT<br>(SEQ ID NO: 49) |

В отдельном эксперименте анализировали экспрессию следующих генов в клетках LNCaP, LNCaP/AR(cs), LNCaP/AR-Luc, LNCaP ARN-509r1, LNCaP ARN-509r2 и LNCaP/AR-Luc ENZr2: PLD, CAM2KN, NOV, BDNF, AMIGO2, FASN, TMPRSS2, NKX3.1, ПСА, FKBP5, HPGD, NCAPD3, SLUG, STEAP4 и ORM. Клетки культивировали в течение 3 дней в среде с пониженным содержанием гормона и затем обрабатывали несущей средой - 1 нМ R1881 или 30 мкМ соединения. Экспрессию генов нормировали на GAPDH, как описано выше. Полученные результаты представлены в таблицах 4А и 4В.

Таблица 4А

## Транскрипция клеток LNCaP, LNCaP/AR(cs) и резистентной линии

| Ген     | LNCaP         |         |      |        | LNCaP/AR(cs)    |         |      |         | LNCaP ARN-509r1 |         |        |         |
|---------|---------------|---------|------|--------|-----------------|---------|------|---------|-----------------|---------|--------|---------|
|         | Несущая среда | ARN-509 | ENZ  | R1881  | Несущая среда   | ARN-509 | ENZ  | R1881   | Несущая среда   | ARN-509 | ENZ    | R1881   |
| AMIGO2  | 1,00          | 1,12    | 1,20 | 0,68   | 1,00            | 0,72    | 1,13 | 0,54    | 1,00            | 0,62    | 0,99   | 0,21    |
| BDNF    | 1,00          | 1,09    | 0,85 | 0,40   | 1,00            | 0,85    | 1,13 | 0,48    | 1,00            | 0,90    | 1,58   | 0,31    |
| CAM2KN1 | 1,00          | 1,17    | 1,39 | 0,13   | 1,00            | 0,80    | 1,11 | 0,05    | 1,00            | 0,37    | 0,59   | 0,01    |
| FASN    | 1,00          | 1,34    | 1,24 | 5,58   | 1,00            | 0,75    | 1,19 | 7,11    | 1,00            | 1,04    | 1,53   | 3,12    |
| FKBP5   | 1,00          | 0,99    | 1,04 | 54,95  | 1,00            | 0,99    | 1,71 | 97,01   | 1,00            | 2,58    | 9,45   | 53,45   |
| HPGD    | 1,00          | 1,48    | 1,78 | 100,43 | 1,00            | 1,18    | 2,01 | 183,55  | 1,00            | 2,36    | 10,20  | 61,39   |
| NCAPD3  | 1,00          | 1,16    | 1,20 | 104,69 | 1,00            | 0,91    | 1,22 | 93,05   | 1,00            | 1,29    | 3,12   | 90,51   |
| NKX3.1  | 1,00          | 0,90    | 1,66 | 30,06  | 1,00            | 1,13    | 2,51 | 8,82    | 1,00            | 6,54    | 11,55  | 8,11    |
| NOV     | 1,00          | 1,73    | 2,57 | 0,15   | 1,00            | 1,04    | 1,27 | 0,04    | 1,00            | 1,40    | 1,39   | 0,03    |
| ORM1    | 1,00          | 0,71    | 1,13 | 873,10 | 1,00            | 0,84    | 3,58 | 3444,31 | 1,00            | 15,89   | 205,07 | 1296,13 |
| PLD1    | 1,00          | 1,09    | 0,70 | 0,02   | 1,00            | 1,04    | 0,65 | 0,02    | 1,00            | 0,33    | 0,24   | 0,03    |
| PCA     | 1,00          | 0,66    | 1,69 | 47,84  | 1,00            | 1,43    | 2,69 | 19,16   | 1,00            | 32,67   | 57,68  | 85,63   |
| SLUG    | 1,00          | 1,27    | 2,35 | 129,79 | 1,00            | 1,03    | 2,06 | 89,88   | 1,00            | 4,66    | 42,52  | 164,28  |
| STEAP4  | 1,00          | 0,78    | 1,54 | 639,15 | 1,00            | 0,90    | 1,95 | 1314,23 | 1,00            | 3,03    | 32,22  | 1184,45 |
| TMPRSS2 | 1,00          | 0,77    | 1,68 | 22,16  | 1,00            | 1,06    | 2,36 | 17,51   | 1,00            | 10,20   | 23,75  | 37,27   |
|         | LNCaP         |         |      |        | LNCaP ARN-509r2 |         |      |         |                 |         |        |         |

| Ген     | Несущая среда | ARN-509 | ENZ  | R1881  | Несущая среда | ARN-509 | ENZ   | R1881  |
|---------|---------------|---------|------|--------|---------------|---------|-------|--------|
| AMIGO2  | 1,00          | 1,12    | 1,20 | 0,68   | 1,00          | 0,67    | 0,63  | 0,55   |
| BDNF    | 1,00          | 1,09    | 0,85 | 0,40   | 1,00          | 1,04    | 0,77  | 0,47   |
| CAM2KN1 | 1,00          | 1,17    | 1,39 | 0,13   | 1,00          | 0,46    | 0,38  | 0,02   |
| FASN    | 1,00          | 1,34    | 1,24 | 5,58   | 1,00          | 0,98    | 0,93  | 4,82   |
| FKBP5   | 1,00          | 0,99    | 1,04 | 54,95  | 1,00          | 8,00    | 3,41  | 48,50  |
| HPGD    | 1,00          | 1,48    | 1,78 | 100,43 | 1,00          | 1,49    | 4,56  | 59,30  |
| NCAPD3  | 1,00          | 1,16    | 1,20 | 104,69 | 1,00          | 1,13    | 1,35  | 54,95  |
| NKX3.1  | 1,00          | 0,90    | 1,66 | 30,06  | 1,00          | 3,73    | 6,28  | 10,20  |
| NOV     | 1,00          | 1,73    | 2,57 | 0,15   | 1,00          | 1,39    | 0,71  | 0,07   |
| ORM1    | 1,00          | 0,71    | 1,13 | 873,10 | 1,00          | 3,94    | 23,75 | 625,99 |
| PLD1    | 1,00          | 1,09    | 0,70 | 0,02   | 1,00          | 0,81    | 0,29  | 0,02   |
| PCA     | 1,00          | 0,66    | 1,69 | 47,84  | 1,00          | 1,91    | 2,48  | 7,89   |
| SLUG    | 1,00          | 1,27    | 2,35 | 129,79 | 1,00          | 1,31    | 9,58  | 77,17  |
| STEAP4  | 1,00          | 0,78    | 1,54 | 639,15 | 1,00          | 1,45    | 4,69  | 377,41 |
| TMPRSS2 | 1,00          | 0,77    | 1,68 | 22,16  | 1,00          | 3,07    | 4,86  | 15,14  |



Таблица 4В

## Транскрипция в LNCaP/AR-Luc и LNCaP/AR-Luc ENZr2

| Ген     | LNCaP/AR-Luc  |         |      |       | LNCaP/AR-Luc ENZr2 |         |       |        |
|---------|---------------|---------|------|-------|--------------------|---------|-------|--------|
|         | Несущая среда | ARN-509 | ENZ  | R1881 | Несущая среда      | ARN-509 | ENZ   | R1881  |
| AMIGO2  | 1,00          | 1,13    | 1,44 | 0,54  | 1,00               | 0,99    | 0,78  | 0,49   |
| BDNF    | 1,00          | 1,17    | 1,08 | 0,18  | 1,00               | 0,56    | 0,44  | 0,12   |
| CAM2KN1 | 1,00          | 1,13    | 1,51 | 0,11  | 1,00               | 0,65    | 0,57  | 0,11   |
| FASN    | 1,00          | 1,08    | 1,40 | 3,48  | 1,00               | 1,72    | 1,20  | 4,44   |
| FKBP5   | 1,00          | 1,16    | 1,46 | 20,82 | 1,00               | 2,46    | 3,03  | 23,43  |
| HPGD    | 1,00          | 1,88    | 2,51 | 2,41  | 1,00               | 1,22    | 1,61  | 1,39   |
| NCAPD3  | 1,00          | 1,09    | 1,33 | 17,27 | 1,00               | 1,38    | 1,39  | 31,12  |
| NKX3.1  | 1,00          | 1,14    | 1,68 | 11,24 | 1,00               | 4,82    | 5,21  | 10,13  |
| NOV     | 1,00          | 2,55    | 1,95 | 0,47  | 1,00               | 1,21    | 1,20  | 0,27   |
| ORM1    | 1,00          | 1,27    | 1,39 | 7,89  | 1,00               | 15,24   | 17,88 | 347,29 |
| PLD1    | 1,00          | 1,45    | 1,33 | 0,15  | 1,00               | 0,46    | 0,74  | 0,21   |
| PCA     | 1,00          | 0,60    | 0,44 | 2,10  | 1,00               | 4,59    | 3,48  | 16,91  |
| SLUG    | 1,00          | 1,13    | 2,73 | 48,84 | 1,00               | 5,98    | 12,30 | 160,90 |
| STEAP4  | 1,00          | 0,88    | 1,23 | 20,25 | 1,00               | 1,66    | 4,38  | 79,89  |
| TMPRSS2 | 1,00          | 0,74    | 1,35 | 3,46  | 1,00               | 4,44    | 4,23  | 7,73   |

## Пример 6. Анализы на механизмы резистентности

Матрица CGH, создание профиля экспрессии мРНК и анализ последовательностей полученных от пациента опухолей при раке предстательной железы, а также множество животных моделей и моделей *in vitro* предполагают множество путей прогрессирования рака до кастрационно-резистентного состояния. Тремя из наиболее часто активируемых путей, выявленных в кастрационно-резистентном раке предстательной железы, являются пути PI3K, Raf и AR. В данном примере с помощью вестерн-блоттинга оценивали фосфорилирование Akt и Erk для оценки состояний активации путей PI3K и Raf соответственно.

Для оценки режима резистентности к лекарственному средству в клеточных линиях класса 1 и класса 2 провели анализ «вестерн-блоттинг» для оценки уровней белка AR и состояния активации нескольких клеточных сигнальных путей, о которых известно, что

они модулируют активность AR и часто активируются в кастрационно-резистентном раке предстательной железы. Определяли относительную экспрессию AR, Akt, фосфорилированного Akt (Ser473), p44/42 MAPK (Erk1/2), фосфорилированного p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204), тубулина и актина.

Для проведения анализа «вестерн-блоттинг» клетки выращивали в RPMI 1640 с добавлением 5% очищенной на активированном угле сыворотки в течение 3 дней. Клетки лизировали в модифицированном буфере для радиоиммунопреципитации (mRIPA; 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% (об/об) NP-40, 0,5% дезоксихолата, 0,1% SDS, 5 mM ЭДТА, pH 7,4), содержащем коктейль Halt™ Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Scientific). Общее количество белка в очищенных лизатах определяли методом Лоури (анализа на белок Biorad DC). К лизатам добавляли образец буфера NuPAGE® LDS Sample Buffer и восстанавливающий образец агент Sample Reducing Agent и нагревали до 70°C в течение 10 минут. По 20 мкг общего клеточного белка отделяли на 4-12% бистрисакриламидном геле NuPAGE и переносили на нитроцеллюлозную мембрану, применяя модуль для блоттинга Xcell II™ (Invitrogen). Мембраны инкубировали в блокирующий буфер Blocking Buffer (LI-COR, г. Линкольн, штат Небраска, США) в течение 30 минут при комнатной температуре с последующими 60-минутными инкубациями с первичными антителами к андрогенному рецептору (Santa Cruz Biotechnology, № по кат. SC-816), Akt и Phospho-Akt (Ser473) (Cell Signaling, № по кат. 9272 и 4058 соответственно), p44/42 MAPK (Erk1/2) и Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling, № по кат. 4695 и 4376s соответственно) и тубулину или актину (Sigma, № по кат. T6199 и A4700 соответственно). После инкубации с конъюгированными козьими антителами к IgG мыши или кролика IRDye® Conjugated Goat Anti Mouse or Rabbit IgG (LI-COR) полосы белков количественно оценивали с применением системы ИК-визуализации Odyssey® Infrared Imaging System.

По результатам вестерн-блоттинга уровни AR в резистентных

линиях класса 1 были приблизительно в 2-4 раза выше, чем наблюдавшиеся в клеточной линии LNCaP/AR(cs) (Фиг. 2). Аналогично тому, как приблизительно 3-кратный рост уровней AR является достаточным для поддержания роста клеток LNCaP в условиях кастрации *in vivo*, дополнительное 2-4-кратное повышение уровней AR может быть достаточным для стимулирования пролиферации в отсутствие андрогенов *in vitro*. В отличие от этого, уровни AR-резистентных линий класса 2 были аналогичны уровням, наблюдавшимся в родительских клеточных линиях. Таким образом, превращение энзалутамида и ARN-509 в частичные агонисты в клеточных линиях класса 2 не было связано с избыточной экспрессией AR. Наблюдались небольшие различия в уровнях общих и фосфорилированных Akt и Erk без согласованных изменений, наблюдаемых в любом классе резистентных клеточных линий.

#### **Пример 7. Определение последовательности мутантного AR**

MDV3100 и ARN-509 являются транскрипционными и пролиферативными агонистами в резистентных клеточных линиях класса 2, в то время как бикалутаамид остается антагонистом. Экспрессия AR в резистентных клетках класса 2 была аналогична экспрессии в родительской клеточной линии (пример 6). Таким образом, определяли последовательность AR в резистентных клетках класса 2 для установления того, стимулирует ли мутация лиганд-связывающего домена AR повышение функциональной активности.

В качестве матрицы для секвенирования AR применяли кДНК, полученную обратной транскрипцией РНК, выделенной из клеток класса 1 и класса 2 (см. пример 5). Применяя серию олигонуклеотидов, с помощью ПЦР создали перекрывающиеся сегменты, охватывающие лиганд-связывающий домен AR (с. 2013-2757), применяя полимеразу Phusion® (New England Biolabs) и следуя протоколу производителя. Продукты ПЦР очищали на геле для удаления неспецифических полос, а также невстроенных олигонуклеотидов. Очищенные продукты ПЦР секвенировали с применением внутренних олигонуклеотидов.

В трех независимо полученных клеточных линиях была

выявлена одна мутация нуклеиновой кислоты внутри лиганд-связывающего домена AR в нуклеотидной позиции 2626. Выявленная во всех линиях мутация с потерей смысла представляла собой замену тимина (Т) на цитозин (С), что превращает фенилаланин (F) в аминокислотной позиции 876 кодированного полипептида в лейцин (L) (SEQ ID NO: 19). Кроме того, секвенирование индивидуальных субклонированных продуктов ПЦР из клеточной линии LNCaP/AR-Luc ENZr2 указывало на то, что во всех клеточных линиях мутация F876L возникала в эндогенном аллеле AR.

F876 лежит на спирали 11 в области лиганд-связывающего кармана AR, который представляет собой горячую точку мутаций AR при кастрационно-резистентном раке предстательной железы (Фиг. 1D). Однако в отличие от T877 и L701, которые координируют образование водородной связи с группой 17 $\alpha$ -ОН дигидротестостерона, F876 участвует в образовании небольшого гидрофобного ядра, образованного остатками в спирали 11 (F786, L880), петлях между спиралями 11 и 12 (F891) и спирали 3 (F697, L701). Хотя аналогичные остатки и гидрофобные лигандные взаимодействия сохраняются в эстрогеновом и прогестероновом рецепторе, участие F876 в высокоаффинном связывании или селективности к стероидам не предполагается. В соответствии с относительно малой прогнозируемой ролью F876 в связывании стероидов о мутации AR-F876L в популяциях с раком предстательной железы или нечувствительностью к андрогенам сообщений не было.

#### **Пример 8. Экспрессия мутантного AR в AR-дефицитных клетках**

Чтобы подтвердить, что мутация F876L придает ARN-509 и MDV3100 активность в качестве агониста, создали точечную мутацию в контексте полноразмерного AR дикого типа и мутантного рецептора LNCaP T877A. Мутанты с F876L и F876L/T877A создали в плазмиде pCDNA3-AR, применяя набор для сайт-направленного мутагенеза QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, г. Санта Клара, штат Калифорния, США) в соответствии с протоколом производителя.

Для тестирования транскрипционной активности мутантного AR в ответ на лечение ARN-509, MDV3100 и бикалутамидом провели

анализы транскрипции репортера с применением чувствительного элемента ARE, функционально связанного с репортерным геном.

Анализы транскрипции репортера проводили, высевая 100 мкл клеток HEPG2 с плотностью 250 000 клеток/мл в 96-луночные планшеты для культивирования клеток в MEM с добавлением 10% очищенной на активированном угле сыворотки и оставляя их на ночь при 37°C для закрепления.

Клетки временно трансфицировали с применением Lipofectin® (Life Technologies) в соответствии с протоколом производителя. Проводили тройные трансфекции, применяя 378 нг вектора репортера (4X ARE-люцифераза или pGL4 P<sub>b</sub>-люцифераза (промотор пробазина крысы в pGL4 (Promega, г. Мэдисон, штат Висконсин, США)), 50 нг pCDNA-AR (дикого типа или мутантного), 50 нг pRL-CMV (вектор нормализации) и 0,7 мкл Lipofectin®. После трансфекции клетки инкубировали в течение 4 часов.

После инкубации клетки обрабатывали тестируемыми соединениями - ARN-509, MDV3100 и бикалутамидом. Для анализов на активность в качестве агонистов соединения разводили 1:6 и добавляли 50 мкл соединения в MEM с добавлением 5% очищенного на активированном угле FBS к клеткам до конечной концентрации в диапазоне от 30 мкМ до 0,64 нМ. Для анализов на активность в качестве антагонистов соединения последовательно разводили с 1 нМ R1881 (для AR дикого типа) или 5 нМ R1881 (для AR F876L).

Через 48 часов инкубации среду удаляли и клетки лизировали в 40 мкл буфера для лизирования (25 мМ Tris-фосфатный, 2 мМ CDTA, 10% глицерина, 0,5% Triton X-100, 2 мМ DTT). Измеряли активность люциферазы светляка непосредственно после добавления 40 мкл люциферозного буфера (20 мМ трицин, 0,1 мМ ЭДТА, 1,07 мМ (MgCO<sub>3</sub>)<sub>4</sub>, Mg(OH)<sub>2</sub>•5H<sub>2</sub>O, 2,67 мМ MgSO<sub>4</sub>, 33,3 мМ DTT, 270 мкМ кофермента А, 470 мкМ люциферина, 530 мкМ АТФ). Люциферазу *Renilla* измеряли после добавления 40 мкл коэлюцентеразинового буфера (1,1 М NaCl, 2,2 мМ Na<sub>2</sub>ЭДТА, 0,22 М K<sub>x</sub>PO<sub>4</sub> (рН 5,1), 0,44 мг/мл ВСА, 1,3 мМ NaN<sub>3</sub>, 1,43 мкМ коэлюцентеразина, конечная рН доведена до 5,0).

В анализах временной трансфекции антагонисты AR второго

поколения ARN-509 и MDV3100 индуцировали AR-зависимую транскрипционную активность в контексте мутантного AR F876L или F876L/T877A, тогда как бикалутамид вызывал минимальную индукцию (таблица 5). Например, в клетках HepG2 с применением в качестве репортера либо 4XARE-люциферазы, либо P<sub>β</sub>-люциферазы ARN-509 и MDV3100, но не бикалутамида, индуцировали AR-зависимую транскрипционную активность в контексте мутантного AR F876L или F876L/T877A. Это указывает на то, что механизмом резистентности в клеточных линиях класса 2 является мутация AR F876L.

Таблица 5

## Транскрипционная активность AR (кратность относительно ДМСО)

|                   | R1881 | Бикалутамид | MDV3100<br>(энзалутамид) | ARN509 |
|-------------------|-------|-------------|--------------------------|--------|
| AR дикого<br>типа | +++   | +           | +                        | +      |
| AR F876L          | +++   | +           | ++                       | ++     |

+ = < 20, ++ = 10-200, +++ > 200

[R1881] = 100 нМ, [антагонистов] = 6,3 мкМ

Для подтверждения описанных выше результатов провели второй эксперимент с 4X-ARE-люциферазой в качестве репортера. В данном эксперименте наряду с бикалутамидом, ARN-509 и энзалутамидом также сравнивали антиандрогены первого поколения - нилутамид и гидроксифлутамид. Анализы транскрипции репортера AR проводили по существу, как описано выше, с небольшими модификациями. Проводили тройные трансфекции, применяя 50 нг pCDNA3-AR или мутанта pCDNA3-AR, 65 нг 4X ARE-люциферазы, 20 нг pRL (Promega) и 25 нг pCMX. Для анализов на активность в качестве агонистов соединения последовательно разводили и добавляли 50 мкл соединения плюс RPMI 1640 с добавлением очищенной на активированном угле сыворотки к клеткам. Для анализов на активность в качестве антагонистов соединения последовательно разводили и добавляли 50 мкл соединения плюс RPMI с добавлением очищенной на активированном угле сыворотки плюс метилтриенолон (R1881) к клеткам. Конечная концентрация R1881, применяемая в анализах на активность в качестве

антагониста, составляла 1 нМ, за исключением F876L, для которого применяли 5 нМ R1881.

Как показано на Фиг. 4, в контексте AR дикого типа ARN-509 и энзалутамид были полными антагонистами и имели минимальную активность в качестве агониста в анализах андрогенчувствительной транскрипции репортера 4X-ARE. Однако в клетках, экспрессирующих AR-F876L или AR F876L/T877A, энзалутамид и ARN-509 были частичными агонистами транскрипции (Фиг. 4А). И наоборот, антиандрогены первого поколения бикалутамид, нилутамид и гидроксифлутамид проявляли минимальную активность в качестве агониста на мутанте F876L (таблица 6, Фиг. 4) ( $E_{max}$  = процентная доля от максимального ответа на R1881). Энзалутамид и ARN-509 были полными антагонистами на мутантах AR T877A, L701H, H874Y и W741C, которые либо придавали резистентность к антагонистам AR первого поколения, либо расширяли специфичности к стероидным лигандам у пациентов с кастрационно-резистентным раком предстательной железы.

Таблица 6

| Соединение       | Анализ репортера 4X ARE          |                             |                             |                        |
|------------------|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------|
|                  | Дикий тип, IC <sub>50</sub> (нМ) | Дикий тип, E <sub>max</sub> | F876L IC <sub>50</sub> (нМ) | F876L E <sub>max</sub> |
| ARN-509          | 0,79±0,15                        | 1,3±0,3                     | 0,09±0,06                   | 49,7±11,1              |
| Энзалутамид      | 1,12±0,17                        | 0,4±0,1                     | 0,13±0,04                   | 20,2±5,2               |
| Бикалутамид      | 1,65±0,93                        | 10,0±2,9                    | 3,63±0,04                   | 0,7±0,3                |
| Гидроксифлутамид | 0,36±0,04                        | 28,9±5,0                    | 2,60±6,61                   | 0,8±0,2                |
| Нилутамид        | 1,11±0,17                        | 5,1±2,1                     | 7,59±1,18                   | 0,6±0,1                |

Для тестирования на компетентность связывания ДНК мутантами F876L создали слитые конструкции VP16-AR. pVP16-AR создали путем субклонирования AR человека с полной длиной в pVP16 (Clontech). Точечные мутации AR создали в VP16-AR с применением набора для сайт-направленного мутагенеза QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, г. Санта Клара, штат Калифорния, США) в соответствии с протоколом производителя.

Анализы транскрипции проводили по существу, как описано

выше. Проводили тройные трансфекции, применяя 35 нг pVP16-AR или pVP16-F876L, 70 нг 4X ARE-люциферазы, 20 нг pRL (Promega) и 35 нг pCMX. Активность репортера 4X ARE-люциферазы контролировали в присутствии повышающихся концентраций соединения в отсутствие или в присутствии 90 нМ R1881 (для VP16-AR дикого типа) или 1 нМ R1881 (для VP16-AR F876L). Активность люцифераз измеряли, как описано выше.

В соответствии с результатами анализа транскрипции репортера в анализе VP16-AR дикого типа, в котором контролировали компетентность связывания ДНК рецептором, энзалутамид и ARN-509 были полными антагонистами (таблица 7, Фиг. 4) ( $E_{max}$  = процентная доля от максимального ответа на R1881). Однако в контексте VP16-AR-F876L, ARN-509 и энзалутамид стимулировали связывание ДНК AR. Таким образом, мутация AR F876 на L была достаточной для превращения антиандрогенов 2-го поколения, энзалутамида и ARN-509 в частичные агонисты.

Таблица 7

| Соединение       | AR-VP16                          |                             |                             |                        |
|------------------|----------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------|
|                  | Дикий тип, IC <sub>50</sub> (нМ) | Дикий тип, E <sub>max</sub> | F876L IC <sub>50</sub> (нМ) | F876L E <sub>max</sub> |
| ARN-509          | 0,16±0,06                        | 3,98±0,27                   | 0,03±0,02                   | 53,98±1,45             |
| Энзалутамид      | 0,21±0,07                        | 2,65±0,73                   | 0,05±0,01                   | 34,32±5,38             |
| Бикалутамид      | 0,18±0,10                        | 32,77±5,76                  | 2,51±1,11                   | 2,20±1,35              |
| Гидроксифлутамид | 0,03±0,01                        | 42,28±4,44                  | 0,97±0,27                   | 5,36±5,35              |
| Нилутамид        | 0,13±0,08                        | 33,53±9,75                  | 2,12±0,68                   | 2,90±1,80              |

#### Пример 9. Создание стабильной клеточной линии

В данном примере создавали клеточные линии со стабильной экспрессией мутантного AR F876L. Сначала создавали ретровирусы pSRαF876L, pQCXIN-AR и pQCXIN-F876L путем котрансфекции клеток GP2-293 pVSV-G (Clontech) в соответствии с протоколом производителя.

Клетки PC3 со стабильной экспрессией AR дикого типа или AR-F876L создавали путем трансдукции клеток PC3 ретровирусом либо pQXIN-AR, либо pQXIN-F876L и селекцией в среде RPMI 1640,



содержащей 500 мкг/мл гентамицина.

Клетки LNCaP со стабильной экспрессией AR-F876L создавали путем либо трансфекции клеток LNCaP pCDNA-F876L, либо трансдукции клеток LNCaP ретровирусом SR $\alpha$ F876L. Выделяли индивидуальные клоны LNCaP/pCDNA-F876L с последующей селекцией в 400 мкг/мл гентамицина. Проводили селекцию пулов клеток LNCaP/SR $\alpha$ F876L в 400 мг/мл гентамицина.

Экспрессию белка AR всех клеточных линий подтверждали с помощью анализа «вестерн-блоттинг» с применением антитела AR N-20 (Santa Cruz Biotechnology).

#### Пример 10. Анализы равновесного связывания AR

Проводили анализы конкурентного связывания AR дикого типа в сравнении с AR F876L, как описано в публикации Clegg et al. (2012 г.) *Cancer Research* 72:1494-503, применяя клетки PC3 со стабильной экспрессией AR человека дикого типа или AR-F876L, как описано выше.  $K_i$  рассчитывали как  $K_i = IC_{50} / (1 + ([^3H-R1881]/K_d))$ ,  $[^3H-R1881] = 0,6$  нМ.

В анализах равновесного связывания AR ARN-509 и энзалутамид связывались с мутантом с аффинностью, большей в 30 и 48 раз соответственно (таблица 8, Фиг. 5) ( $K_d$  для R1881: AR=0,5 нМ; AR-F877L=0,64 нМ). Таким образом, повышенная активность в качестве агониста в отношении AR связана с повышенной аффинностью связывания как с рецептором дикого типа, так и с рецептором F876L, что указывает на то, что подтверждение агониста обеспечивает повышенную аффинность через сниженную константу диссоциации.

Таблица 8

| Соединение       | Связывание AR,<br>дикий тип, $K_i$ (нМ) | Связывание AR,<br>F876L, $K_i$ (нМ) |
|------------------|---|-------------------------------------|
| ARN-509          | 18,07 $\pm$ 7,46                        | 0,68 $\pm$ 0,15                     |
| Энзалутамид      | 26,30 $\pm$ 12,77                       | 0,60 $\pm$ 0,17                     |
| Бикалутамид      | 26,56 $\pm$ 12,51                       | 360,36 $\pm$ 283,85                 |
| Гидроксифлутамид | 14,56 $\pm$ 8,25                        | 150,57 $\pm$ 55,10                  |
| Нилутамид        | 17,74 $\pm$ 5,65                        | 197,42 $\pm$ 9,26                   |

Пример 11. Экспрессия генов-мишеней AR в и пролиферация

**стабильных клеточных линий рака предстательной железы с F876L**

Как показано выше, экспрессия AR-F876L была достаточной для придания резистентности к энзалутамиду и ARN-509 в анализах на основе временной экспрессии репортера. В данном примере исследовали воздействия F876L на гены-мишени эндогенного AR и на пролиферацию в клеточных линиях рака предстательной железы со стабильной экспрессией мутанта. Создавали две линии клеток LNCaP (LNCaP/SR $\alpha$ F876L и LNCaP/pCDNAF876L), как описано в примере 9, для избыточной экспрессии AR-F876L на уровнях, сравнимых с уровнями модели LNCaP/AR(cs).

Для измерения уровней AR в клетках создавали белковые экстракты из клеток LNCaP, LNCaP/AR(cs), LNCaP/SR $\alpha$ F876L и LNCaP/pCDNAF876L, культивированных в среде с пониженным содержанием гормона в течение 3 дней. Уровни белка AR анализировали с помощью вестерн-блоттинга. Уровни AR количественно определяли, нормировали на актин и выражали относительно экспрессии AR в клетках LNCaP (Фиг. 6).

Для анализа эндогенных генов-мишеней клетки LNCaP/AR(cs), LNCaP SR $\alpha$ F876L и LNCaP/pCDNAF876L культивировали в течение 3 дней в среде с пониженным содержанием гормона и затем обрабатывали их несущей средой, 1 нМ R1881 или 1, 3, 10 и 30 мкМ ARN-509 или энзалутамида в присутствии или в отсутствие 1 нМ R1881.

Для анализов на пролиферацию клетки LNCaP/AR(cs), LNCaP SR $\alpha$ F876L и LNCaP/pCDNAF876L культивировали в присутствии среды с пониженным содержанием гормона в течение 2 дней с последующей обработкой лигандом в течение 7 дней, как описано выше. Для анализов на активность в качестве антагонистов добавляли ARN-509 или энзалутамид в присутствии 200 пМ R1881 (конечная концентрация 100 пМ). Пролиферацию количественно определяли с помощью люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo, как описано выше.

В клетках LNCaP/AR(cs) ARN-509 и энзалутамид оказывали небольшое воздействие на индукцию генов-мишеней AR или пролиферативную активность (Фиг. 7А, таблица 9А). Оба антагониста блокировали индуцируемую R1881 транскрипцию и

пролиферацию до уровней, соответствующих их активности в качестве агонистов при наивысшей концентрации (Фиг. 7В, таблица 9В). В отличие от этого, в экспрессирующих F876L-AR клетках как энзалутамид, так и ARN-509 продемонстрировали выраженную транскрипционную и пролиферативную активность в качестве агониста (Фиг. 7А и 7В, таблицы 9С-Е).

## LNCaP/AR(cs) : агонист транскрипции

|         |               |            | - R1881     |       |       |        |        |         |       |       |        |        |
|---------|---------------|------------|-------------|-------|-------|--------|--------|---------|-------|-------|--------|--------|
|         |               |            | Энзалутамид |       |       |        |        | ARN-509 |       |       |        |        |
| Ген     | Несущая среда | 1 нМ R1881 | 0,3 мкМ     | 1 мкМ | 3 мкМ | 10 мкМ | 30 мкМ | 0,3 мкМ | 1 мкМ | 3 мкМ | 10 мкМ | 30 мкМ |
| AMIGO2  | 1,00          | 0,98       | 0,68        | 0,61  | 0,62  | 0,66   | 1,22   | 1,14    | 0,69  | 0,89  | 0,65   | 2,41   |
| BDNF    | 1,00          | 0,86       | 1,04        | 0,92  | 0,88  | 0,95   | 0,98   | 1,15    | 0,93  | 1,03  | 1,03   | 1,80   |
| CAM2KN1 | 1,00          | 0,04       | 0,80        | 0,70  | 0,71  | 0,64   | 0,64   | 0,90    | 0,76  | 0,99  | 0,78   | 1,56   |
| FASN    | 1,00          | 4,12       | 0,47        | 0,32  | 0,29  | 0,31   | 0,58   | 0,46    | 0,40  | 0,42  | 0,41   | 1,30   |
| FKBP5   | 1,00          | 100,51     | 0,91        | 0,62  | 0,75  | 0,61   | 0,85   | 0,99    | 0,71  | 0,91  | 0,75   | 1,87   |
| HPGD    | 1,00          | 324,60     | 0,74        | 0,57  | 0,61  | 0,63   | 1,29   | 0,81    | 0,56  | 0,78  | 0,61   | 1,86   |
| NCAPD3  | 1,00          | 95,54      | 0,66        | 0,57  | 0,47  | 0,56   | 0,79   | 0,72    | 0,74  | 0,73  | 0,74   | 1,34   |
| NKX3.1  | 1,00          | 12,72      | 0,71        | 0,52  | 0,51  | 0,86   | 1,63   | 1,11    | 0,68  | 0,73  | 0,85   | 2,24   |
| NOV     | 1,00          | 0,05       | 1,12        | 0,91  | 0,80  | 1,02   | 1,01   | 1,12    | 1,00  | 1,11  | 0,98   | 2,07   |
| ORM1    | 1,00          | 6987,01    | 0,92        | 0,90  | 1,06  | 0,71   | 2,02   | 1,37    | 1,79  | 1,20  | 0,97   | 1,35   |
| PLD1    | 1,00          | 0,03       | 0,77        | 0,62  | 0,63  | 0,56   | 0,56   | 1,28    | 0,66  | 0,88  | 0,65   | 1,33   |
| PCA     | 1,00          | 22,14      | 0,42        | 0,32  | 0,38  | 0,74   | 1,60   | 0,44    | 0,49  | 0,58  | 0,61   | 1,13   |
| SLUG    | 1,00          | 91,84      | 0,53        | 0,55  | 0,31  | 0,51   | 0,91   | 0,38    | 0,42  | 0,52  | 0,56   | 1,36   |
| STEAP4  | 1,00          | 1498,46    | 0,75        | 0,73  | 0,52  | 1,16   | 1,28   | 0,94    | 0,77  | 1,05  | 0,56   | 1,01   |
| TMPRSS2 | 1,00          | 35,42      | 0,75        | 0,53  | 0,63  | 0,89   | 1,45   | 0,99    | 0,64  | 1,04  | 0,62   | 2,78   |

## LNCaP/AR(cs) : антагонист транскрипции

|         |               |            | + 1 нМ R1881 |        |        |        |        |         |         |         |        |        |
|---------|---------------|------------|--------------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|--------|--------|
|         |               |            | Энзалутамид  |        |        |        |        | ARN-509 |         |         |        |        |
| Ген     | Несущая среда | 1 нМ R1881 | 0,3 мкМ      | 1 мкМ  | 3 мкМ  | 10 мкМ | 30 мкМ | 0,3 мкМ | 1 мкМ   | 3 мкМ   | 10 мкМ | 30 мкМ |
| AMIGO2  | 1,00          | 0,98       | 0,49         | 0,19   | 0,48   | 0,78   | 0,92   | 0,30    | 0,31    | 0,52    | 0,60   | 0,76   |
| BDNF    | 1,00          | 0,86       | 0,61         | 0,28   | 0,63   | 0,99   | 1,12   | 0,43    | 0,35    | 0,67    | 0,74   | 0,88   |
| CAM2KN1 | 1,00          | 0,04       | 0,04         | 0,06   | 0,27   | 0,50   | 0,56   | 0,04    | 0,06    | 0,19    | 0,43   | 0,42   |
| FASN    | 1,00          | 4,12       | 1,30         | 0,42   | 0,71   | 0,46   | 0,59   | 1,92    | 1,52    | 1,08    | 0,60   | 0,64   |
| FKBP5   | 1,00          | 100,51     | 23,51        | 5,64   | 3,32   | 1,41   | 1,50   | 33,14   | 22,49   | 12,56   | 2,74   | 1,08   |
| HPGD    | 1,00          | 324,60     | 99,16        | 16,30  | 13,19  | 3,85   | 4,25   | 105,97  | 76,25   | 32,19   | 8,36   | 2,78   |
| NCAPD3  | 1,00          | 95,54      | 23,74        | 4,35   | 3,14   | 1,29   | 1,27   | 43,93   | 32,00   | 15,57   | 2,39   | 0,96   |
| NKX3.1  | 1,00          | 12,72      | 7,70         | 3,77   | 6,72   | 4,70   | 5,03   | 8,32    | 9,92    | 12,01   | 7,22   | 5,49   |
| NOV     | 1,00          | 0,05       | 0,11         | 0,14   | 0,61   | 1,00   | 0,92   | 0,03    | 0,09    | 0,31    | 0,86   | 0,82   |
| ORM1    | 1,00          | 6987,01    | 3521,95      | 503,02 | 257,85 | 43,91  | 22,70  | 5100,90 | 2679,73 | 1031,40 | 156,90 | 16,42  |
| PLD1    | 1,00          | 0,03       | 0,02         | 0,02   | 0,13   | 0,42   | 0,54   | 0,02    | 0,02    | 0,04    | 0,11   | 0,32   |
| PCA     | 1,00          | 22,14      | 22,76        | 8,82   | 11,75  | 6,59   | 5,65   | 19,09   | 21,75   | 23,57   | 12,90  | 7,20   |
| SLUG    | 1,00          | 91,84      | 50,08        | 10,20  | 10,56  | 5,26   | 5,22   | 71,33   | 62,00   | 50,70   | 11,15  | 5,49   |
| STEAP4  | 1,00          | 1498,46    | 585,81       | 109,37 | 74,44  | 13,61  | 7,79   | 1019,98 | 742,61  | 256,89  | 32,98  | 6,86   |
| TMPRSS2 | 1,00          | 35,42      | 19,88        | 7,72   | 10,51  | 3,58   | 4,62   | 19,07   | 24,11   | 23,38   | 11,45  | 5,94   |

## LNCaP/SRαF876L: агонист транскрипции

|         |               |            | - R1881     |       |       |        |         |         |       |        |        |         |
|---------|---------------|------------|-------------|-------|-------|--------|---------|---------|-------|--------|--------|---------|
|         |               |            | Энзалутамид |       |       |        |         | ARN-509 |       |        |        |         |
| Ген     | Несущая среда | 1 нМ R1881 | 0,3 мкМ     | 1 мкМ | 3 мкМ | 10 мкМ | 30 мкМ  | 0,3 мкМ | 1 мкМ | 3 мкМ  | 10 мкМ | 30 мкМ  |
| AMIGO2  | 1,00          | 0,29       | 0,58        | 0,32  | 0,47  | 0,40   | 0,31    | 0,27    | 0,47  | 0,23   | 0,34   | 0,27    |
| BDNF    | 1,00          | 1,65       | 1,04        | 1,30  | 1,01  | 0,99   | 1,55    | 0,79    | 1,07  | 0,75   | 0,84   | 0,94    |
| CAM2KN1 | 1,00          | 0,03       | 0,52        | 0,48  | 0,38  | 0,23   | 0,37    | 0,30    | 0,24  | 0,17   | 0,21   | 0,18    |
| FASN    | 1,00          | 3,76       | 0,50        | 0,64  | 0,58  | 1,09   | 1,34    | 0,64    | 1,01  | 0,93   | 1,50   | 2,77    |
| FKBP5   | 1,00          | 66,89      | 1,38        | 1,14  | 2,54  | 9,61   | 23,67   | 2,66    | 5,95  | 5,56   | 13,02  | 27,89   |
| HPGD    | 1,00          | 182,19     | 0,68        | 0,96  | 2,79  | 18,98  | 55,76   | 4,18    | 7,90  | 10,12  | 25,79  | 69,22   |
| NCAPD3  | 1,00          | 31,69      | 0,77        | 1,01  | 1,09  | 3,56   | 8,83    | 1,39    | 1,58  | 1,69   | 3,53   | 9,35    |
| NKX3.1  | 1,00          | 10,80      | 4,26        | 5,54  | 7,05  | 11,94  | 14,20   | 7,12    | 9,47  | 7,96   | 9,85   | 12,67   |
| NOV     | 1,00          | 0,06       | 0,55        | 0,28  | 0,55  | 0,42   | 0,21    | 0,27    | 0,51  | 0,31   | 0,29   | 0,17    |
| ORM1    | 1,00          | 6535,38    | 2,17        | 4,85  | 18,77 | 242,08 | 2114,41 | 44,44   | 58,96 | 101,45 | 459,30 | 1357,12 |
| PLD1    | 1,00          | 0,02       | 0,67        | 0,76  | 0,60  | 0,42   | 0,41    | 0,49    | 0,44  | 0,30   | 0,45   | 0,36    |
| PCA     | 1,00          | 3,43       | 1,95        | 2,25  | 3,02  | 4,05   | 5,02    | 3,71    | 3,26  | 3,00   | 5,07   | 5,16    |
| SLUG    | 1,00          | 99,20      | 1,21        | 1,55  | 3,28  | 16,87  | 107,64  | 5,56    | 5,91  | 8,15   | 26,35  | 56,48   |
| STEAP4  | 1,00          | 1706,02    | 1,13        | 2,15  | 9,98  | 96,53  | 343,81  | 20,36   | 27,49 | 46,06  | 187,24 | 479,64  |
| TMPRSS2 | 1,00          | 25,55      | 3,11        | 3,85  | 5,39  | 9,20   | 18,61   | 6,36    | 6,29  | 5,84   | 10,90  | 14,20   |

## LNCaP/SRαF876L: антагонист транскрипции

|         |               |            | + 1 нМ R1881 |        |        |        |         |         |         |         |         |         |
|---------|---------------|------------|--------------|--------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|         |               |            | Энзалутамид  |        |        |        |         | ARN-509 |         |         |         |         |
| Ген     | Несущая среда | 1 нМ R1881 | 0,3 мкМ      | 1 мкМ  | 3 мкМ  | 10 мкМ | 30 мкМ  | 0,3 мкМ | 1 мкМ   | 3 мкМ   | 10 мкМ  | 30 мкМ  |
| AMIGO2  | 1,00          | 0,29       | 0,23         | 0,29   | 0,33   | 0,39   | 0,40    | 0,17    | 0,22    | 0,14    | 0,18    | 0,18    |
| BDNF    | 1,00          | 1,65       | 0,53         | 0,64   | 0,62   | 0,51   | 0,71    | 0,74    | 0,76    | 0,57    | 0,50    | 0,63    |
| CAM2KN1 | 1,00          | 0,03       | 0,08         | 0,12   | 0,19   | 0,24   | 0,32    | 0,03    | 0,03    | 0,06    | 0,11    | 0,17    |
| FASN    | 1,00          | 3,76       | 1,29         | 1,22   | 0,85   | 0,94   | 1,58    | 2,23    | 2,03    | 1,39    | 1,30    | 2,66    |
| FKBP5   | 1,00          | 66,89      | 17,90        | 14,89  | 10,21  | 17,33  | 40,52   | 36,57   | 39,48   | 26,46   | 29,94   | 22,71   |
| HPGD    | 1,00          | 182,19     | 49,66        | 30,03  | 21,62  | 34,77  | 93,52   | 149,34  | 134,70  | 79,93   | 70,80   | 131,79  |
| NCAPD3  | 1,00          | 31,69      | 6,34         | 4,28   | 2,21   | 3,44   | 13,64   | 19,83   | 15,47   | 8,71    | 6,50    | 11,82   |
| NKX3.1  | 1,00          | 10,80      | 21,66        | 20,78  | 16,19  | 11,84  | 15,26   | 12,63   | 14,12   | 11,34   | 10,15   | 13,64   |
| NOV     | 1,00          | 0,06       | 0,12         | 0,28   | 0,25   | 0,33   | 0,26    | 0,05    | 0,06    | 0,09    | 0,11    | 0,09    |
| ORM1    | 1,00          | 6535,38    | 386,40       | 216,67 | 137,73 | 661,51 | 3496,87 | 3335,14 | 2343,29 | 1469,18 | 1608,16 | 3440,86 |
| PLD1    | 1,00          | 0,02       | 0,04         | 0,08   | 0,14   | 0,37   | 0,48    | 0,01    | 0,01    | 0,02    | 0,08    | 0,20    |
| PCA     | 1,00          | 3,43       | 5,84         | 5,63   | 4,47   | 4,54   | 4,64    | 4,93    | 4,38    | 4,59    | 5,28    | 4,17    |
| SLUG    | 1,00          | 99,20      | 85,97        | 64,63  | 35,50  | 48,80  | 161,58  | 85,97   | 64,63   | 35,50   | 48,80   | 161,58  |
| STEAP4  | 1,00          | 1706,02    | 259,94       | 147,25 | 83,20  | 275,88 | 645,04  | 259,94  | 147,25  | 83,20   | 275,88  | 645,04  |
| TMPRSS2 | 1,00          | 25,55      | 14,05        | 13,81  | 11,78  | 12,92  | 20,19   | 14,05   | 13,81   | 11,78   | 12,92   | 20,19   |

## LNCaP/pCDNAF876L: агонист транскрипции

|         |               |            | - R1881     |        |        |         |         |         |         |         |         |         |
|---------|---------------|------------|-------------|--------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|         |               |            | Энзалутамид |        |        |         |         | ARN-509 |         |         |         |         |
| Ген     | Несущая среда | 1 нМ R1881 | 0,3 мкМ     | 1 мкМ  | 3 мкМ  | 10 мкМ  | 30 мкМ  | 0,3 мкМ | 1 мкМ   | 3 мкМ   | 10 мкМ  | 30 мкМ  |
| AMIGO2  | 1,00          | 0,92       | 1,28        | 0,82   | 0,87   | 0,72    | 0,91    | 1,07    | 0,86    | 1,25    | 0,60    | 1,55    |
| BDNF    | 1,00          | 1,01       | 1,54        | 1,04   | 1,11   | 0,82    | 0,64    | 1,01    | 0,76    | 0,87    | 0,85    | 1,16    |
| CAM2KN1 | 1,00          | 0,02       | 0,55        | 0,96   | 0,51   | 0,37    | 0,23    | 0,47    | 0,55    | 0,34    | 0,41    | 0,27    |
| FASN    | 1,00          | 22,20      | 0,91        | 0,72   | 0,48   | 1,27    | 3,66    | 1,16    | 1,42    | 1,59    | 1,79    | 7,86    |
| FKBP5   | 1,00          | 145,63     | 2,18        | 2,91   | 4,28   | 10,54   | 42,25   | 7,24    | 7,82    | 9,52    | 17,39   | 55,55   |
| HPGD    | 1,00          | 854,42     | 4,70        | 6,32   | 13,26  | 26,78   | 105,81  | 15,36   | 19,27   | 29,25   | 47,33   | 173,82  |
| NCAPD3  | 1,00          | 169,67     | 1,95        | 1,94   | 3,68   | 9,41    | 35,36   | 5,83    | 6,52    | 8,28    | 20,42   | 51,13   |
| NKX3.1  | 1,00          | 9,67       | 3,76        | 3,71   | 3,57   | 4,69    | 8,12    | 6,07    | 5,72    | 5,93    | 7,05    | 11,69   |
| NOV     | 1,00          | 0,08       | 1,73        | 1,62   | 2,19   | 0,88    | 0,49    | 1,24    | 1,01    | 0,82    | 0,86    | 0,72    |
| ORM1    | 1,00          | 12816,69   | 116,91      | 195,36 | 659,73 | 2530,13 | 4760,77 | 932,41  | 1371,33 | 2307,29 | 3322,63 | 5541,08 |
| PLD1    | 1,00          | 0,75       | 1,37        | 0,80   | 0,69   | 0,29    | 0,45    | 0,78    | 0,69    | 1,01    | 0,68    | 0,48    |
| PCA     | 1,00          | 12,17      | 3,56        | 4,04   | 5,29   | 9,53    | 11,70   | 6,74    | 7,19    | 8,25    | 10,06   | 12,99   |
| SLUG    | 1,00          | 268,77     | 1,99        | 3,53   | 4,74   | 14,91   | 55,93   | 7,84    | 8,70    | 10,91   | 21,21   | 71,08   |
| STEAP4  | 1,00          | 3084,81    | 10,38       | 15,58  | 46,50  | 240,68  | 520,15  | 113,39  | 113,29  | 173,77  | 317,80  | 597,09  |
| TMPRSS2 | 1,00          | 26,85      | 4,98        | 6,46   | 6,09   | 8,51    | 21,78   | 9,49    | 8,51    | 9,70    | 11,09   | 23,01   |



## LNCaP/pCDNAF876L: антагонист транскрипции

|         |               |            | + 1 нМ R1881 |         |        |         |         |         |         |         |         |         |
|---------|---------------|------------|--------------|---------|--------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
|         |               |            | Энзалутамид  |         |        |         |         | ARN-509 |         |         |         |         |
| Ген     | Несущая среда | 1 нМ R1881 | 0,3 мкМ      | 1 мкМ   | 3 мкМ  | 10 мкМ  | 30 мкМ  | 0,3 мкМ | 1 мкМ   | 3 мкМ   | 10 мкМ  | 30 мкМ  |
| AMIGO2  | 1,00          | 0,92       | 0,51         | 0,43    | 0,39   | 0,49    | 0,52    | 0,24    | 0,31    | 0,43    | 0,41    | 0,40    |
| BDNF    | 1,00          | 1,01       | 0,59         | 0,71    | 0,53   | 0,50    | 0,41    | 0,28    | 0,41    | 0,42    | 0,45    | 0,34    |
| CAM2KN1 | 1,00          | 0,02       | 0,05         | 0,16    | 0,17   | 0,21    | 0,14    | 0,01    | 0,02    | 0,06    | 0,11    | 0,06    |
| FASN    | 1,00          | 22,20      | 5,29         | 2,44    | 1,55   | 2,08    | 4,22    | 3,89    | 5,52    | 3,22    | 2,10    | 3,98    |
| FKBP5   | 1,00          | 145,63     | 53,18        | 26,29   | 10,03  | 14,22   | 32,97   | 45,69   | 48,95   | 38,89   | 24,82   | 30,26   |
| HPGD    | 1,00          | 854,42     | 149,44       | 59,67   | 21,66  | 35,90   | 96,55   | 192,05  | 170,69  | 107,79  | 73,28   | 87,03   |
| NCAPD3  | 1,00          | 169,67     | 101,65       | 31,49   | 14,34  | 16,69   | 42,06   | 68,41   | 90,52   | 62,27   | 22,96   | 44,10   |
| NKX3.1  | 1,00          | 9,67       | 8,53         | 7,05    | 5,69   | 5,54    | 7,61    | 3,08    | 5,95    | 5,42    | 4,81    | 5,24    |
| NOV     | 1,00          | 0,08       | 0,08         | 0,17    | 0,32   | 0,49    | 0,39    | 0,02    | 0,10    | 0,12    | 0,26    | 0,18    |
| ORM1    | 1,00          | 12816,69   | 4375,20      | 1581,76 | 587,00 | 1377,92 | 3765,54 | 4802,10 | 4943,10 | 3366,19 | 2576,38 | 2470,99 |
| PLD1    | 1,00          | 0,75       | 0,08         | 0,12    | 0,09   | 0,11    | 0,12    | 0,04    | 0,12    | 0,05    | 0,06    | 0,04    |
| PCA     | 1,00          | 12,17      | 16,08        | 12,73   | 7,92   | 8,12    | 14,27   | 10,36   | 14,01   | 12,21   | 10,27   | 13,14   |
| SLUG    | 1,00          | 268,77     | 166,04       | 86,01   | 30,23  | 36,56   | 98,34   | 112,06  | 134,56  | 113,34  | 69,55   | 85,38   |
| STEAP4  | 1,00          | 3084,81    | 524,97       | 156,24  | 47,11  | 92,80   | 214,69  | 633,57  | 587,91  | 376,66  | 195,78  | 232,63  |
| TMPRSS2 | 1,00          | 26,85      | 19,03        | 16,05   | 8,14   | 8,92    | 15,32   | 12,13   | 15,75   | 14,19   | 12,99   | 12,67   |

**Пример 12. Взаимодействие N- и C-экспрессии генов-мишеней AR в и пролиферация клеточных линий рака предстательной железы с F876L**

Взаимодействие N-конца AR с C-концом AR важно для обеспечения полной возможности трансактивации AR. Многие полные и частичные агонисты AR стимулируют AF2-зависимое N-C-взаимодействие. Проводили двухгибридный анализ взаимодействия N-C-концов для оценки взаимодействия N- и C-конца AR в мутанте F87L в присутствии ARN-509 и энзалутамида.

Создавали pM-AR1-660, pVP16-AR507-919 и pVP16-F876L507-919 путем субклонирования соответствующих продуктов ПЦР из pCDNA3-AR и pCDNA3-F876L в pM и pVP16 (Clontech). Для анализов взаимодействия N-C-концов проводили тройные трансфекции, применяя 50 нг pM-AR1-660, 75 нг pVP16-AR507-919 или pVP16-F876L507-919, 25 нг pMH100-Luc и 10 нг pRL (Promega). Трансфицированные клетки инкубировали в течение 4 часов и затем обрабатывали лигандом. ARN-509 и энзалутамид анализировали при 8 мкМ, а R1881 - при 1 нМ.

В соответствии с их транскрипционной активностью энзалутамид и ARN-509 стимулировали N-C-взаимодействие AR-F876L, но не AR дикого типа (Фиг. 8). Таким образом, активность ARN-509 и энзалутамида в качестве агониста на AR-F876L связана с агонист-подобной конформацией AF-2.

**Пример 13. Иммунопреципитационный анализ хроматина AR**

Транскрипционная активация андрогенрегулируемых генов-мишеней AR требует индуцируемого агонистом связывания ДНК и последующий рекрутинг корегуляторов транскрипции. Для подтверждения результатов по репортеру в VP16-AR, указывающих на то, что ARN-509 и энзалутамид стимулируют связывание ДНК AR-F876L, был проведен иммунопреципитационный анализ хроматина (ChIP) 6 генов-мишеней AR из клеток, обработанных R1881 и/или каждым антагонистом.

Анализы ChIP проводили, как описано в публикации Joseph et al. (2009 г.) PNAS USA 106:12178-83. Вкратце, клетки LNCaP/AR(cs) и LNCaP SR $\alpha$ F876L высевали в чашки 150 мм ( $7 \times 10^6$

клеток в 20 мл) в RPMI 1640 с добавлением 10% CSS в течение 3 дней. Затем клетки обрабатывали 10 мкМ антагониста в присутствии или в отсутствие 1 нМ R1881 в течение 4 часов. После обработки лигандом в среду добавляли формальдегид до конечной концентрации 1%, инкубировали в течение 10 мин и гасили глицином (конечная концентрация 125 мМ) в течение 5 минут. Клетки трижды промывали ФСБ, содержащим одноразовый коктейль для ингибирования протеазы и фосфатазы 1X Halt™ Protease & Phosphatase Single-Use Inhibitor Cocktail (1X PI, Thermo Scientific), гранулировали, лизировали в 1 мл буфера RIPA (50 мМ Tris с pH 7,5, 0,15 М NaCl, 1% NP-40, 0,5% Na дезоксихолата, 0,05% SDS, 1 мМ ЭДТА, 1X PI) и обрабатывали ультразвуком до получения среднего размера фрагмента ДНК ≈500 п.о. Обработанный ультразвуком поперечносшитый хроматин разбавляли в 3,3 мл RIPA и предварительно осветляли 100 мл 50% белковой A/G агарозной суспензии (SC-2003, Santa Cruz Biotechnology), содержащей 200 мг на мл обработанной ультразвуком ДНК из молок лосося и 500 мг на мл БСА. Затем один мл предварительно осветленного хроматина иммунопреципитировали 15 мкг анти-AR (SC-816, Santa Cruz Biotechnology) или нормальным IgG кролика (SC-2027, Santa Cruz Biotechnology) в течение 2 часов при 4°C, после чего добавляли 100 мл 50% суспензии белковых A/G агарозных гранул и инкубировали в течение ночи при 4°C. Гранулы 2 раза промывали последовательно в буфере с низким содержанием соли (50 мМ HEPES pH 7,8, 140 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1% Triton X-100, 0,1% Na дезоксихолата, 0,1% SDS), буфере с высоким содержанием соли (то же самое, что и буфер с низким содержанием соли, но с 500 мМ NaCl), буфере LiCl (20 мМ Tris pH 8,0, 1 мМ ЭДТА, 250 мМ LiCl, 0,5% NP-40, 0,5% Na дезоксихолата) и буфере TE (50 мМ Tris pH 8,0, 1 мМ ЭДТА). Все стадии промывки проводили в присутствии 1X PI. ДНК-белковые комплексы дважды элюировали в 225 мл буфера для элюирования (50 мМ Tris pH 8,0, 1 мМ ЭДТА, 1% SDS) при 65°C в течение 15 минут. Элюированные ДНК-белковые комплексы обратно поперечно сшили в присутствии NaCl в течение ночи при 65°C и дополнительно

обработали ЭДТА и протеиназой К при 42°C в течение 1 часа. Фрагменты ДНК очищали в 10 мМ Tris pH 8,5, применяя набор для очистки для ПЦР QIAquick (Qiagen), разбавляли и анализировали с помощью ПЦР в реальном времени, применяя iTaq SYBR Green Supermix with ROX (Bio-Rad). Образцы амплифицировали на приборе ABI 7900HT. Последовательности олигонуклеотидных праймеров представлены в таблице 8.

Таблица 8

Последовательности олигонуклеотидов для ПЦР  
в реальном времени ChIP

| Ген     | Последовательность прямого праймера         | Последовательность обратного праймера       |
|---------|---|---|
| PCSA E2 | ACCTGCTCAGCSTTTGTCTCTGAT<br>(SEQ ID NO: 50) | AGATCCAGGCTTGCTTACTGTCCT<br>(SEQ ID NO: 51) |
| PCSA D1 | ATTCTGGGTTGGGAGTGCAAGGAA<br>(SEQ ID NO: 52) | AGGAGACATGCCCAGGATGAAACA<br>(SEQ ID NO: 53) |
| STEAP4  | ACTAGGCAGGACATTGACATCCCA<br>(SEQ ID NO: 54) | ACAGTAAACCTCTCCACACATGGC<br>(SEQ ID NO: 55) |
| FASN    | TATGACACCCAGGGCTTTCGTTCA<br>(SEQ ID NO: 56) | TAACGTTCCCTGCGCGTTTACAGA<br>(SEQ ID NO: 57) |
| TMPRSS2 | TCCCAAATCCTGACCCCA<br>(SEQ ID NO: 58)       | ACCACACAGCCCCTAGGAGA<br>(SEQ ID NO: 59)     |
| NKX3.1  | ACAGGGTGGCCCAAATAGAAC<br>(SEQ ID NO: 60)    | CCTGTCTTGGACAAGCGGAGA<br>(SEQ ID NO: 61)    |
| ORM1    | GGGTCATTTCCACCACCTCAAACA<br>(SEQ ID NO: 62) | GGAGAAAGGCCTTACAGTAGTCTC<br>(SEQ ID NO: 63) |

В клетках LNCaP/AR(cs) R1881 стимулировал связывание AR с ДНК (Фиг. 9). В соответствии с данными по репортеру VP16-AR как ARN-509, так и энзалутамид стимулировали связывание AR с ДНК в клетках LNCaP/SR $\alpha$ F876L. В присутствии R1881 все антагонисты ингибировали R1881-стимулируемое связывание AR с ДНК до уровней, соответствующих их активности в роли частичных агонистов или антагонистов в обеих клеточных линиях (Фиг. S9 в дополнительных материалах).

**Пример 14. Воздействия AR F876L *in vivo***

Чтобы определить, придает ли F876L резистентность к энзалутамиду и ARN-509 *in vivo*, клеточные линии LNCaP со стабильной экспрессией AR F876L вводили путем инъекции (подкожно) кастрированным иммунодефицитным мышам и вырабатывали опухоли.

Все исследования на животных проводили в соответствии с протоколами, утвержденными Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию, следуя рекомендациям по надлежащему гуманному использованию животных для исследовательских целей. Эксперименты с ксенотрансплантатами *in vivo* проводили на самцах мышей линии SCID Hairless Outbred (SHO) (Charles Rivers Laboratories). У мышей проводили орхиэктомию под изофлорановой анестезией и давали им 7-10 дней для восстановления. Клетки LNCaP/AR(cs) или LNCaP/SR $\alpha$ F876L (как описано выше) суспендировали в 50% RPMI, 50% Matrigel (BD Biosciences) и вводили путем инъекции  $3 \times 10^6$  клеток/ксенотрансплантат в объеме 100 мкл. Животных осматривали еженедельно до явного роста опухоли. Через 40-60 дней после инъекции животных случайным образом распределяли по когортам с эквивалентной средней величиной (150-250 мм<sup>3</sup>) и диапазоном опухолевой нагрузки. Все соединения вводили ежедневно перорально через зонд в дозе 30 мг/кг/день соединения. Для всех исследований с ксенотрансплантатами LNCaP/AR(cs) базовые растворы лекарственных средств ARN-509 и энзалутамида готовили в 18% ПЭГ-400, 1% Tween-80 и 1% повидона и для дозирования их готовили в растворе 15% витамин E-TPGS и 65% 0,5% вес/об раствора карбоксиметилцеллюлозы в 20 мМ цитратном буфере (pH 4,0). Фармакокинетику ARN-509 и энзалутамида оценивали в конце исследования, как описано ранее (Clegg et al. (2012 г.) *Cancer Research* 72:1494-503).

В соответствии с данными *in vitro* ни ARN-509, ни энзалутамид 30 мг/кг/день не влияли на рост опухолей LNCaP/AR/SR $\alpha$ F876L (Фиг. 10). Такое отсутствие активности не было следствием неожиданно низкого воздействия соединения, поскольку количественно определенные на день 28 уровни

лекарственного средства в плазме соответствовали результатам предыдущих исследований с ксенотрансплантатами LNCaP/AR (таблица 9). Кроме того, в параллельном эксперименте ARN-509 30 мг/кг/день показал выраженную противоопухолевую активность в модели LNCaP/AR(cs) в соответствии с предыдущими результатами (Фиг. 10).

Таблица 9

**Фармакокинетика ксенотрансплантата LNCaP/SR $\alpha$ F876L**

| Соединение      | Доза        | C <sub>24</sub><br>(мкг/мл) | T <sub>1/2</sub><br>(час) | ППК <sub>0-24</sub><br>(мкг·час/<br>мл) | C <sub>max</sub><br>(мкг/<br>мл) | T <sub>max</sub><br>(час) |
|-----------------|-------------|-----------------------------|---------------------------|---|----------------------------------|---------------------------|
| Энзалутами<br>д | 30<br>мг/кг | 9,14                        | 9,9                       | 527,3                                   | 33,5                             | 1,0                       |
| ARN-509         | 30<br>мг/кг | 1,02                        | 7,1                       | 98,9                                    | 9,11                             | 1,0                       |

**Пример 15. Открытое исследование фазы 1/2 по безопасности, фармакокинетике и подтверждению правильности концепции для ARN-509 у пациентов с прогрессирующим кастрационно-резистентным раком предстательной железы (CRPC) поздних стадий**

В данном исследовании выделяли ДНК из образцов плазмы 29 пациентов, участвующих в клиническом исследовании фазы 1/2 для ARN-509 для лечения рака предстательной железы. ДНК проанализировали с применением BEAMing Technology на основе эмульсионной ПЦР (Dressman et al. (2003 г.) PNAS USA100:8817-22). Ранее BEAMing успешно применяли для обнаружения различных связанных с опухолями мутаций в активирующих онкогенах, таких как PIK3 $\alpha$  и K-ras в ctDNA, полученных из плазмы человека (Diehl et al. (2008 г.) *Nature Medicine* 14:985-90). Мутацию F876L AR выявили у 3 из 29 протестированных образцов пациентов.

Проведенное клиническое исследование представляло собой многоинституциональное исследование фазы 1/2, впервые проведенное с участием людей, с повышением дозы и подтверждением правильности концепции по 9 уровням доз, в котором допущенные к исследованию пациенты с прогрессирующим CRPC поздних стадий получали дозы ARN-509 перорально в

амбулаторных условиях, чтобы определить безопасность и фармакокинетику (ФК) и для предварительного подтверждения противоопухолевых воздействий ARN-509.

Пациенты с метастазирующим CRPC были распределены последовательно по уровням доз в когорты по 3-6 пациентов для уровня дозы, применяя стандартный критерий повышения дозы 3×3.

Цель заключалась в определении максимальной переносимой дозы (MTD) и/или рекомендованной дозы фазы 2 (RP2D) для ARN-509, которая приводит к дозолимитирующей токсичности (DLT) у максимум 30% пациентов. Токсичность DLT по существу определяют как любые судороги степени 1 или выше, любая негематологическая токсичность степени 3-4 (токсичность для ЖКТ должна быть степени 3-4, несмотря на максимальную медикаментозную терапию) и/или гематологическая токсичность степени 4 продолжительностью более 5 дней, определяемые по Общим критериям терминологии для обозначения нежелательных явлений (CTCAE) V4.0, которые оценивают как связанные с лечением ARN-509. Схема плана исследования представлена на Фиг. 11.

Допущенные к исследованию пациенты, которые подписали документы об информированном согласии, были исходно включены в когорту с повышением дозы, где они перорально получали однократную дозу ARN-509 с последующим наблюдением в течение одной недели (неделя ФК). Непрерывное дозирование начиналось в день 1 цикла 1 при условии отсутствия признаков неприемлемой токсичности.

Минимум 3 субъекта с каждым уровнем дозы контролировали на DLT вплоть до дня 28 цикла 1. Если у первых 3 пациентов с каждым уровнем дозы не наблюдались DLT, последующая группа переходила на следующий уровень дозы. Если 2 или более пациентов испытывали DLT при заданном уровне дозы или наблюдался единичный эпизод судорог любой степени при заданном уровне дозы, повышение дозы прекращалось, и MTD определяли как предыдущий уровень дозы. Если DLT не наблюдались, RP2D определяли на основании общего профиля фармакокинетики и безопасности ARN-509 и оптимальной биологической дозы,

определенной на основании доклинических данных, и не обязательно MTD.

Начальная доза составляла 30 мг/день с повышением до 60 мг, 90 мг, 120 мг, 180 мг, 240 мг, 300 мг, 390 мг и 480 мг в день. Предполагалось, что данные уровни доз покрывают предполагаемый фармакологически активный диапазон доз и находятся в пределах безопасной области, указанной по результатам доклинических токсикологических исследований.

После выбора 240 мг в качестве RP2D в исследование включали дополнительных допущенных к исследованию пациентов для участия в части фазы 2 исследования, состоящей из 3 одновременных расширенных когорт с MTD и/или RP2D для сбора дополнительной информации по безопасности и получения исходного сигнала о противоопухолевой активности. Такие три расширенные когорты включали:

1. ранее не получавших лечения пациентов с метастазирующим CRPC (50 пациентов с метастазирующим CRPC, ранее не получавших химиотерапии или лечения абиратероном);

2. ранее не получавших лечения пациентов с метастазирующим CRPC (20 пациентов с метастазирующим CRPC, ранее не получавших химиотерапии или лечения абиратероном); и

3. ранее получавших лечение абиратероном пациентов с метастазирующим CRPC (10-20 пациентов).

Ожидалось, что каждый пациент с метастазирующим CRPC пройдет по меньшей мере 3 цикла (12 недель) непрерывного лечения, а каждый пациент с метастазирующим CRPC пройдет по меньшей мере 4 цикла (16 недель) непрерывного лечения. Лечение прерывали в любой момент при определенном в протоколе прогрессировании заболевания или неприемлемой токсичности. Оценки опухолей проводили каждые 3 цикла (12 недель) у пациентов с метастазирующим CRPC и каждые 4 цикла (16 недель) у пациентов с метастазирующим CRPC. Безопасность оценивали с получения первой дозы и до по меньшей мере четырех недель после получения последней дозы, или до устранения симптомов связанной с лекарственным средством токсичности, или до момента, когда токсичность становится необратимой, в зависимости от того,



какой период был более продолжительным. Воздействие приема пищи на абсорбцию ARN-509 и воздействие ARN-509 на реполяризацию желудочков оценивали на расширенной фазе исследования фазы 2 в выбранных клинических центрах.

Анализ образцов с применением технологии BEAMing в текущем клиническом исследовании ARN-509 был проведен компанией Inostics GmbH. Кровь забирали в вакуумные пробирки K2-EDTA и тщательно перемешивали путем нескольких медленных переворотов. Не позднее чем через 30 минут после забора пробирки центрифугировали при 2000×g в течение 15 минут. Плазму декантировали и переносили в пробирки для криохранения. Не позднее чем через 90 минут после декантирования плазму замораживали до -70°C или ниже и хранили до анализа. ДНК очищали из аликвот плазмы 300-500 мкл и экстрагировали так, как описано в публикации Diehl et al. (2008 г.) *Nature medicine* 14:985-90. Обнаружение мутации проводили в соответствии с технологией BEAMing, как описано в публикации Diehl et al. Вкратце, на исходной стадии ПЦР область-мишень (~100 п.о.) амплифицировали с применением генспецифичных праймеров с последовательностями метки и подвергали эмульсионной ПЦР, во время которой использовали покрытые праймерами магнитные гранулы. После эмульсионной ПЦР проводили дискриминацию гранул дикого типа и мутантных гранул путем аллельспецифичной гибридизации с последующей проточной цитометрией. Результаты проточной цитометрии анализировали с применением FCS Express (De Novo Software, г. Лос-Анджелес, штат Калифорния, США), получив отношение мутантных аллелей к аллелям дикого типа.

Образцы анализировали на наличие AR дикого типа или 3 одноточечных мутантных аллелей, которые могут привести к F876L (t2988c, c2990a и c2990g (или t2626c, c2628a и c2928g соответственно, относительно кодирующей нуклеиновую кислоту AR последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18)). Проанализированные мутации и техническая чувствительность способа BEAMing показаны в таблице 10. Для обнаружения частота должна превышать полное количество геномного эквивалента,

применяемого в анализе. Например, если в образце присутствует 1000 геномных эквивалентов и при этом рассчитанная доля мутантных молекул ДНК составляет 0,02% (1 мутантный аллель на 5000 аллелей дикого типа), то образец классифицируется как дикий тип.

Таблица 10

**Замены нуклеотидов AR, контролируемые с помощью анализа  
BEAMing**

| <b>Позиция нуклеотида</b> | <b>Замена нуклеотида</b> | <b>Позиция аминокислоты</b> | <b>Замена аминокислоты</b> |
|---------------------------|--------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| c.2626                    | t>c                      | 876                         | F>L                        |
| c.2628                    | c>a                      | 876                         | F>L                        |
| c.2628                    | c>g                      | 876                         | F>L                        |

**Результаты**

У подмножества пациентов по всем группам доз наблюдали ответ ПСА, причем у 14/30 пациентов наблюдали  $\geq 50\%$  снижение ПСА на неделе 12 в сравнении с базовым уровнем. Ответ ПСА у 29 прошедших скрининг пациентов показан на Фиг. 12. Анализировали образцы плазмы до лечения и во время лечения. Время анализа BEAMing указано концом кривой ответа ПСА. Восемнадцать из 29 пациентов имели ПСА выше базового уровня во время анализа, что указывает либо на собственную, либо на приобретенную резистентность к ARN-509.

Для контроля 3 нуклеотидных изменений, которые могут кодировать аминокислотную замену F876L, создали три зонда. Эксперименты по смешиванию разбавлением с мутантной последовательностью и ДНК дикого типа показали техническую чувствительность 0,02% (потенциал обнаружения 1 мутантной последовательности среди 5000 последовательностей дикого типа). При исходном скрининге образцов плазмы 29 пациентов, получавших лечение ARN-509, признаки мутации были обнаружены у 3 пациентов (таблицы 11 и 12). На момент анализа BEAMing пациенты 7 и 10 имели уровни ПСА выше базового уровня, а у пациента 13 наблюдался подъем ПСА над нижней точкой во время лечения (Фиг. 13). У всех 3 пациентов была обнаружена нуклеотидная замена

c2628a. У одного из данных 3 пациентов (пациент 10) также был обнаружен мутант t2626c, что указывает на поликлональное заболевание. Кодирующие F876L мутации не были обнаружены ни в одном из образцов, взятых до лечения (0/29), что указывает на то, что если они и присутствовали до лечения ARN-509, то были ниже предела обнаружения, или что мутации возникли *de novo* во время лечения ARN-509. В любом сценарии данные подтверждают гипотезу о том, что селективное выращивание несущих мутантный аллель повреждений до уровней, достаточных для обнаружения в цодНК, зависит от хронического воздействия ARN-509 и связано с ростом ПСА. Для дополнительного установления связи F876L с прогрессированием заболевания мы проанализировали образцы плазмы, взятые в дополнительные временные точки у 3 пациентов, классифицированных как положительные при исходном скрининге (таблица 12). У пациента 10 мутация не была обнаружена в одной дополнительно проанализированной временной точке (цикл 4; ПСА 102% от T0). У пациента 13 мутация не была обнаружена в цикле 4 (ПСА 16,2% от базового уровня) или в цикле 12 (пациент классифицирован как положительный в цикле 11). В цикле 11 мутантная последовательность была на пределе обнаружения и, по оценкам, возникла в результате амплификации единственной мутантной молекулы. Хотя ПСА у пациента 13 медленно рос от низшей точки во время лечения в циклах 11 и 12, в обеих временных точках ПСА все равно был на >60% ниже уровня на начало исследования, и, таким образом, явной резистентности еще не возникло. Выявление мутантной последовательности на пределе обнаружения, вероятно, отражает наличие относительно редкого мутантного клона, который обладает потенциалом к размножению в условиях непрерывного селективного давления и в конце концов приводит к прогрессированию заболевания.

Принимая во внимание относительно большую продолжительность лечения пациента 7, проанализировали образцы плазмы в дополнительные временные точки во время явного снижения ПСА (> 90% снижение от базового уровня; циклы 4, 8 и 10) и при исходном росте ПСА от его низшей точки (циклы 15 и 19) (Фиг. 13). Интересно отметить, что в 3 образцах из цикла

лечения 4, 8 и 10 мутации обнаружены не были, тогда как в 2 образцах, проанализированных при исходном росте ПСА (циклы 15 и 19), была обнаружена мутация с2628а. Эти клинические данные согласуются с доклиническими данными, указывающими на достаточность аминокислотной замены F876L для придания резистентности к ARN-509.

Таблица 11

## Результаты BEAMing для положительных по F876L пациентов

| Пациент | Цикл лечения* | ПСА<br>[Процентная<br>доля от<br>значения в<br>день 0] | Классификация<br>генотипа | Частота мутанта<br>[мутантные<br>гранулы/гранулы<br>дикого типа ×100] |        |        |
|---------|---------------|--|---------------------------|---|--------|--------|
|         |               |  |                           | c2990a  | c2990g | t2988c |
| 7       | 0             | 100  | Дикий тип                 | -   | -      | -      |
| 7       | 4             | 1,4  | Дикий тип                 | -   | -      | -      |
| 7       | 8             | 3,3  | Дикий тип                 | -   | -      | -      |
| 7       | 10            | 5,6  | Дикий тип                 | -   | -      | -      |
| 7       | 15            | 41,2   | Мутант                    | 0,162   | -      | -      |
| 7       | 19            | 97,2   | Мутант                    | 5,005   | -      | -      |
| 7       | 22            | 281,0  | Мутант                    | 1,002   | -      | -      |
| 10      | 0             | 100  | Дикий тип                 | -   | -      | -      |
| 10      | 4             | 102  | Дикий тип                 | -   | -      | -      |
| 10      | 7             | 245  | Мутант                    | 0,051   | -      | 0,12   |
| 13      | 0             | 100  | Дикий тип                 | -   | -      | -      |
| 13      | 4             | 16,2   | Дикий тип                 | -   | -      | -      |
| 13      | 11            | 31,7   | Мутант                    | 0,065   | -      | -      |
| 13      | 12            | 39,5   | Дикий тип                 | -   | -      | -      |

\*Продолжительность цикла лечения составляла 4 недели; цикл 0 соответствует временной точке до лечения.

Таблица 12

Первичный анализ BEAMing по F876L для пациентов из ARN-509-001

| Пациент | Ответ<br>ПСА на<br>неделе<br>12 | Анализ<br>BEAMing<br>Цикл<br>лечения* | ПСА на момент<br>проведения<br>анализа<br>BEAMing<br>[Процентная<br>доля от<br>базового<br>уровня] | Класси-<br>фикация<br>генотипа<br>на базовом<br>уровне <sup>#</sup> | Класси-<br>фикация<br>генотипа в<br>процессе<br>лечения |
|---------|---------------------------------|---------------------------------------|--|---|---|
| 1       | 30,49                           | 19                                    | 195,4  | Дикий тип   | Дикий тип   |
| 2       | -61,8                           | 10                                    | 337,08   | Дикий тип   | Дикий тип   |
| 3       | 22,7                            | 4                                     | 122  | Дикий тип   | Дикий тип   |
| 4       | 12,4                            | 5                                     | 134  | Дикий тип   | Дикий тип   |
| 5       | -70,65                          | 8                                     | 16   | Дикий тип   | Дикий тип   |
| 6       | -90,02                          | 10                                    | 84,6   | Дикий тип   | Дикий тип   |
| 7       | -98,6                           | 22                                    | 281  | Дикий тип   | Мутант  |
| 8       | -62,2                           | 16                                    | 10,2   | Дикий тип   | Дикий тип   |
| 9       | 26,38                           | 7                                     | 185  | Дикий тип   | Дикий тип   |
| 10      | 2,33                            | 7                                     | 245  | Дикий тип   | Мутант  |
| 11      | -49,76                          | 8                                     | 143,88   | Дикий тип   | Дикий тип   |
| 12      | -56,65                          | 7                                     | 99,47  | Дикий тип   | Дикий тип   |
| 13      | -83,79                          | 11                                    | 31,7   | Дикий тип   | Мутант  |
| 14      | -43,21                          | 11                                    | 150,5  | Дикий тип   | Дикий тип   |
| 15      | 164,14                          | 3                                     | 220  | Дикий тип   | Дикий тип   |
| 16      | 89,09                           | 4                                     | 189  | Дикий тип   | Дикий тип   |
| 17      | -45,86                          | 4                                     | 54,14  | Дикий тип   | Дикий тип   |
| 18      | -95,65                          | 6                                     | 7,34   | Дикий тип   | Дикий тип   |
| 19      | -71,19                          | 11                                    | 196,86   | Дикий тип   | Дикий тип   |
| 20      | -30,88                          | 21                                    | 89,3   | Дикий тип   | Дикий тип   |
| 21      | -74,43                          | 10                                    | 46,91  | Дикий тип   | Дикий тип   |
| 22      | -82,7                           | 25                                    | 0,19   | Дикий тип   | Дикий тип   |
| 23      | 97,78                           | 8                                     | 222,46   | Дикий тип   | Дикий тип   |

|    |        |    |        |           |           |
|----|--------|----|--------|-----------|-----------|
| 24 | -74,86 | 25 | 4,89   | Дикий тип | Дикий тип |
| 25 | -30,07 | 12 | 161    | Дикий тип | Дикий тип |
| 26 | 96,51  | 5  | 214,85 | Дикий тип | Дикий тип |
| 27 | -0,89  | 13 | 20,69  | Дикий тип | Дикий тип |
| 28 | -33,59 | 10 | 126    | Дикий тип | Дикий тип |
| 29 | -58,44 | 13 | 105    | Дикий тип | Дикий тип |

**Пример 16. Способ создания клеточных линий для скрининга лекарственных средств**

Для выявления соединений, которые сохраняют активность в качестве антагониста AR в контексте мутации F876L андрогенного рецептора, можно использовать ряд анализов *in vitro* и *in vivo*, как описано выше.

В условиях *in vitro* для выявления соединений, не имеющих активности в качестве агониста и проявляющих полный антагонизм к транскрипционной активности как AR дикого типа, так и мутантного AR F876L, применяется анализ транскрипции после временной трансфекции, аналогичный описанному в примере 8. Для такого скрининга используют клетки HEPG2 или любую эукариотическую клетку, в которой можно контролировать транскрипционную активность AR.

В качестве альтернативы временной трансфекции в ряд клеточных линий стабильно встраивают транскрипционный репортер и AR F876L, которые могут применяться для скрининга соединений. Стабильное встраивание мутантного AR F876L в клеточную линию андрогенчувствительного рака предстательной железы, такую как LNCaP, LaPC4 или VCaP, путем встраивания с применением плазмиды (т.е. pCDNA3.1) или вирусов позволяет проводить скрининг и оценку соединений в условиях анализа транскрипции, пролиферации и использования ксенотрансплантатов. Вкратце, AR F876L клонируют в ретровирусный вектор экспрессии, такой как pQCXIP (Clontech, г. Маунтин-Вью, штат Калифорния, США). Затем полученную плазмиду применяют для создания вирусных матричных растворов с высоким титром для применения при создании клеточных линий со стабильной трансдукцией в соответствии с протоколом производителя. Полученные клеточные линии применяют

для анализов транскрипции после временной трансфекции, как описано в примере 4, анализов транскрипции эндогенных генов, как описано в примере 5, анализов на пролиферацию, как описано в примере 3, или исследований с ксенотрансплантатами, как описано в примере 1.

Альтернативно клетки дополнительно модифицируют путем стабильного встраивания AR-чувствительного репортера, такого как Signal Lenti AR Reporter (Qiagen, г. Валенсия, штат Калифорния, США), что позволяет проводить скрининг соединений на основе репортера, не требуя временной трансфекции.

Описанные в настоящем документе примеры и варианты осуществления приведены только с целью иллюстрации, и различные модификации или изменения, которые могут предложить специалисты в данной области, считаются входящими в сущность и сферу действия настоящей заявки и в объем приложенной формулы изобретения.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

- <110> Aragon Pharmaceuticals, Inc.  
 Joseph, James David  
 Hager, Jeffrey H.  
 Sensintaffar, John Lee  
 Lu, Nhin  
 Qian, Jing  
 Smith, Nicholas D.
- <120> СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ТЕРАПИИ,  
 НАПРАВЛЕННОЙ НА АНДРОГЕННЫЙ РЕЦЕПТОР
- <130> 38937-725.601
- <150> 61/676,842  
 <151> 2012-07-27
- <150> 61/783,763  
 <151> 2013-03-14
- <150> 61/829,123  
 <151> 2013-05-30
- <160> 63
- <170> PatentIn, версия 3.5
- <210> 1  
 <211> 919  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens
- <400> 1

Met Glu Val Gln Leu Gly Leu Gly Arg Val Tyr Pro Arg Pro Pro Ser  
 1 5 10 15

Lys Thr Tyr Arg Gly Ala Phe Gln Asn Leu Phe Gln Ser Val Arg Glu  
 20 25 30

Val Ile Gln Asn Pro Gly Pro Arg His Pro Glu Ala Ala Ser Ala Ala  
 35 40 45

Pro Pro Gly Ala Ser Leu Leu Leu Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 50 55 60

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Glu Thr  
 65 70 75 80

Ser Pro Arg Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly Glu Asp Gly Ser Pro Gln  
 85 90 95

Ala His Arg Arg Gly Pro Thr Gly Tyr Leu Val Leu Asp Glu Glu Gln  
 100 105 110

Gln Pro Ser Gln Pro Gln Ser Ala Leu Glu Cys His Pro Glu Arg Gly



115

120

125

Cys Val Pro Glu Pro Gly Ala Ala Val Ala Ala Ser Lys Gly Leu Pro  
 130 135 140

Gln Gln Leu Pro Ala Pro Pro Asp Glu Asp Asp Ser Ala Ala Pro Ser  
 145 150 155 160

Thr Leu Ser Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro Gly Leu Ser Ser Cys Ser  
 165 170 175

Ala Asp Leu Lys Asp Ile Leu Ser Glu Ala Ser Thr Met Gln Leu Leu  
 180 185 190

Gln Gln Gln Gln Gln Glu Ala Val Ser Glu Gly Ser Ser Ser Gly Arg  
 195 200 205

Ala Arg Glu Ala Ser Gly Ala Pro Thr Ser Ser Lys Asp Asn Tyr Leu  
 210 215 220

Gly Gly Thr Ser Thr Ile Ser Asp Asn Ala Lys Glu Leu Cys Lys Ala  
 225 230 235 240

Val Ser Val Ser Met Gly Leu Gly Val Glu Ala Leu Glu His Leu Ser  
 245 250 255

Pro Gly Glu Gln Leu Arg Gly Asp Cys Met Tyr Ala Pro Leu Leu Gly  
 260 265 270

Val Pro Pro Ala Val Arg Pro Thr Pro Cys Ala Pro Leu Ala Glu Cys  
 275 280 285

Lys Gly Ser Leu Leu Asp Asp Ser Ala Gly Lys Ser Thr Glu Asp Thr  
 290 295 300

Ala Glu Tyr Ser Pro Phe Lys Gly Gly Tyr Thr Lys Gly Leu Glu Gly  
 305 310 315 320

Glu Ser Leu Gly Cys Ser Gly Ser Ala Ala Ala Gly Ser Ser Gly Thr  
 325 330 335

Leu Glu Leu Pro Ser Thr Leu Ser Leu Tyr Lys Ser Gly Ala Leu Asp  
 340 345 350

Glu Ala Ala Ala Tyr Gln Ser Arg Asp Tyr Tyr Asn Phe Pro Leu Ala  
 355 360 365

Leu Ala Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Pro His Ala Arg

370

375

380

Ile Lys Leu Glu Asn Pro Leu Asp Tyr Gly Ser Ala Trp Ala Ala Ala  
385 390 395 400

Ala Ala Gln Cys Arg Tyr Gly Asp Leu Ala Ser Leu His Gly Ala Gly  
405 410 415

Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Ser Pro Ser Ala Ala Ala Ser Ser Ser  
420 425 430

Trp His Thr Leu Phe Thr Ala Glu Glu Gly Gln Leu Tyr Gly Pro Cys  
435 440 445

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly  
450 455 460

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Glu Ala Gly Ala Val Ala Pro Tyr  
465 470 475 480

Gly Tyr Thr Arg Pro Pro Gln Gly Leu Ala Gly Gln Glu Ser Asp Phe  
485 490 495

Thr Ala Pro Asp Val Trp Tyr Pro Gly Gly Met Val Ser Arg Val Pro  
500 505 510

Tyr Pro Ser Pro Thr Cys Val Lys Ser Glu Met Gly Pro Trp Met Asp  
515 520 525

Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Gly Asp Met Arg Leu Glu Thr Ala Arg Asp  
530 535 540

His Val Leu Pro Ile Asp Tyr Tyr Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys Leu  
545 550 555 560

Ile Cys Gly Asp Glu Ala Ser Gly Cys His Tyr Gly Ala Leu Thr Cys  
565 570 575

Gly Ser Cys Lys Val Phe Phe Lys Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln Lys  
580 585 590

Tyr Leu Cys Ala Ser Arg Asn Asp Cys Thr Ile Asp Lys Phe Arg Arg  
595 600 605

Lys Asn Cys Pro Ser Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Ala Gly Met  
610 615 620

Thr Leu Gly Ala Arg Lys Leu Lys Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu Gln

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 625 |     |     |     |     | 630 |     |     |     |     |     | 635 |     |     |     |     | 640 |
| Glu | Glu | Gly | Glu | Ala | Ser | Ser | Thr | Thr | Ser | Pro | Thr | Glu | Glu | Thr | Thr |     |
|     |     |     |     | 645 |     |     |     |     | 650 |     |     |     |     | 655 |     |     |
| Gln | Lys | Leu | Thr | Val | Ser | His | Ile | Glu | Gly | Tyr | Glu | Cys | Gln | Pro | Ile |     |
|     |     |     | 660 |     |     |     |     | 665 |     |     |     |     | 670 |     |     |     |
| Phe | Leu | Asn | Val | Leu | Glu | Ala | Ile | Glu | Pro | Gly | Val | Val | Cys | Ala | Gly |     |
|     |     | 675 |     |     |     |     | 680 |     |     |     |     | 685 |     |     |     |     |
| His | Asp | Asn | Asn | Gln | Pro | Asp | Ser | Phe | Ala | Ala | Leu | Leu | Ser | Ser | Leu |     |
|     | 690 |     |     |     |     | 695 |     |     |     |     | 700 |     |     |     |     |     |
| Asn | Glu | Leu | Gly | Glu | Arg | Gln | Leu | Val | His | Val | Val | Lys | Trp | Ala | Lys |     |
| 705 |     |     |     |     | 710 |     |     |     |     | 715 |     |     |     |     | 720 |     |
| Ala | Leu | Pro | Gly | Phe | Arg | Asn | Leu | His | Val | Asp | Asp | Gln | Met | Ala | Val |     |
|     |     |     |     | 725 |     |     |     |     | 730 |     |     |     |     | 735 |     |     |
| Ile | Gln | Tyr | Ser | Trp | Met | Gly | Leu | Met | Val | Phe | Ala | Met | Gly | Trp | Arg |     |
|     |     |     | 740 |     |     |     |     | 745 |     |     |     |     | 750 |     |     |     |
| Ser | Phe | Thr | Asn | Val | Asn | Ser | Arg | Met | Leu | Tyr | Phe | Ala | Pro | Asp | Leu |     |
|     |     | 755 |     |     |     |     | 760 |     |     |     |     | 765 |     |     |     |     |
| Val | Phe | Asn | Glu | Tyr | Arg | Met | His | Lys | Ser | Arg | Met | Tyr | Ser | Gln | Cys |     |
|     | 770 |     |     |     |     | 775 |     |     |     |     | 780 |     |     |     |     |     |
| Val | Arg | Met | Arg | His | Leu | Ser | Gln | Glu | Phe | Gly | Trp | Leu | Gln | Ile | Thr |     |
| 785 |     |     |     |     | 790 |     |     |     |     | 795 |     |     |     |     | 800 |     |
| Pro | Gln | Glu | Phe | Leu | Cys | Met | Lys | Ala | Leu | Leu | Leu | Phe | Ser | Ile | Ile |     |
|     |     |     |     | 805 |     |     |     |     | 810 |     |     |     |     | 815 |     |     |
| Pro | Val | Asp | Gly | Leu | Lys | Asn | Gln | Lys | Phe | Phe | Asp | Glu | Leu | Arg | Met |     |
|     |     |     | 820 |     |     |     |     | 825 |     |     |     |     | 830 |     |     |     |
| Asn | Tyr | Ile | Lys | Glu | Leu | Asp | Arg | Ile | Ile | Ala | Cys | Lys | Arg | Lys | Asn |     |
|     |     | 835 |     |     |     |     | 840 |     |     |     |     | 845 |     |     |     |     |
| Pro | Thr | Ser | Cys | Ser | Arg | Arg | Phe | Tyr | Gln | Leu | Thr | Lys | Leu | Leu | Asp |     |
|     | 850 |     |     |     |     | 855 |     |     |     |     | 860 |     |     |     |     |     |
| Ser | Val | Gln | Pro | Ile | Ala | Arg | Glu | Leu | His | Gln | Phe | Thr | Phe | Asp | Leu |     |
| 865 |     |     |     |     | 870 |     |     |     |     | 875 |     |     |     |     | 880 |     |
| Leu | Ile | Lys | Ser | His | Met | Val | Ser | Val | Asp | Phe | Pro | Glu | Met | Met | Ala |     |

885

890

895

Glu Ile Ile Ser Val Gln Val Pro Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val Lys  
900 905 910

Pro Ile Tyr Phe His Thr Gln  
915

<210> 2

<211> 920

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Val Gln Leu Gly Leu Gly Arg Val Tyr Pro Arg Pro Pro Ser  
1 5 10 15

Lys Thr Tyr Arg Gly Ala Phe Gln Asn Leu Phe Gln Ser Val Arg Glu  
20 25 30

Val Ile Gln Asn Pro Gly Pro Arg His Pro Glu Ala Ala Ser Ala Ala  
35 40 45

Pro Pro Gly Ala Ser Leu Leu Leu Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
50 55 60

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
65 70 75 80

Glu Thr Ser Pro Arg Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly Glu Asp Gly Ser  
85 90 95

Pro Gln Ala His Arg Arg Gly Pro Thr Gly Tyr Leu Val Leu Asp Glu  
100 105 110

Glu Gln Gln Pro Ser Gln Pro Gln Ser Ala Leu Glu Cys His Pro Glu  
115 120 125

Arg Gly Cys Val Pro Glu Pro Gly Ala Ala Val Ala Ala Ser Lys Gly  
130 135 140

Leu Pro Gln Gln Leu Pro Ala Pro Pro Asp Glu Asp Asp Ser Ala Ala  
145 150 155 160

Pro Ser Thr Leu Ser Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro Gly Leu Ser Ser  
165 170 175

Cys Ser Ala Asp Leu Lys Asp Ile Leu Ser Glu Ala Ser Thr Met Gln  
180 185 190

Leu Leu Gln Gln Gln Gln Glu Ala Val Ser Glu Gly Ser Ser Ser  
 195 200 205

Gly Arg Ala Arg Glu Ala Ser Gly Ala Pro Thr Ser Ser Lys Asp Asn  
 210 215 220

Tyr Leu Gly Gly Thr Ser Thr Ile Ser Asp Asn Ala Lys Glu Leu Cys  
 225 230 235 240

Lys Ala Val Ser Val Ser Met Gly Leu Gly Val Glu Ala Leu Glu His  
 245 250 255

Leu Ser Pro Gly Glu Gln Leu Arg Gly Asp Cys Met Tyr Ala Pro Leu  
 260 265 270

Leu Gly Val Pro Pro Ala Val Arg Pro Thr Pro Cys Ala Pro Leu Ala  
 275 280 285

Glu Cys Lys Gly Ser Leu Leu Asp Asp Ser Ala Gly Lys Ser Thr Glu  
 290 295 300

Asp Thr Ala Glu Tyr Ser Pro Phe Lys Gly Gly Tyr Thr Lys Gly Leu  
 305 310 315 320

Glu Gly Glu Ser Leu Gly Cys Ser Gly Ser Ala Ala Ala Gly Ser Ser  
 325 330 335

Gly Thr Leu Glu Leu Pro Ser Thr Leu Ser Leu Tyr Lys Ser Gly Ala  
 340 345 350

Leu Asp Glu Ala Ala Ala Tyr Gln Ser Arg Asp Tyr Tyr Asn Phe Pro  
 355 360 365

Leu Ala Leu Ala Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Pro His  
 370 375 380

Ala Arg Ile Lys Leu Glu Asn Pro Leu Asp Tyr Gly Ser Ala Trp Ala  
 385 390 395 400

Ala Ala Ala Ala Gln Cys Arg Tyr Gly Asp Leu Ala Ser Leu His Gly  
 405 410 415

Ala Gly Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Ser Pro Ser Ala Ala Ala Ser  
 420 425 430

Ser Ser Trp His Thr Leu Phe Thr Ala Glu Glu Gly Gln Leu Tyr Gly  
 435 440 445

Pro Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly  
 450 455 460

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Glu Ala Gly Ala Val Ala Pro  
 465 470 475 480

Tyr Gly Tyr Thr Arg Pro Pro Gln Gly Leu Ala Gly Gln Glu Ser Asp  
 485 490 495

Phe Thr Ala Pro Asp Val Trp Tyr Pro Gly Gly Met Val Ser Arg Val  
 500 505 510

Pro Tyr Pro Ser Pro Thr Cys Val Lys Ser Glu Met Gly Pro Trp Met  
 515 520 525

Asp Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Gly Asp Met Arg Leu Glu Thr Ala Arg  
 530 535 540

Asp His Val Leu Pro Ile Asp Tyr Tyr Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys  
 545 550 555 560

Leu Ile Cys Gly Asp Glu Ala Ser Gly Cys His Tyr Gly Ala Leu Thr  
 565 570 575

Cys Gly Ser Cys Lys Val Phe Phe Lys Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln  
 580 585 590

Lys Tyr Leu Cys Ala Ser Arg Asn Asp Cys Thr Ile Asp Lys Phe Arg  
 595 600 605

Arg Lys Asn Cys Pro Ser Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Ala Gly  
 610 615 620

Met Thr Leu Gly Ala Arg Lys Leu Lys Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu  
 625 630 635 640

Gln Glu Glu Gly Glu Ala Ser Ser Thr Thr Ser Pro Thr Glu Glu Thr  
 645 650 655

Thr Gln Lys Leu Thr Val Ser His Ile Glu Gly Tyr Glu Cys Gln Pro  
 660 665 670

Ile Phe Leu Asn Val Leu Glu Ala Ile Glu Pro Gly Val Val Cys Ala  
 675 680 685

Gly His Asp Asn Asn Gln Pro Asp Ser Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser  
 690 695 700

Leu Asn Glu Leu Gly Glu Arg Gln Leu Val His Val Val Lys Trp Ala  
705 710 715 720

Lys Ala Leu Pro Gly Phe Arg Asn Leu His Val Asp Asp Gln Met Ala  
725 730 735

Val Ile Gln Tyr Ser Trp Met Gly Leu Met Val Phe Ala Met Gly Trp  
740 745 750

Arg Ser Phe Thr Asn Val Asn Ser Arg Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp  
755 760 765

Leu Val Phe Asn Glu Tyr Arg Met His Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln  
770 775 780

Cys Val Arg Met Arg His Leu Ser Gln Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile  
785 790 795 800

Thr Pro Gln Glu Phe Leu Cys Met Lys Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile  
805 810 815

Ile Pro Val Asp Gly Leu Lys Asn Gln Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg  
820 825 830

Met Asn Tyr Ile Lys Glu Leu Asp Arg Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys  
835 840 845

Asn Pro Thr Ser Cys Ser Arg Arg Phe Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu  
850 855 860

Asp Ser Val Gln Pro Ile Ala Arg Glu Leu His Gln Phe Thr Phe Asp  
865 870 875 880

Leu Leu Ile Lys Ser His Met Val Ser Val Asp Phe Pro Glu Met Met  
885 890 895

Ala Glu Ile Ile Ser Val Gln Val Pro Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val  
900 905 910

Lys Pro Ile Tyr Phe His Thr Gln  
915 920

<210> 3  
<211> 369  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 3

Tyr Tyr Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys Leu Ile Cys Gly Asp Glu Ala  
1 5 10 15

Ser Gly Cys His Tyr Gly Ala Leu Thr Cys Gly Ser Cys Lys Val Phe  
20 25 30

Phe Lys Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln Lys Tyr Leu Cys Ala Ser Arg  
35 40 45

Asn Asp Cys Thr Ile Asp Lys Phe Arg Arg Lys Asn Cys Pro Ser Cys  
50 55 60

Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Ala Gly Met Thr Leu Gly Ala Arg Lys  
65 70 75 80

Leu Lys Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu Gln Glu Glu Gly Glu Ala Ser  
85 90 95

Ser Thr Thr Ser Pro Thr Glu Glu Thr Thr Gln Lys Leu Thr Val Ser  
100 105 110

His Ile Glu Gly Tyr Glu Cys Gln Pro Ile Phe Leu Asn Val Leu Glu  
115 120 125

Ala Ile Glu Pro Gly Val Val Cys Ala Gly His Asp Asn Asn Gln Pro  
130 135 140

Asp Ser Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn Glu Leu Gly Glu Arg  
145 150 155 160

Gln Leu Val His Val Val Lys Trp Ala Lys Ala Leu Pro Gly Phe Arg  
165 170 175

Asn Leu His Val Asp Asp Gln Met Ala Val Ile Gln Tyr Ser Trp Met  
180 185 190

Gly Leu Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg Ser Phe Thr Asn Val Asn  
195 200 205

Ser Arg Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp Leu Val Phe Asn Glu Tyr Arg  
210 215 220

Met His Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys Val Arg Met Arg His Leu  
225 230 235 240

Ser Gln Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr Pro Gln Glu Phe Leu Cys  
245 250 255



Met Lys Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile Ile Pro Val Asp Gly Leu Lys  
260 265 270

Asn Gln Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met Asn Tyr Ile Lys Glu Leu  
275 280 285

Asp Arg Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn Pro Thr Ser Cys Ser Arg  
290 295 300

Arg Phe Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Ser Val Gln Pro Ile Ala  
305 310 315 320

Arg Glu Leu His Gln Phe Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys Ser His Met  
325 330 335

Val Ser Val Asp Phe Pro Glu Met Met Ala Glu Ile Ile Ser Val Gln  
340 345 350

Val Pro Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val Lys Pro Ile Tyr Phe His Thr  
355 360 365

Gln

<210> 4  
<211> 230  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens

<400> 4

Asp Asn Asn Gln Pro Asp Ser Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn  
1 5 10 15

Glu Leu Gly Glu Arg Gln Leu Val His Val Val Lys Trp Ala Lys Ala  
20 25 30

Leu Pro Gly Phe Arg Asn Leu His Val Asp Asp Gln Met Ala Val Ile  
35 40 45

Gln Tyr Ser Trp Met Gly Leu Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg Ser  
50 55 60

Phe Thr Asn Val Asn Ser Arg Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp Leu Val  
65 70 75 80

Phe Asn Glu Tyr Arg Met His Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys Val  
85 90 95

Arg Met Arg His Leu Ser Gln Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr Pro  
 100 105 110

Gln Glu Phe Leu Cys Met Lys Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile Ile Pro  
 115 120 125

Val Asp Gly Leu Lys Asn Gln Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met Asn  
 130 135 140

Tyr Ile Lys Glu Leu Asp Arg Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn Pro  
 145 150 155 160

Thr Ser Cys Ser Arg Arg Phe Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Ser  
 165 170 175

Val Gln Pro Ile Ala Arg Glu Leu His Gln Phe Thr Phe Asp Leu Leu  
 180 185 190

Ile Lys Ser His Met Val Ser Val Asp Phe Pro Glu Met Met Ala Glu  
 195 200 205

Ile Ile Ser Val Gln Val Pro Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val Lys Pro  
 210 215 220

Ile Tyr Phe His Thr Gln  
 225 230

<210> 5  
 <211> 919  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Met Glu Val Gln Leu Gly Leu Gly Arg Val Tyr Pro Arg Pro Pro Ser  
 1 5 10 15

Lys Thr Tyr Arg Gly Ala Phe Gln Asn Leu Phe Gln Ser Val Arg Glu  
 20 25 30

Val Ile Gln Asn Pro Gly Pro Arg His Pro Glu Ala Ala Ser Ala Ala  
 35 40 45

Pro Pro Gly Ala Ser Leu Leu Leu Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 50 55 60

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Glu Thr  
 65 70 75 80

Ser Pro Arg Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly Glu Asp Gly Ser Pro Gln

85

90

95

Ala His Arg Arg Gly Pro Thr Gly Tyr Leu Val Leu Asp Glu Glu Gln  
 100 105 110

Gln Pro Ser Gln Pro Gln Ser Ala Leu Glu Cys His Pro Glu Arg Gly  
 115 120 125

Cys Val Pro Glu Pro Gly Ala Ala Val Ala Ala Ser Lys Gly Leu Pro  
 130 135 140

Gln Gln Leu Pro Ala Pro Pro Asp Glu Asp Asp Ser Ala Ala Pro Ser  
 145 150 155 160

Thr Leu Ser Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro Gly Leu Ser Ser Cys Ser  
 165 170 175

Ala Asp Leu Lys Asp Ile Leu Ser Glu Ala Ser Thr Met Gln Leu Leu  
 180 185 190

Gln Gln Gln Gln Gln Glu Ala Val Ser Glu Gly Ser Ser Ser Gly Arg  
 195 200 205

Ala Arg Glu Ala Ser Gly Ala Pro Thr Ser Ser Lys Asp Asn Tyr Leu  
 210 215 220

Gly Gly Thr Ser Thr Ile Ser Asp Asn Ala Lys Glu Leu Cys Lys Ala  
 225 230 235 240

Val Ser Val Ser Met Gly Leu Gly Val Glu Ala Leu Glu His Leu Ser  
 245 250 255

Pro Gly Glu Gln Leu Arg Gly Asp Cys Met Tyr Ala Pro Leu Leu Gly  
 260 265 270

Val Pro Pro Ala Val Arg Pro Thr Pro Cys Ala Pro Leu Ala Glu Cys  
 275 280 285

Lys Gly Ser Leu Leu Asp Asp Ser Ala Gly Lys Ser Thr Glu Asp Thr  
 290 295 300

Ala Glu Tyr Ser Pro Phe Lys Gly Gly Tyr Thr Lys Gly Leu Glu Gly  
 305 310 315 320

Glu Ser Leu Gly Cys Ser Gly Ser Ala Ala Ala Gly Ser Ser Gly Thr  
 325 330 335

Leu Glu Leu Pro Ser Thr Leu Ser Leu Tyr Lys Ser Gly Ala Leu Asp

340

345

350

Glu Ala Ala Ala Tyr Gln Ser Arg Asp Tyr Tyr Asn Phe Pro Leu Ala  
355 360 365

Leu Ala Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Pro His Ala Arg  
370 375 380

Ile Lys Leu Glu Asn Pro Leu Asp Tyr Gly Ser Ala Trp Ala Ala Ala  
385 390 395 400

Ala Ala Gln Cys Arg Tyr Gly Asp Leu Ala Ser Leu His Gly Ala Gly  
405 410 415

Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Ser Pro Ser Ala Ala Ala Ser Ser Ser  
420 425 430

Trp His Thr Leu Phe Thr Ala Glu Glu Gly Gln Leu Tyr Gly Pro Cys  
435 440 445

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly  
450 455 460

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Glu Ala Gly Ala Val Ala Pro Tyr  
465 470 475 480

Gly Tyr Thr Arg Pro Pro Gln Gly Leu Ala Gly Gln Glu Ser Asp Phe  
485 490 495

Thr Ala Pro Asp Val Trp Tyr Pro Gly Gly Met Val Ser Arg Val Pro  
500 505 510

Tyr Pro Ser Pro Thr Cys Val Lys Ser Glu Met Gly Pro Trp Met Asp  
515 520 525

Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Gly Asp Met Arg Leu Glu Thr Ala Arg Asp  
530 535 540

His Val Leu Pro Ile Asp Tyr Tyr Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys Leu  
545 550 555 560

Ile Cys Gly Asp Glu Ala Ser Gly Cys His Tyr Gly Ala Leu Thr Cys  
565 570 575

Gly Ser Cys Lys Val Phe Phe Lys Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln Lys  
580 585 590

Tyr Leu Cys Ala Ser Arg Asn Asp Cys Thr Ile Asp Lys Phe Arg Arg

595

600

605

Lys Asn Cys Pro Ser Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Ala Gly Met  
 610 615 620

Thr Leu Gly Ala Arg Lys Leu Lys Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu Gln  
 625 630 635 640

Glu Glu Gly Glu Ala Ser Ser Thr Thr Ser Pro Thr Glu Glu Thr Thr  
 645 650 655

Gln Lys Leu Thr Val Ser His Ile Glu Gly Tyr Glu Cys Gln Pro Ile  
 660 665 670

Phe Leu Asn Val Leu Glu Ala Ile Glu Pro Gly Val Val Cys Ala Gly  
 675 680 685

His Asp Asn Asn Gln Pro Asp Ser Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu  
 690 695 700

Asn Glu Leu Gly Glu Arg Gln Leu Val His Val Val Lys Trp Ala Lys  
 705 710 715 720

Ala Leu Pro Gly Phe Arg Asn Leu His Val Asp Asp Gln Met Ala Val  
 725 730 735

Ile Gln Tyr Ser Trp Met Gly Leu Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg  
 740 745 750

Ser Phe Thr Asn Val Asn Ser Arg Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp Leu  
 755 760 765

Val Phe Asn Glu Tyr Arg Met His Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys  
 770 775 780

Val Arg Met Arg His Leu Ser Gln Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr  
 785 790 795 800

Pro Gln Glu Phe Leu Cys Met Lys Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile Ile  
 805 810 815

Pro Val Asp Gly Leu Lys Asn Gln Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met  
 820 825 830

Asn Tyr Ile Lys Glu Leu Asp Arg Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn  
 835 840 845

Pro Thr Ser Cys Ser Arg Arg Phe Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp

850

855

860

Ser Val Gln Pro Ile Ala Arg Glu Leu His Gln Leu Thr Phe Asp Leu  
865 870 875 880

Leu Ile Lys Ser His Met Val Ser Val Asp Phe Pro Glu Met Met Ala  
885 890 895

Glu Ile Ile Ser Val Gln Val Pro Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val Lys  
900 905 910

Pro Ile Tyr Phe His Thr Gln  
915

<210> 6

<211> 902

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 6

Met Glu Val Gln Leu Gly Leu Gly Arg Val Tyr Pro Arg Pro Pro Ser  
1 5 10 15

Lys Thr Tyr Arg Gly Ala Phe Gln Asn Leu Phe Gln Ser Val Arg Glu  
20 25 30

Ala Ile Gln Asn Pro Gly Pro Arg His Pro Glu Ala Ala Ser Ile Ala  
35 40 45

Pro Pro Gly Ala Cys Leu Gln Gln Arg Gln Glu Thr Ser Pro Arg Arg  
50 55 60

Arg Arg Arg Gln Gln His Pro Glu Asp Gly Ser Pro Gln Ala His Ile  
65 70 75 80

Arg Gly Thr Thr Gly Tyr Leu Ala Leu Glu Glu Glu Gln Gln Pro Ser  
85 90 95

Gln Gln Gln Ser Ala Ser Glu Gly His Pro Glu Ser Gly Cys Leu Pro  
100 105 110

Glu Pro Gly Ala Ala Thr Ala Pro Gly Lys Gly Leu Pro Gln Gln Pro  
115 120 125

Pro Ala Pro Pro Asp Gln Asp Asp Ser Ala Ala Pro Ser Thr Leu Ser  
130 135 140

Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro Gly Leu Ser Ser Cys Ser Ala Asp Ile  
145 150 155 160

Lys Asp Ile Leu Ser Glu Ala Gly Thr Met Gln Leu Leu Gln Gln Gln  
 165 170 175

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 180 185 190

Gln Gln Gln Glu Val Ile Ser Glu Gly Ser Ser Ser Val Arg Ala Arg  
 195 200 205

Glu Ala Thr Gly Ala Pro Ser Ser Ser Lys Asp Ser Tyr Leu Gly Gly  
 210 215 220

Asn Ser Thr Ile Ser Asp Ser Ala Lys Glu Leu Cys Lys Ala Val Ser  
 225 230 235 240

Val Ser Met Gly Leu Gly Val Glu Ala Leu Glu His Leu Ser Pro Gly  
 245 250 255

Glu Gln Leu Arg Gly Asp Cys Met Tyr Ala Ser Leu Leu Gly Gly Pro  
 260 265 270

Pro Ala Val Arg Pro Thr Pro Cys Ala Pro Leu Ala Glu Cys Lys Gly  
 275 280 285

Leu Ser Leu Asp Glu Gly Pro Gly Lys Gly Thr Glu Glu Thr Ala Glu  
 290 295 300

Tyr Ser Ser Phe Lys Gly Gly Tyr Ala Lys Gly Leu Glu Gly Glu Ser  
 305 310 315 320

Leu Gly Cys Ser Gly Ser Ser Glu Ala Gly Ser Ser Gly Thr Leu Glu  
 325 330 335

Ile Pro Ser Ser Leu Ser Leu Tyr Lys Ser Gly Ala Val Asp Glu Ala  
 340 345 350

Ala Ala Tyr Gln Asn Arg Asp Tyr Tyr Asn Phe Pro Leu Ala Leu Ser  
 355 360 365

Gly Pro Pro His Pro Pro Pro Pro Thr His Pro His Ala Arg Ile Lys  
 370 375 380

Leu Glu Asn Pro Ser Asp Tyr Gly Ser Ala Trp Ala Ala Ala Ala Ala  
 385 390 395 400

Gln Cys Arg Tyr Gly Asp Leu Ala Ser Leu His Gly Gly Ser Val Ala  
 405 410 415

Gly Pro Ser Thr Gly Ser Pro Pro Ala Thr Ala Ser Ser Ser Trp His  
 420 425 430

Thr Leu Phe Thr Ala Glu Glu Gly Gln Leu Tyr Gly Pro Gly Gly Gly  
 435 440 445

Gly Gly Ser Ser Ser Pro Ser Asp Ala Gly Pro Val Ala Pro Tyr Gly  
 450 455 460

Tyr Thr Arg Pro Pro Gln Gly Leu Ala Ser Gln Glu Gly Asp Phe Ser  
 465 470 475 480

Ala Ser Glu Val Trp Tyr Pro Gly Gly Val Val Asn Arg Val Pro Tyr  
 485 490 495

Pro Ser Pro Ser Cys Val Lys Ser Glu Met Gly Pro Trp Met Glu Asn  
 500 505 510

Tyr Ser Gly Pro Tyr Gly Asp Met Arg Leu Asp Ser Thr Arg Asp His  
 515 520 525

Val Leu Pro Ile Asp Tyr Tyr Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys Leu Ile  
 530 535 540

Cys Gly Asp Glu Ala Ser Gly Cys His Tyr Gly Ala Leu Thr Cys Gly  
 545 550 555 560

Ser Cys Lys Val Phe Phe Lys Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln Lys Tyr  
 565 570 575

Leu Cys Ala Ser Arg Asn Asp Cys Thr Ile Asp Lys Phe Arg Arg Lys  
 580 585 590

Asn Cys Pro Ser Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Ala Gly Met Thr  
 595 600 605

Leu Gly Ala Arg Lys Leu Lys Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu Gln Glu  
 610 615 620

Glu Gly Glu Asn Ser Ser Ala Gly Ser Pro Thr Glu Asp Pro Ser Gln  
 625 630 635 640

Lys Met Thr Val Ser His Ile Glu Gly Tyr Glu Cys Gln Pro Ile Phe  
 645 650 655

Leu Asn Val Leu Glu Ala Ile Glu Pro Gly Val Val Cys Ala Gly His  
 660 665 670



Asp Asn Asn Gln Pro Asp Ser Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn  
675 680 685

Glu Leu Gly Glu Arg Gln Leu Val His Val Val Lys Trp Ala Lys Ala  
690 695 700

Leu Pro Gly Phe Arg Asn Leu His Val Asp Asp Gln Met Ala Val Ile  
705 710 715 720

Gln Tyr Ser Trp Met Gly Leu Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg Ser  
725 730 735

Phe Thr Asn Val Asn Ser Arg Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp Leu Val  
740 745 750

Phe Asn Glu Tyr Arg Met His Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys Val  
755 760 765

Arg Met Arg His Leu Ser Gln Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr Pro  
770 775 780

Gln Glu Phe Leu Cys Met Lys Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile Ile Pro  
785 790 795 800

Val Asp Gly Leu Lys Asn Gln Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met Asn  
805 810 815

Tyr Ile Lys Glu Leu Asp Arg Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn Pro  
820 825 830

Thr Ser Cys Ser Arg Arg Phe Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Ser  
835 840 845

Val Gln Pro Ile Ala Arg Glu Leu His Gln Phe Thr Phe Asp Leu Leu  
850 855 860

Ile Lys Ser His Met Val Ser Val Asp Phe Pro Glu Met Met Ala Glu  
865 870 875 880

Ile Ile Ser Val Gln Val Pro Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val Lys Pro  
885 890 895

Ile Tyr Phe His Thr Gln  
900

<210> 7

<211> 899

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 7

Met Glu Val Gln Leu Gly Leu Gly Arg Val Tyr Pro Arg Pro Pro Ser  
1 5 10 15

Lys Thr Tyr Arg Gly Ala Phe Gln Asn Leu Phe Gln Ser Val Arg Glu  
20 25 30

Ala Ile Gln Asn Pro Gly Pro Arg His Pro Glu Ala Ala Asn Ile Ala  
35 40 45

Pro Pro Gly Ala Cys Leu Gln Gln Arg Gln Glu Thr Ser Pro Arg Arg  
50 55 60

Arg Arg Arg Gln Gln His Thr Glu Asp Gly Ser Pro Gln Ala His Ile  
65 70 75 80

Arg Gly Pro Thr Gly Tyr Leu Ala Leu Glu Glu Glu Gln Gln Pro Ser  
85 90 95

Gln Gln Gln Ala Ala Ser Glu Gly His Pro Glu Ser Ser Cys Leu Pro  
100 105 110

Glu Pro Gly Ala Ala Thr Ala Pro Gly Lys Gly Leu Pro Gln Gln Pro  
115 120 125

Pro Ala Pro Pro Asp Gln Asp Asp Ser Ala Ala Pro Ser Thr Leu Ser  
130 135 140

Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro Gly Leu Ser Ser Cys Ser Ala Asp Ile  
145 150 155 160

Lys Asp Ile Leu Asn Glu Ala Gly Thr Met Gln Leu Leu Gln Gln Gln  
165 170 175

Gln Gln Gln Gln Gln His Gln Gln Gln His Gln Gln His Gln Gln Gln  
180 185 190

Gln Glu Val Ile Ser Glu Gly Ser Ser Ala Arg Ala Arg Glu Ala Thr  
195 200 205

Gly Ala Pro Ser Ser Ser Lys Asp Ser Tyr Leu Gly Gly Asn Ser Thr  
210 215 220

Ile Ser Asp Ser Ala Lys Glu Leu Cys Lys Ala Val Ser Val Ser Met  
225 230 235 240

Gly Leu Gly Val Glu Ala Leu Glu His Leu Ser Pro Gly Glu Gln Leu  
 245 250 255

Arg Gly Asp Cys Met Tyr Ala Ser Leu Leu Gly Gly Pro Pro Ala Val  
 260 265 270

Arg Pro Thr Pro Cys Ala Pro Leu Pro Glu Cys Lys Gly Leu Pro Leu  
 275 280 285

Asp Glu Gly Pro Gly Lys Ser Thr Glu Glu Thr Ala Glu Tyr Ser Ser  
 290 295 300

Phe Lys Gly Gly Tyr Ala Lys Gly Leu Glu Gly Glu Ser Leu Gly Cys  
 305 310 315 320

Ser Gly Ser Ser Glu Ala Gly Ser Ser Gly Thr Leu Glu Ile Pro Ser  
 325 330 335

Ser Leu Ser Leu Tyr Lys Ser Gly Ala Leu Asp Glu Ala Ala Ala Tyr  
 340 345 350

Gln Asn Arg Asp Tyr Tyr Asn Phe Pro Leu Ala Leu Ser Gly Pro Pro  
 355 360 365

His Pro Pro Pro Pro Thr His Pro His Ala Arg Ile Lys Leu Glu Asn  
 370 375 380

Pro Leu Asp Tyr Gly Ser Ala Trp Ala Ala Ala Ala Ala Gln Cys Arg  
 385 390 395 400

Tyr Gly Asp Leu Gly Ser Leu His Gly Gly Ser Val Ala Gly Pro Ser  
 405 410 415

Thr Gly Ser Pro Pro Ala Thr Thr Ser Ser Ser Trp His Thr Leu Phe  
 420 425 430

Thr Ala Glu Glu Gly Gln Leu Tyr Gly Pro Gly Gly Gly Gly Gly Ser  
 435 440 445

Ser Ser Pro Ser Asp Ala Gly Pro Val Ala Pro Tyr Gly Tyr Thr Arg  
 450 455 460

Pro Pro Gln Gly Leu Thr Ser Gln Glu Ser Asp Tyr Ser Ala Ser Glu  
 465 470 475 480

Val Trp Tyr Pro Gly Gly Val Val Asn Arg Val Pro Tyr Pro Ser Pro  
 485 490 495

Asn Cys Val Lys Ser Glu Met Gly Pro Trp Met Glu Asn Tyr Ser Gly  
 500 505 510

Pro Tyr Gly Asp Met Arg Leu Asp Ser Thr Arg Asp His Val Leu Pro  
 515 520 525

Ile Asp Tyr Tyr Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys Leu Ile Cys Gly Asp  
 530 535 540

Glu Ala Ser Gly Cys His Tyr Gly Ala Leu Thr Cys Gly Ser Cys Lys  
 545 550 555 560

Val Phe Phe Lys Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln Lys Tyr Leu Cys Ala  
 565 570 575

Ser Arg Asn Asp Cys Thr Ile Asp Lys Phe Arg Arg Lys Asn Cys Pro  
 580 585 590

Ser Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Ala Gly Met Thr Leu Gly Ala  
 595 600 605

Arg Lys Leu Lys Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu Gln Glu Glu Gly Glu  
 610 615 620

Asn Ser Asn Ala Gly Ser Pro Thr Glu Asp Pro Ser Gln Lys Met Thr  
 625 630 635 640

Val Ser His Ile Glu Gly Tyr Glu Cys Gln Pro Ile Phe Leu Asn Val  
 645 650 655

Leu Glu Ala Ile Glu Pro Gly Val Val Cys Ala Gly His Asp Asn Asn  
 660 665 670

Gln Pro Asp Ser Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn Glu Leu Gly  
 675 680 685

Glu Arg Gln Leu Val His Val Val Lys Trp Ala Lys Ala Leu Pro Gly  
 690 695 700

Phe Arg Asn Leu His Val Asp Asp Gln Met Ala Val Ile Gln Tyr Ser  
 705 710 715 720

Trp Met Gly Leu Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg Ser Phe Thr Asn  
 725 730 735

Val Asn Ser Arg Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp Leu Val Phe Asn Glu  
 740 745 750

Tyr Arg Met His Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys Val Arg Met Arg  
755 760 765

His Leu Ser Gln Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr Pro Gln Glu Phe  
770 775 780

Leu Cys Met Lys Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile Ile Pro Val Asp Gly  
785 790 795 800

Leu Lys Asn Gln Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met Asn Tyr Ile Lys  
805 810 815

Glu Leu Asp Arg Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn Pro Thr Ser Cys  
820 825 830

Ser Arg Arg Phe Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Ser Val Gln Pro  
835 840 845

Ile Ala Arg Glu Leu His Gln Phe Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys Ser  
850 855 860

His Met Val Ser Val Asp Phe Pro Glu Met Met Ala Glu Ile Ile Ser  
865 870 875 880

Val Gln Val Pro Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val Lys Pro Ile Tyr Phe  
885 890 895

His Thr Gln

<210> 8

<211> 907

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<400> 8

Met Glu Val Gln Leu Gly Leu Gly Arg Val Tyr Pro Arg Pro Pro Ser  
1 5 10 15

Lys Thr Tyr Arg Gly Ala Phe Gln Asn Leu Phe Gln Ser Val Arg Glu  
20 25 30

Val Ile Gln Asn Pro Gly Pro Arg His Pro Glu Ala Val Ser Ala Ala  
35 40 45

Pro Pro Gly Ala His Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
50 55 60

Glu Thr Ser Pro Arg Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly Asp Asp Gly  
 65 70 75 80

Ser Pro Gln Ala Gln Ser Arg Gly Pro Thr Gly Tyr Leu Ala Leu Asp  
 85 90 95

Glu Glu Gln Gln Pro Ser Gln Gln Arg Ser Ala Ser Lys Gly His Pro  
 100 105 110

Glu Ser Ala Cys Val Pro Glu Pro Gly Val Thr Ser Ala Thr Gly Lys  
 115 120 125

Gly Leu Gln Gln Gln Gln Pro Ala Pro Pro Asp Glu Asn Asp Ser Ala  
 130 135 140

Ala Pro Ser Thr Leu Ser Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro Gly Leu Ser  
 145 150 155 160

Ser Cys Ser Thr Asp Leu Lys Asp Ile Leu Ser Glu Ala Gly Thr Met  
 165 170 175

Gln Leu Leu Gln Gln Gln Arg Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
 180 185 190

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Glu Val Val Ser Glu Gly  
 195 200 205

Ser Ser Ser Gly Arg Ala Arg Glu Ala Ala Gly Ala Ser Thr Ser Ser  
 210 215 220

Lys Asp Ser Tyr Leu Gly Gly Ser Ser Thr Ile Ser Asp Ser Ala Lys  
 225 230 235 240

Glu Leu Cys Lys Ala Val Ser Val Ser Met Gly Leu Gly Val Glu Ala  
 245 250 255

Leu Glu His Leu Ser Pro Gly Glu Gln Leu Arg Gly Asp Cys Met Tyr  
 260 265 270

Ala Pro Leu Leu Gly Gly Pro Pro Ala Val Arg Pro Cys Ala Pro Leu  
 275 280 285

Ala Glu Cys Lys Gly Ser Leu Leu Asp Asp Gly Pro Gly Lys Gly Thr  
 290 295 300

Glu Glu Thr Ala Glu Tyr Ser Pro Phe Lys Ala Gly Tyr Ala Lys Gly  
 305 310 315 320

Leu Asp Gly Asp Ser Leu Gly Cys Ser Ser Ser Ser Glu Ala Gly Gly  
 325 330 335

Ser Gly Thr Leu Glu Met Pro Ser Thr Leu Ser Leu Tyr Lys Ser Gly  
 340 345 350

Ala Leu Asp Glu Ala Ala Ala Tyr Gln Ser Arg Asp Tyr Tyr Asn Phe  
 355 360 365

Pro Leu Ser Leu Gly Gly Pro Pro Pro His Pro Pro Pro Pro His Pro  
 370 375 380

His Thr Arg Ile Lys Leu Glu Asn Pro Leu Asp Tyr Gly Ser Ala Trp  
 385 390 395 400

Ala Ala Ala Ala Ala Gln Cys Arg Tyr Gly Asp Leu Ala Ser Leu His  
 405 410 415

Gly Ala Gly Ala Ala Gly Pro Ser Ser Gly Ser Pro Ser Ala Thr Thr  
 420 425 430

Ser Ser Ser Trp His Thr Leu Phe Thr Ala Glu Glu Gly Gln Leu Tyr  
 435 440 445

Gly Pro Cys Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Ala Gly Asp Gly Gly Ser  
 450 455 460

Val Ala Pro Tyr Gly Tyr Thr Arg Pro Pro Gln Gly Leu Ala Gly Gln  
 465 470 475 480

Glu Gly Asp Phe Pro Pro Pro Asp Val Trp Tyr Pro Gly Gly Val Val  
 485 490 495

Ser Arg Val Pro Phe Pro Ser Pro Ser Cys Val Lys Ser Glu Met Gly  
 500 505 510

Ser Trp Met Glu Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Gly Asp Met Arg Leu Glu  
 515 520 525

Thr Ala Arg Asp His Val Leu Pro Ile Asp Tyr Tyr Phe Pro Pro Gln  
 530 535 540

Lys Thr Cys Leu Ile Cys Gly Asp Glu Ala Ser Gly Cys His Tyr Gly  
 545 550 555 560

Ala Leu Thr Cys Gly Ser Cys Lys Val Phe Phe Lys Arg Ala Ala Glu  
 565 570 575

Gly Lys Gln Lys Tyr Leu Cys Ala Ser Arg Asn Asp Cys Thr Ile Asp  
 580 585 590

Lys Phe Arg Arg Lys Asn Cys Pro Ser Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr  
 595 600 605

Glu Ala Gly Met Thr Leu Gly Ala Arg Lys Leu Lys Lys Leu Gly Asn  
 610 615 620

Leu Lys Leu Gln Glu Glu Gly Glu Ala Ser Asn Val Thr Ser Pro Thr  
 625 630 635 640

Glu Glu Pro Thr Gln Lys Leu Thr Val Ser His Ile Glu Gly Tyr Glu  
 645 650 655

Cys Gln Pro Ile Phe Leu Asn Val Leu Glu Ala Ile Glu Pro Gly Val  
 660 665 670

Val Cys Ala Gly His Asp Asn Asn Gln Pro Asp Ser Phe Ala Ala Leu  
 675 680 685

Leu Ser Ser Leu Asn Glu Leu Gly Glu Arg Gln Leu Val His Val Val  
 690 695 700

Lys Trp Ala Lys Ala Leu Pro Gly Phe Arg Asn Leu His Val Asp Asp  
 705 710 715 720

Gln Met Ala Val Ile Gln Tyr Ser Trp Met Gly Leu Met Val Phe Ala  
 725 730 735

Met Gly Trp Arg Ser Phe Thr Asn Val Asn Ser Arg Met Leu Tyr Phe  
 740 745 750

Ala Pro Asp Leu Val Phe Asn Glu Tyr Arg Met His Lys Ser Arg Met  
 755 760 765

Tyr Ser Gln Cys Val Arg Met Arg His Leu Ser Gln Glu Phe Gly Trp  
 770 775 780

Leu Gln Ile Thr Pro Gln Glu Phe Leu Cys Met Lys Ala Leu Leu Leu  
 785 790 795 800

Phe Ser Ile Ile Pro Val Asp Gly Leu Lys Asn Gln Lys Phe Phe Asp  
 805 810 815

Glu Leu Arg Met Asn Tyr Ile Lys Glu Leu Asp Arg Ile Ile Ala Cys  
 820 825 830



Lys Arg Lys Asn Pro Thr Ser Cys Ser Arg Arg Phe Tyr Gln Leu Thr  
835 840 845

Lys Leu Leu Asp Ser Val Gln Pro Ile Ala Arg Glu Leu His Gln Phe  
850 855 860

Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys Ser His Met Val Ser Val Asp Phe Pro  
865 870 875 880

Glu Met Met Ala Glu Ile Ile Ser Val Gln Val Pro Lys Ile Leu Ser  
885 890 895

Gly Lys Val Lys Pro Ile Tyr Phe His Thr Gln  
900 905

<210> 9

<211> 912

<212> PRT

<213> Crocuta crocuta

<400> 9

Met Glu Val Gln Leu Gly Leu Gly Arg Val Tyr Pro Arg Pro Pro Ser  
1 5 10 15

Lys Thr Tyr Arg Gly Ala Phe Gln Asn Leu Phe Gln Ser Val Arg Glu  
20 25 30

Val Ile Gln Asn Pro Gly Pro Arg His Pro Glu Ala Thr Ser Ala Ala  
35 40 45

Pro Pro Gly Ala Arg Leu Gln Gln Gln His Gln His Gln Gln Gln His  
50 55 60

Gln His Glu Thr Ser Pro Arg Arg Gln Gln Gln Gln Gln Pro Glu Asp  
65 70 75 80

Gly Ser Pro Gln Arg Pro Ser Arg Gly Pro Thr Ser Tyr Leu Ala Leu  
85 90 95

Asp Glu Glu Gln Gln Pro Ser Gln His Gln Ser Ala Lys Gly His Pro  
100 105 110

Glu Ser Gly Cys Val Pro Glu Pro Val Ala Met Ser Arg Thr Gly Lys  
115 120 125

Gly Leu Glu Gln Gln Gln Pro Ala Pro Pro Asp Glu Asp Asp Ser Ala  
130 135 140

Ala Pro Ser Thr Leu Ser Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro Gly Leu Ser

145                                  150                                  155                                  160  
Ser Cys Ser Thr Asp Leu Lys Asp Ile Leu Ser Glu Ala Gly Thr Met  
   165                                  170                                  175  
Gln Leu Leu Gln Arg Gln Arg Gln Arg Gln Gln Gln Arg Gln Gln Gln  
   180                                  185                                  190  
Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Glu  
   195                                  200                                  205  
Val Val Ser Glu Gly Gly Ser Ser Gly Arg Ala Arg Glu Ala Ala Gly  
   210                                  215                                  220  
Ala Pro Thr Ser Ser Lys Asp Ser Tyr Leu Gly Gly Ser Ser Thr Ile  
   225                                  230                                  235                                  240  
Ser Asp Ser Ala Lys Glu Leu Cys Lys Ala Val Ser Val Ser Met Gly  
   245                                  250                                  255  
Leu Gly Val Glu Ala Leu Glu His Leu Ser Pro Gly Glu Gln Leu Arg  
   260                                  265                                  270  
Gly Asp Cys Met Tyr Ala Pro Leu Leu Gly Gly Pro Pro Pro Val Cys  
   275                                  280                                  285  
Pro Cys Ala Pro Leu Thr Glu Cys Lys Gly Ser Val Leu Asp Asp Gly  
   290                                  295                                  300  
Pro Ser Lys Gly Thr Glu Glu Thr Ala Glu Tyr Ser Pro Phe Lys Thr  
   305                                  310                                  315                                  320  
Gly Tyr Ala Lys Gly Leu Asp Gly Asp Ser Leu Gly Cys Ser Gly Ser  
   325                                  330                                  335  
Ser Gln Ala Gly Gly Ser Gly Thr Leu Glu Ile Pro Ser Thr Leu Ser  
   340                                  345                                  350  
Leu Tyr Lys Ser Gly Thr Leu Asp Glu Ala Ala Ala Tyr Gln Ser Arg  
   355                                  360                                  365  
Asp Tyr Tyr Asn Phe Gln Leu Ser Leu Ala Gly Pro Pro Pro Pro Pro  
   370                                  375                                  380  
Pro Ser Pro His Pro His Ala Arg Ile Lys Leu Glu Asn Pro Leu Asp  
   385                                  390                                  395                                  400  
Tyr Gly Ser Ala Trp Ala Ala Ala Ala Ala Gln Cys Arg Tyr Gly Asp

405

410

415

Leu Ala Ser Leu His Gly Gly Gly Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Ser  
 420 425 430

Pro Ser Ala Thr Ala Ser Ser Ser Trp His Thr Leu Phe Thr Ala Glu  
 435 440 445

Glu Gly Gln Leu Tyr Gly Pro Cys Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr  
 450 455 460

Gly Glu Ser Val Ser Val Thr Pro Tyr Gly Tyr Thr Arg Pro Gln Gln  
 465 470 475 480

Gly Leu Thr Gly Gln Glu Gly Asp Phe Pro Pro Pro Asp Val Trp Tyr  
 485 490 495

Pro Gly Gly Val Val Ser Arg Met Pro Tyr Pro Ser Ala Ser Cys Val  
 500 505 510

Lys Ser Glu Met Gly Pro Trp Met Glu Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Gly  
 515 520 525

Asp Met Arg Leu Glu Thr Thr Arg Asp His Val Leu Pro Ile Asp Tyr  
 530 535 540

Tyr Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys Leu Ile Cys Gly Asp Glu Ala Ser  
 545 550 555 560 565

Gly Cys His Tyr Gly Ala Leu Thr Cys Gly Ser Cys Lys Val Phe Phe  
 565 570 575

Lys Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln Lys Tyr Leu Cys Ala Ser Arg Asn  
 580 585 590

Asp Cys Thr Ile Asp Lys Phe Arg Arg Lys Asn Cys Pro Pro Cys Arg  
 595 600 605

Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Ala Gly Met Thr Leu Gly Ala Arg Arg Leu  
 610 615 620

Lys Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu Gln Glu Glu Gly Glu Ala Ser Ser  
 625 630 635 640

Thr Thr Ser Pro Thr Glu Glu Thr Thr Gln Lys Leu Thr Val Ser His  
 645 650 655

Ile Glu Gly Tyr Glu Cys Gln Pro Ile Phe Leu Asn Val Leu Glu Ala

660 665 670  
Ile Glu Pro Gly Val Val Cys Ala Gly His Asp Asn Asn Gln Pro Asp  
675 680 685  
Ser Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn Glu Leu Gly Glu Arg Gln  
690 695 700  
Leu Val His Val Val Lys Trp Ala Lys Ala Leu Pro Gly Phe Arg Asn  
705 710 715 720  
Leu His Val Asp Asp Gln Met Ala Val Ile Gln Tyr Ser Trp Met Gly  
725 730 735  
Leu Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg Ser Phe Thr Asn Val Asn Ser  
740 745 750  
Arg Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp Leu Val Phe Asn Glu Tyr Arg Met  
755 760 765  
His Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys Val Arg Met Arg His Leu Ser  
770 775 780  
Gln Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr Pro Gln Glu Phe Leu Cys Met  
785 790 795 800  
Lys Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile Ile Pro Val Asp Gly Leu Lys Asn  
805 810 815  
Gln Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met Asn Tyr Ile Lys Asp Leu Asp  
820 825 830  
Arg Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn Pro Thr Ser Cys Ser Arg Arg  
835 840 845  
Phe Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Ser Val Gln Pro Ile Ala Arg  
850 855 860  
Glu Leu His Gln Phe Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys Ser His Met Val  
865 870 875 880  
Ser Val Asp Phe Pro Glu Met Met Ala Glu Ile Ile Ser Val Gln Val  
885 890 895  
Pro Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val Lys Pro Ile Tyr Phe His Thr Gln  
900 905 910

<211> 884  
<212> PRT  
<213> Eulemur fulvus

<400> 10

Met Glu Val Gln Leu Gly Leu Gly Arg Val Tyr Pro Arg Pro Pro Ser  
1 5 10 15

Lys Thr Tyr Arg Gly Ala Phe Gln Asn Leu Phe Gln Ser Val Arg Glu  
20 25 30

Val Ile Gln Asn Pro Gly Pro Arg His Pro Glu Ala Ala Ser Ala Ala  
35 40 45

Pro Pro Gly Ala Arg Leu Gln Gln Gln Gln Glu Thr Ser Pro Pro Gln  
50 55 60

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly Glu Asp Gly Ser Pro Gln Ala Gln Ser  
65 70 75 80

Arg Gly Pro Thr Gly Tyr Leu Ala Leu Asp Glu Glu Gln Gln Pro Ser  
85 90 95

Gln Gln Gln Ser Ala Leu Glu Cys His Pro Glu Ser Gly Cys Val Pro  
100 105 110

Glu Pro Gly Ala Ala Ala Ala Ala Ser Lys Gly Leu Gln Gln Gln Pro  
115 120 125

Pro Ala Pro Ser Asp Glu Asp Asp Ser Ala Val Pro Ser Thr Leu Ser  
130 135 140

Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro Gly Leu Ser Ser Cys Ser Ala Asp Leu  
145 150 155 160

Lys Asp Ile Leu Ser Glu Ala Gly Thr Met Gln Leu Leu Gln Gln Gln  
165 170 175

Gln Gln Glu Ala Val Ser Glu Gly Ser Ser Ser Gly Arg Ala Arg Glu  
180 185 190

Ala Ala Gly Ala Pro Thr Ser Ser Lys Asp Ser Tyr Leu Gly Gly Thr  
195 200 205

Ser Thr Ile Ser Asp Ser Ala Lys Glu Leu Cys Lys Ala Val Ser Val  
210 215 220

Ser Met Gly Leu Gly Val Glu Thr Leu Glu His Leu Ser Pro Gly Glu  
225 230 235 240

Gln Leu Arg Gly Asp Cys Met Tyr Ala Pro Leu Leu Gly Gly Pro Pro  
 245 250 255

Ala Val Arg Pro Thr Pro Cys Ala Pro Leu Ala Glu Cys Lys Gly Ser  
 260 265 270

Leu Leu Asp Asp Ser Ala Asp Lys Gly Thr Glu Glu Pro Ala Glu Tyr  
 275 280 285

Thr Pro Phe Lys Gly Ser Tyr Thr Gln Gly Leu Glu Gly Glu Ser Leu  
 290 295 300

Gly Cys Ser Gly Ser Ser Glu Ala Gly Ser Ser Gly Thr Leu Glu Leu  
 305 310 315 320

Pro Ser Thr Leu Ser Leu Tyr Lys Ser Gly Ala Leu Glu Glu Ala Ala  
 325 330 335

Ser Tyr Gln Ser Arg Asp Tyr Tyr Asn Phe Pro Leu Ala Leu Ala Gly  
 340 345 350

Pro Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro His Pro His Ala Arg Ile Lys Leu  
 355 360 365

Glu Asn Pro Leu Asp Tyr Gly Ser Ser Trp Ala Ala Ala Ala Ala Gln  
 370 375 380

Cys Arg Phe Gly Asp Leu Ala Ser Leu His Gly Gly Gly Ala Thr Gly  
 385 390 395 400

Pro Gly Ser Gly Ser Pro Ser Ala Ala Ala Ala Ser Ser Trp His Thr  
 405 410 415

Leu Phe Thr Ala Glu Glu Gly Gln Leu Tyr Gly Pro Cys Gly Gly Gly  
 420 425 430

Gly Gly Gly Thr Ser Glu Ala Gly Ala Val Thr Pro Tyr Gly Tyr Ser  
 435 440 445

Arg Pro Pro Gln Gly Leu Ala Gly Gln Glu Gly Asp Phe Pro Ala Pro  
 450 455 460

Asp Val Trp Tyr Pro Ser Gly Val Val Ser Arg Val Pro Tyr Pro Ser  
 465 470 475 480

Pro Ser Cys Val Lys Ser Glu Met Gly Pro Trp Met Glu Ser Tyr Ser  
 485 490 495

Gly Pro Tyr Gly Asp Val Arg Leu Glu Thr Ala Arg Asp His Val Leu  
 500 505 510

Pro Ile Asp Tyr Tyr Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys Leu Ile Cys Gly  
 515 520 525

Asp Glu Ala Ser Gly Cys His Tyr Gly Ala Leu Thr Cys Gly Ser Cys  
 530 535 540

Lys Val Phe Phe Lys Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln Lys Tyr Leu Cys  
 545 550 555 560

Ala Ser Arg Asn Asp Cys Thr Ile Asp Lys Phe Arg Arg Lys Asn Cys  
 565 570 575

Pro Ser Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Ala Gly Met Thr Leu Gly  
 580 585 590

Ala Arg Lys Leu Lys Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu Gln Glu Glu Gly  
 595 600 605

Glu Ala Ser Ser Ala Thr Ser Pro Thr Glu Glu Ser Ser Gln Lys Leu  
 610 615 620

Thr Val Ser His Ile Glu Gly Tyr Glu Cys Gln Pro Ile Phe Leu Asn  
 625 630 635 640

Val Leu Glu Ala Ile Glu Pro Gly Val Val Cys Ala Gly His Asp Asn  
 645 650 655

Asn Gln Pro Asp Ser Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn Glu Leu  
 660 665 670

Gly Glu Arg Gln Leu Val His Val Val Lys Trp Ala Lys Ala Leu Pro  
 675 680 685

Gly Phe Arg Asn Leu His Val Asp Asp Gln Met Ala Val Ile Gln Tyr  
 690 695 700

Ser Trp Met Gly Leu Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg Ser Phe Thr  
 705 710 715 720

Asn Val Asn Ser Arg Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp Leu Val Phe Asn  
 725 730 735

Glu Tyr Arg Met His Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys Val Arg Met  
 740 745 750

Arg His Leu Ser Gln Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr Pro Gln Glu  
755 760 765

Phe Leu Cys Met Lys Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile Ile Pro Val Asp  
770 775 780

Gly Leu Lys Asn Gln Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met Asn Tyr Ile  
785 790 795 800

Lys Glu Leu Asp Arg Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn Pro Thr Ser  
805 810 815

Cys Ser Arg Arg Phe Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Ser Val Gln  
820 825 830

Pro Ile Ala Arg Glu Leu His Gln Phe Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys  
835 840 845

Ser His Met Val Ser Val Asp Phe Pro Glu Met Met Ala Glu Ile Ile  
850 855 860

Ser Val Gln Val Pro Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val Lys Pro Ile Tyr  
865 870 875 880

Phe His Thr Gln

<210> 11

<211> 777

<212> PRT

<213> *Lithobates catesbeiana*

<400> 11

Met Glu Val His Ile Gly Leu Gly Gly Val Tyr Lys Gln Pro Pro Gly  
1 5 10 15

Lys Met Ile Arg Gly Ala Phe Glu Asn Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu  
20 25 30

Ala Leu Gln Gly Glu Arg Arg Ser Ala Ala Ser Leu Asp Thr Ser Ser  
35 40 45

Pro Ile Ser Ala Cys Val His Pro His Pro Thr Trp Asn Glu Pro Ser  
50 55 60

Thr Trp Thr Glu Val Arg Gly Thr Pro Trp Arg Glu Pro Gln Gly Ala  
65 70 75 80



Gln Pro Asp Pro Pro Pro Cys Ser Pro Arg Ser Gln Ala Pro Gln Phe  
 85 90 95

Thr Leu Ser Ser Cys Thr Thr Glu Leu Lys Glu Ile Leu Gly Glu Gln  
 100 105 110

Gly Gly Met Pro Glu Glu Gly Asn Ser Glu Ser Ala Ser Lys Glu Gly  
 115 120 125

Tyr Pro Glu Ser Ile Ser Asp Ser Ala Lys Glu Ile Cys Lys Ala Val  
 130 135 140

Ser Val Ser Leu Gly Leu Ser Met Glu Ala Leu Glu His Leu Ser Ala  
 145 150 155 160

Ala Gly Glu Trp Gln Arg Gly Asp Cys Met Phe Ala Gly Pro Pro His  
 165 170 175

His Thr Met Gly Ala Gln Thr Cys Gln Val Ala Glu Glu Asp Lys Ser  
 180 185 190

Asp Thr Ser Phe Ser Gln Tyr Arg Glu Gly Ala Phe Arg Arg Ala Gly  
 195 200 205

Gln Ser Thr Tyr Ser Ala Gly Lys Ala Pro Glu Asp Gly Ser Ser Leu  
 210 215 220

Pro Thr Glu Asp Lys Glu Gln Pro Cys Thr Asp Met Ala Leu Ser Glu  
 225 230 235 240

Pro Gly Ser Leu Arg Ser Arg Gly Met Glu Val Met Pro Ser Leu Thr  
 245 250 255

Leu Tyr Lys Pro Thr Ala Phe Met Glu Asp Ala Ser Ala Tyr Pro Gly  
 260 265 270

Arg Asp Tyr Tyr Ser Phe Gln Met Ala Leu Ala Pro His Gly Arg Ile  
 275 280 285

Lys Val Glu Ser Pro Ile Glu Phe Ala Gly Ser Ala Trp Gly Gly Pro  
 290 295 300

Ser Arg Tyr Ser Glu Phe Pro Gly Phe Ser His Cys Gly Pro Ser Ala  
 305 310 315 320

Asn Trp His Ser Leu Phe Glu Glu Gly Gln Ala Thr Ala Ser Tyr Thr  
 325 330 335

Asp Ser Ser Leu Tyr Ser Tyr Pro Arg Ser His Val Pro Ala Gly Pro  
340 345 350

Asp Gly Glu Phe Ser Ala Glu Ala Trp Tyr Pro Ala Thr Ala Met Leu  
355 360 365

Gly Arg Val His Met Ala Val Pro Met Arg Pro Arg Met Thr His Gly  
370 375 380

Trp Thr Ala Thr Leu Gly Ile Arg Arg Arg Leu Gly Trp Thr Gly Val  
385 390 395 400

Glu Ser Thr Phe Tyr Pro Ile Asp Tyr Tyr Phe Pro Pro Gln Lys Pro  
405 410 415

Cys Leu Ser Cys Glu Asp Glu Ala Ser Gly Cys His Tyr Glu Ala Leu  
420 425 430

Thr Cys Gly Ser Cys Lys Val Phe Phe Lys Arg Ala Ala Glu Gly Asn  
435 440 445

Gln Lys Tyr Leu Cys Ala Ser Arg Asn Asp Cys Thr Ile Asp Lys Phe  
450 455 460

Arg Arg Lys Asn Cys Pro Ser Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Ala  
465 470 475 480

Gly Met Thr Leu Gly Ala Arg Lys Leu Lys Lys Leu Gly Asn Leu Lys  
485 490 495

Ala Gln Glu Glu Leu Glu Gly Ser Pro Gly Gln Ser Glu Gly Arg Glu  
500 505 510

Met Pro Pro Asn Met Ser Ile Pro Gln Leu Glu Gly Tyr Ser Cys Gln  
515 520 525

Pro Ile Phe Leu Asn Val Leu Glu Ala Ile Glu Pro Met Val Val Cys  
530 535 540

Ser Gly His Asp Asn Asn Gln Pro Asp Ser Phe Ala Leu Leu Leu Ser  
545 550 555 560

Ser Leu Asn Glu Leu Gly Glu Arg Gln Leu Val His Val Val Lys Trp  
565 570 575

Ala Lys Ala Leu Pro Gly Phe Arg Asn Leu His Val Asn Asp Gln Met  
580 585 590

Thr Val Ile Gln Tyr Ser Trp Met Gly Leu Met Ile Phe Ala Met Gly  
595 600 605

Trp Arg Ser Phe Lys Asn Val Asn Ser Arg Met Leu Tyr Phe Ala Pro  
610 615 620

Asp Leu Val Phe Asn Glu Tyr Arg Met His Lys Ser Arg Met Tyr Ser  
625 630 635 640

Gln Cys Val Arg Met Arg His Leu Ser Gln Glu Phe Gly Trp Leu Gln  
645 650 655

Val Thr Pro Glu Glu Phe Leu Cys Asp Glu Gly Pro Ser Ala Leu Ser  
660 665 670

Ile Ile Pro Val Glu Gly Leu Lys Asp Gln Lys Cys Phe Asp Glu Leu  
675 680 685

Arg Met Asn Tyr Ile Lys Glu Leu Asp Arg Val Ile Ser Cys Lys Arg  
690 695 700

Asn Asn Pro Ala Ser Ser Ser Pro Arg Phe Phe Asn Leu Pro Lys Leu  
705 710 715 720

Leu Gly Ser Val Gln Pro Ile Asp Val Asn Leu Val Gln Phe Thr Phe  
725 730 735

Gly Leu Phe Gly Lys Ala Gln Met Val Ser Val Asp Phe Pro Glu Met  
740 745 750

Met Ser Glu Ile Ile Ser Val Gln Val Pro Lys Ile Leu Ser Gly Arg  
755 760 765

Val Lys Pro Leu Tyr Phe His Ser Ser  
770 775

<210> 12  
<211> 895  
<212> PRT  
<213> *Macaca fascicularis*

<400> 12

Met Glu Val Gln Leu Gly Leu Gly Arg Val Tyr Pro Arg Pro Pro Ser  
1 5 10 15

Lys Thr Tyr Arg Gly Ala Phe Gln Asn Leu Phe Gln Ser Val Arg Glu  
20 25 30

Val Ile Gln Asn Pro Gly Pro Arg His Pro Glu Ala Ala Ser Ala Ala  
 35 40 45

Pro Pro Gly Ala Ser Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Glu Thr  
 50 55 60

Ser Pro Arg Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly Glu Asp Gly Ser Pro  
 65 70 75 80

Gln Ala His Arg Arg Gly Pro Thr Gly Tyr Leu Val Leu Asp Glu Glu  
 85 90 95

Gln Gln Pro Ser Gln Pro Gln Ser Ala Pro Glu Cys His Pro Glu Arg  
 100 105 110

Gly Cys Val Pro Glu Pro Gly Ala Ala Val Ala Ala Gly Lys Gly Leu  
 115 120 125

Pro Gln Gln Leu Pro Ala Pro Pro Asp Glu Asp Asp Ser Ala Ala Pro  
 130 135 140

Ser Thr Leu Ser Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro Gly Leu Ser Ser Cys  
 145 150 155 160

Ser Thr Asp Leu Lys Asp Ile Leu Ser Glu Ala Ser Thr Met Gln Leu  
 165 170 175

Leu Gln Gln Gln Gln Gln Glu Ala Val Ser Glu Gly Ser Ser Ser Gly  
 180 185 190

Arg Ala Arg Glu Ala Ser Gly Ala Pro Thr Ser Ser Lys Asp Asn Tyr  
 195 200 205

Leu Gly Gly Thr Ser Thr Ile Ser Asp Ser Ala Lys Glu Leu Cys Lys  
 210 215 220

Ala Val Ser Val Ser Met Gly Leu Gly Val Glu Ala Leu Glu His Leu  
 225 230 235 240

Ser Pro Gly Glu Gln Leu Arg Gly Asp Cys Met Tyr Ala Pro Val Leu  
 245 250 255

Gly Val Pro Pro Ala Val Arg Pro Thr Pro Cys Ala Pro Leu Ala Glu  
 260 265 270

Cys Lys Gly Ser Leu Leu Asp Asp Ser Ala Gly Lys Ser Thr Glu Asp  
 275 280 285

Thr Ala Glu Tyr Ser Pro Phe Lys Gly Gly Tyr Thr Lys Gly Leu Glu  
 290 295 300

Gly Glu Ser Leu Gly Cys Ser Gly Ser Ala Ala Ala Gly Ser Ser Gly  
 305 310 315 320

Thr Leu Glu Leu Pro Ser Thr Leu Ser Leu Tyr Lys Ser Gly Ala Leu  
 325 330 335

Asp Glu Ala Ala Ala Tyr Gln Ser Arg Asp Tyr Tyr Asn Phe Pro Leu  
 340 345 350

Ala Leu Ala Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Pro His Ala  
 355 360 365

Arg Ile Lys Leu Glu Asn Pro Leu Asp Tyr Gly Ser Ala Trp Ala Ala  
 370 375 380

Ala Ala Ala Gln Cys Arg Tyr Gly Asp Leu Ala Ser Leu His Gly Ala  
 385 390 395 400

Gly Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Ser Pro Ser Ala Ala Ala Ser Ser  
 405 410 415

Ser Trp His Thr Leu Phe Thr Ala Glu Glu Gly Gln Leu Tyr Gly Pro  
 420 425 430

Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly  
 435 440 445

Glu Ala Gly Ala Val Ala Pro Tyr Gly Tyr Thr Arg Pro Pro Gln Gly  
 450 455 460

Leu Ala Gly Gln Glu Gly Asp Phe Thr Ala Pro Asp Val Trp Tyr Pro  
 465 470 475 480

Gly Gly Met Val Ser Arg Val Pro Tyr Pro Ser Pro Thr Cys Val Lys  
 485 490 495

Ser Glu Met Gly Pro Trp Met Asp Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Gly Asp  
 500 505 510

Met Arg Leu Glu Thr Ala Arg Asp His Val Leu Pro Ile Asp Tyr Tyr  
 515 520 525

Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys Leu Ile Cys Gly Asp Glu Ala Ser Gly  
 530 535 540

Cys His Tyr Gly Ala Leu Thr Cys Gly Ser Cys Lys Val Phe Phe Lys  
 545 550 555 560

Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln Lys Tyr Leu Cys Ala Ser Arg Asn Asp  
 565 570 575

Cys Thr Ile Asp Lys Phe Arg Arg Lys Asn Cys Pro Ser Cys Arg Leu  
 580 585 590

Arg Lys Cys Tyr Glu Ala Gly Met Thr Leu Gly Ala Arg Lys Leu Lys  
 595 600 605

Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu Gln Glu Glu Gly Glu Ala Ser Ser Thr  
 610 615 620

Thr Ser Pro Thr Glu Glu Thr Ala Gln Lys Leu Thr Val Ser His Ile  
 625 630 635 640

Glu Gly Tyr Glu Cys Gln Pro Ile Phe Leu Asn Val Leu Glu Ala Ile  
 645 650 655

Glu Pro Gly Val Val Cys Ala Gly His Asp Asn Asn Gln Pro Asp Ser  
 660 665 670

Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn Glu Leu Gly Glu Arg Gln Leu  
 675 680 685

Val His Val Val Lys Trp Ala Lys Ala Leu Pro Gly Phe Arg Asn Leu  
 690 695 700

His Val Asp Asp Gln Met Ala Val Ile Gln Tyr Ser Trp Met Gly Leu  
 705 710 715 720

Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg Ser Phe Thr Asn Val Asn Ser Arg  
 725 730 735

Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp Leu Val Phe Asn Glu Tyr Arg Met His  
 740 745 750

Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys Val Arg Met Arg His Leu Ser Gln  
 755 760 765

Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr Pro Gln Glu Phe Leu Cys Met Lys  
 770 775 780

Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile Ile Pro Val Asp Gly Leu Lys Asn Gln  
 785 790 795 800

Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met Asn Tyr Ile Lys Glu Leu Asp Arg  
 805 810 815

Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn Pro Thr Ser Cys Ser Arg Arg Phe  
 820 825 830

Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Ser Val Gln Pro Ile Ala Arg Glu  
 835 840 845

Leu His Gln Phe Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys Ser His Met Val Ser  
 850 855 860

Val Asp Phe Pro Glu Met Met Ala Glu Ile Ile Ser Val Gln Val Pro  
 865 870 875 880

Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val Lys Pro Ile Tyr Phe His Thr Gln  
 885 890 895

<210> 13  
 <211> 895  
 <212> PRT  
 <213> Macaca mulatta

<400> 13

Met Glu Val Gln Leu Gly Leu Gly Arg Val Tyr Pro Arg Pro Pro Ser  
 1 5 10 15

Lys Thr Tyr Arg Gly Ala Phe Gln Asn Leu Phe Gln Ser Val Arg Glu  
 20 25 30

Val Ile Gln Asn Pro Gly Pro Arg His Pro Glu Ala Ala Ser Ala Ala  
 35 40 45

Pro Pro Gly Ala Ser Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Glu Thr  
 50 55 60

Ser Pro Arg Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly Glu Asp Gly Ser Pro  
 65 70 75 80

Gln Ala His Arg Arg Gly Pro Thr Gly Tyr Leu Val Leu Asp Glu Glu  
 85 90 95

Gln Gln Pro Ser Gln Pro Gln Ser Ala Pro Glu Cys His Pro Glu Arg  
 100 105 110

Gly Cys Val Pro Glu Pro Gly Ala Ala Val Ala Ala Gly Lys Gly Leu  
 115 120 125

Pro Gln Gln Leu Pro Ala Pro Pro Asp Glu Asp Asp Ser Ala Ala Pro

130

135

140

Ser Thr Leu Ser Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro Gly Leu Ser Ser Cys  
145 150 155 160

Ser Ala Asp Leu Lys Asp Ile Leu Ser Glu Ala Ser Thr Met Gln Leu  
165 170 175

Leu Gln Gln Gln Gln Gln Glu Ala Val Ser Glu Gly Ser Ser Ser Gly  
180 185 190

Arg Ala Arg Glu Ala Ser Gly Ala Pro Thr Ser Ser Lys Asp Asn Tyr  
195 200 205

Leu Glu Gly Thr Ser Thr Ile Ser Asp Ser Ala Lys Glu Leu Cys Lys  
210 215 220

Ala Val Ser Val Ser Met Gly Leu Gly Val Glu Ala Leu Glu His Leu  
225 230 235 240

Ser Pro Gly Glu Gln Leu Arg Gly Asp Cys Met Tyr Ala Pro Val Leu  
245 250 255

Gly Val Pro Pro Ala Val Arg Pro Thr Pro Cys Ala Pro Leu Ala Glu  
260 265 270

Cys Lys Gly Ser Leu Leu Asp Asp Ser Ala Gly Lys Ser Thr Glu Asp  
275 280 285

Thr Ala Glu Tyr Ser Pro Phe Lys Gly Gly Tyr Thr Lys Gly Leu Glu  
290 295 300

Gly Glu Ser Leu Gly Cys Ser Gly Ser Ala Ala Ala Gly Ser Ser Gly  
305 310 315 320

Thr Leu Glu Leu Pro Ser Thr Leu Ser Leu Tyr Lys Ser Gly Ala Leu  
325 330 335

Asp Glu Ala Ala Ala Tyr Gln Ser Arg Asp Tyr Tyr Asn Phe Pro Leu  
340 345 350

Ala Leu Ala Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Pro His Ala  
355 360 365

Arg Ile Lys Leu Glu Asn Pro Leu Asp Tyr Gly Ser Ala Trp Ala Ala  
370 375 380

Ala Ala Ala Gln Cys Arg Tyr Gly Asp Leu Ala Ser Leu His Gly Ala



385                            390                            395                            400  
  
 Gly Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Ser Pro Ser Ala Ala Ala Ser Ser  
                                   405                            410                            415  
  
 Ser Trp His Thr Leu Phe Thr Ala Glu Glu Gly Gln Leu Tyr Gly Pro  
                                   420                            425                            430  
  
 Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly  
                                   435                            440                            445  
  
 Glu Ala Gly Ala Val Ala Pro Tyr Gly Tyr Thr Arg Pro Pro Gln Gly  
                                   450                            455                            460  
  
 Leu Ala Gly Gln Glu Gly Asp Phe Thr Ala Pro Asp Val Trp Tyr Pro  
                                   465                            470                            475                            480  
  
 Gly Gly Met Val Ser Arg Val Pro Tyr Pro Ser Pro Thr Cys Val Lys  
                                   485                            490                            495  
  
 Ser Glu Met Gly Pro Trp Met Asp Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Gly Asp  
                                   500                            505                            510  
  
 Met Arg Leu Glu Thr Ala Arg Asp His Val Leu Pro Ile Asp Tyr Tyr  
                                   515                            520                            525  
  
 Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys Leu Ile Cys Gly Asp Glu Ala Ser Gly  
                                   530                            535                            540  
  
 Cys His Tyr Gly Ala Leu Thr Cys Gly Ser Cys Lys Val Phe Phe Lys  
                                   545                            550                            555                            560  
  
 Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln Lys Tyr Leu Cys Ala Ser Arg Asn Asp  
                                   565                            570                            575  
  
 Cys Thr Ile Asp Lys Phe Arg Arg Lys Asn Cys Pro Ser Cys Arg Leu  
                                   580                            585                            590  
  
 Arg Lys Cys Tyr Glu Ala Gly Met Thr Leu Gly Ala Arg Lys Leu Lys  
                                   595                            600                            605  
  
 Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu Gln Glu Glu Gly Glu Ala Ser Ser Thr  
                                   610                            615                            620  
  
 Thr Ser Pro Thr Glu Glu Thr Ala Gln Lys Leu Thr Val Ser His Ile  
                                   625                            630                            635                            640  
  
 Glu Gly Tyr Glu Cys Gln Pro Ile Phe Leu Asn Val Leu Glu Ala Ile

645

650

655

Glu Pro Gly Val Val Cys Ala Gly His Asp Asn Asn Gln Pro Asp Ser  
 660 665 670

Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn Glu Leu Gly Glu Arg Gln Leu  
 675 680 685

Val His Val Val Lys Trp Ala Lys Ala Leu Pro Gly Phe Arg Asn Leu  
 690 695 700

His Val Asp Asp Gln Met Ala Val Ile Gln Tyr Ser Trp Met Gly Leu  
 705 710 715 720

Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg Ser Phe Thr Asn Val Asn Ser Arg  
 725 730 735

Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp Leu Val Phe Asn Glu Tyr Arg Met His  
 740 745 750

Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys Val Arg Met Arg His Leu Ser Gln  
 755 760 765

Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr Pro Gln Glu Phe Leu Cys Met Lys  
 770 775 780

Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile Ile Pro Val Asp Gly Leu Lys Asn Gln  
 785 790 795 800

Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met Asn Tyr Ile Lys Glu Leu Asp Arg  
 805 810 815

Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn Pro Thr Ser Cys Ser Arg Arg Phe  
 820 825 830

Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Ser Val Gln Pro Ile Ala Arg Glu  
 835 840 845

Leu His Gln Phe Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys Ser His Met Val Ser  
 850 855 860

Val Asp Phe Pro Glu Met Met Ala Glu Ile Ile Ser Val Gln Val Pro  
 865 870 875 880

Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val Lys Pro Ile Tyr Phe His Thr Gln  
 885 890 895

<211> 911  
<212> PRT  
<213> Pan troglodyte

<400> 14

Met Glu Val Gln Leu Gly Leu Gly Arg Val Tyr Pro Arg Pro Pro Ser  
1 5 10 15

Lys Thr Tyr Arg Gly Ala Phe Gln Asn Leu Phe Gln Ser Val Arg Glu  
20 25 30

Val Ile Gln Asn Pro Gly Pro Arg His Pro Glu Ala Ala Ser Ala Ala  
35 40 45

Pro Pro Gly Ala Ser Leu Leu Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln  
50 55 60

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Glu Thr  
65 70 75 80

Ser Pro Arg Gln Gln Gln Gln Gln Gly Glu Asp Gly Ser Pro Gln Ala  
85 90 95

His Arg Arg Gly Pro Thr Gly Tyr Leu Val Leu Asp Glu Glu Gln Gln  
100 105 110

Pro Ser Gln Pro Gln Ser Ala Pro Glu Cys His Pro Glu Arg Gly Cys  
115 120 125

Val Pro Glu Pro Gly Ala Ala Val Ala Ala Ser Lys Gly Leu Pro Gln  
130 135 140

Gln Leu Pro Ala Pro Pro Asp Glu Asp Asp Ser Ala Ala Pro Ser Thr  
145 150 155 160

Leu Ser Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro Gly Leu Ser Ser Cys Ser Ala  
165 170 175

Asp Leu Lys Asp Ile Leu Ser Glu Ala Ser Thr Met Gln Leu Leu Gln  
180 185 190

Gln Gln Gln Gln Glu Ala Val Ser Glu Gly Ser Ser Ser Gly Arg Ala  
195 200 205

Arg Glu Ala Ser Gly Ala Pro Thr Ser Ser Lys Asp Asn Tyr Leu Gly  
210 215 220

Gly Thr Ser Thr Ile Ser Asp Ser Ala Lys Glu Leu Cys Lys Ala Val  
225 230 235 240

Ser Val Ser Met Gly Leu Gly Val Glu Ala Leu Glu His Leu Ser Pro  
245 250 255

Gly Glu Gln Leu Arg Gly Asp Cys Met Tyr Ala Pro Leu Leu Gly Val  
260 265 270

Pro Pro Ala Val Arg Pro Thr Pro Cys Ala Pro Leu Ala Glu Cys Lys  
275 280 285

Gly Ser Leu Leu Asp Asp Ser Ala Gly Lys Ser Thr Glu Asp Thr Ala  
290 295 300

Glu Tyr Ser Pro Phe Lys Gly Gly Tyr Thr Lys Gly Leu Glu Gly Glu  
305 310 315 320

Ser Leu Gly Cys Ser Gly Ser Ala Ala Ala Gly Ser Ser Gly Thr Leu  
325 330 335

Glu Leu Pro Ser Thr Leu Ser Leu Tyr Lys Ser Gly Ala Leu Asp Glu  
340 345 350

Ala Ala Ala Tyr Gln Ser Arg Asp Tyr Tyr Asn Phe Pro Leu Ala Leu  
355 360 365

Ala Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Pro His Ala Arg Ile  
370 375 380

Lys Leu Glu Asn Pro Leu Asp Tyr Gly Ser Ala Trp Ala Ala Ala Ala  
385 390 395 400

Ala Gln Cys Arg Tyr Gly Asp Leu Ala Ser Leu His Gly Ala Gly Ala  
405 410 415

Ala Gly Pro Gly Ser Gly Ser Pro Ser Ala Ala Ala Ser Ser Ser Trp  
420 425 430

His Thr Leu Phe Thr Ala Glu Glu Gly Gln Leu Tyr Gly Pro Cys Gly  
435 440 445

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly  
450 455 460

Glu Ala Gly Ala Val Ala Pro Tyr Gly Tyr Thr Arg Pro Pro Gln Gly  
465 470 475 480

Leu Ala Gly Gln Glu Gly Asp Phe Thr Ala Pro Asp Val Trp Tyr Pro  
485 490 495

Gly Gly Met Val Ser Arg Val Pro Tyr Pro Ser Pro Thr Cys Val Lys  
 500 505 510

Ser Glu Met Gly Pro Trp Met Asp Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Gly Asp  
 515 520 525

Met Arg Leu Glu Thr Ala Arg Asp His Val Leu Pro Ile Asp Tyr Tyr  
 530 535 540

Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys Leu Ile Cys Gly Asp Glu Ala Ser Gly  
 545 550 555 560

Cys His Tyr Gly Ala Leu Thr Cys Gly Ser Cys Lys Val Phe Phe Lys  
 565 570 575

Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln Lys Tyr Leu Cys Ala Ser Arg Asn Asp  
 580 585 590

Cys Thr Ile Asp Lys Phe Arg Arg Lys Asn Cys Pro Ser Cys Arg Leu  
 595 600 605

Arg Lys Cys Tyr Glu Ala Gly Met Thr Leu Gly Ala Arg Lys Leu Lys  
 610 615 620

Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu Gln Glu Glu Gly Glu Ala Ser Ser Thr  
 625 630 635 640

Thr Ser Pro Thr Glu Glu Thr Thr Gln Lys Leu Thr Val Ser His Ile  
 645 650 655

Glu Gly Tyr Glu Cys Gln Pro Ile Phe Leu Asn Val Leu Glu Ala Ile  
 660 665 670

Glu Pro Gly Val Val Cys Ala Gly His Asp Asn Asn Gln Pro Asp Ser  
 675 680 685

Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn Glu Leu Gly Glu Arg Gln Leu  
 690 695 700

Val His Val Val Lys Trp Ala Lys Ala Leu Pro Gly Phe Arg Asn Leu  
 705 710 715 720

His Val Asp Asp Gln Met Ala Val Ile Gln Tyr Ser Trp Met Gly Leu  
 725 730 735

Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg Ser Phe Thr Asn Val Asn Ser Arg  
 740 745 750

Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp Leu Val Phe Asn Glu Tyr Arg Met His  
755 760 765

Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys Val Arg Met Arg His Leu Ser Gln  
770 775 780

Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr Pro Gln Glu Phe Leu Cys Met Lys  
785 790 795 800

Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile Ile Pro Val Asp Gly Leu Lys Asn Gln  
805 810 815

Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met Asn Tyr Ile Lys Glu Leu Asp Arg  
820 825 830

Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn Pro Thr Ser Cys Ser Arg Arg Phe  
835 840 845

Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Ser Val Gln Pro Ile Ala Arg Glu  
850 855 860

Leu His Gln Phe Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys Ser His Met Val Ser  
865 870 875 880

Val Asp Phe Pro Glu Met Met Ala Glu Ile Ile Ser Val Gln Val Pro  
885 890 895

Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val Lys Pro Ile Tyr Phe His Thr Gln  
900 905 910

<210> 15

<211> 895

<212> PRT

<213> Papio hamadryas

<400> 15

Met Glu Val Gln Leu Gly Leu Gly Arg Val Tyr Pro Arg Pro Pro Ser  
1 5 10 15

Lys Thr Tyr Arg Gly Ala Phe Gln Asn Leu Phe Gln Ser Val Arg Glu  
20 25 30

Val Ile Gln Asn Pro Gly Pro Arg His Pro Glu Ala Ala Ser Ala Ala  
35 40 45

Pro Pro Gly Ala Ser Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Glu  
50 55 60

Thr Ser Pro Arg Gln Gln Gln Gln Gln Gly Glu Asp Gly Ser Pro  
 65 70 75 80

Gln Ala His Arg Arg Gly Pro Thr Gly Tyr Leu Val Leu Asp Glu Glu  
 85 90 95

Gln Gln Pro Ser Gln Pro Gln Ser Ala Pro Glu Cys His Pro Glu Arg  
 100 105 110

Gly Cys Val Pro Glu Pro Gly Ala Ala Val Ala Ala Gly Lys Gly Leu  
 115 120 125

Pro Gln Gln Leu Pro Ala Pro Pro Asp Glu Asp Asp Ser Ala Ala Pro  
 130 135 140

Ser Thr Leu Ser Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro Gly Leu Ser Ser Cys  
 145 150 155 160

Ser Ala Asp Leu Lys Asp Ile Leu Ser Glu Ala Ser Thr Met Gln Leu  
 165 170 175

Leu Gln Gln Gln Gln Gln Glu Ala Val Ser Glu Gly Ser Ser Ser Gly  
 180 185 190

Arg Ala Arg Glu Ala Ser Gly Ala Pro Thr Ser Ser Lys Asp Asn Tyr  
 195 200 205

Leu Gly Gly Thr Ser Thr Ile Ser Asp Ser Ala Lys Glu Leu Cys Lys  
 210 215 220

Ala Val Ser Val Ser Met Gly Leu Gly Val Glu Ala Leu Glu His Leu  
 225 230 235 240

Ser Pro Gly Glu Gln Leu Arg Gly Asp Cys Met Tyr Ala Pro Val Leu  
 245 250 255

Gly Val Pro Pro Ala Val Arg Pro Thr Pro Cys Ala Pro Leu Ala Glu  
 260 265 270

Cys Lys Gly Ser Leu Leu Asp Asp Ser Ala Gly Lys Ser Thr Glu Asp  
 275 280 285

Thr Ala Glu Tyr Ser Pro Phe Lys Gly Gly Tyr Thr Lys Gly Leu Glu  
 290 295 300

Gly Glu Ser Leu Gly Cys Ser Gly Ser Ala Ala Ala Gly Ser Ser Gly  
 305 310 315 320

Thr Leu Glu Leu Pro Ser Thr Leu Ser Leu Tyr Lys Ser Gly Ala Leu  
 325 330 335

Asp Glu Ala Ala Ala Tyr Gln Ser Arg Asp Tyr Tyr Asn Phe Pro Leu  
 340 345 350

Ala Leu Ala Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Pro His Ala  
 355 360 365

Arg Ile Lys Leu Glu Asn Pro Leu Asp Tyr Gly Ser Ala Trp Ala Ala  
 370 375 380

Ala Ala Ala Gln Cys Arg Tyr Gly Glu Leu Ala Ser Leu His Gly Ala  
 385 390 395 400

Gly Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Ser Pro Ser Ala Ala Ala Ser Ser  
 405 410 415

Ser Trp His Thr Leu Phe Thr Ala Glu Glu Gly Gln Leu Tyr Gly Pro  
 420 425 430

Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly  
 435 440 445

Glu Ala Gly Ala Val Ala Pro Tyr Gly Tyr Thr Arg Pro Pro Gln Gly  
 450 455 460

Leu Ala Gly Gln Glu Gly Asp Phe Thr Ala Pro Asp Val Trp Tyr Pro  
 465 470 475 480

Gly Gly Met Val Ser Arg Val Pro Tyr Pro Ser Pro Thr Cys Val Lys  
 485 490 495

Ser Glu Met Gly Pro Trp Met Asp Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Gly Asp  
 500 505 510

Met Arg Leu Glu Thr Ala Arg Asp His Val Leu Pro Ile Asp Tyr Tyr  
 515 520 525

Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys Leu Ile Cys Gly Asp Glu Ala Ser Gly  
 530 535 540

Cys His Tyr Gly Ala Leu Thr Cys Gly Ser Cys Lys Val Phe Phe Lys  
 545 550 555 560

Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln Lys Tyr Leu Cys Ala Ser Arg Asn Asp  
 565 570 575



Cys Thr Ile Asp Lys Phe Arg Arg Lys Asn Cys Pro Ser Cys Arg Leu  
580 585 590

Arg Lys Cys Tyr Glu Ala Gly Met Thr Leu Gly Ala Arg Lys Leu Lys  
595 600 605

Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu Gln Glu Glu Gly Glu Ala Ser Ser Thr  
610 615 620

Thr Ser Pro Thr Glu Glu Thr Ala Gln Lys Leu Thr Val Ser His Ile  
625 630 635 640

Glu Gly Tyr Glu Cys Gln Pro Ile Phe Leu Asn Val Leu Glu Ala Ile  
645 650 655

Glu Pro Gly Val Val Cys Ala Gly His Asp Asn Asn Gln Pro Asp Ser  
660 665 670

Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn Glu Leu Gly Glu Arg Gln Leu  
675 680 685

Val His Val Val Lys Trp Ala Lys Ala Leu Pro Gly Phe Arg Asn Leu  
690 695 700

His Val Asp Asp Gln Met Ala Val Ile Gln Tyr Ser Trp Met Gly Leu  
705 710 715 720

Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg Ser Phe Thr Asn Val Asn Ser Arg  
725 730 735

Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp Leu Val Phe Asn Glu Tyr Arg Met His  
740 745 750

Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys Val Arg Met Arg His Leu Ser Gln  
755 760 765

Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr Pro Gln Glu Phe Leu Cys Met Lys  
770 775 780

Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile Ile Pro Val Asp Gly Leu Lys Asn Gln  
785 790 795 800

Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met Asn Tyr Ile Lys Glu Leu Asp Arg  
805 810 815

Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn Pro Thr Ser Cys Ser Arg Arg Phe  
820 825 830

Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Ser Val Gln Pro Ile Ala Arg Glu  
835 840 845

Leu His Gln Phe Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys Ser His Met Val Ser  
850 855 860

Val Asp Phe Pro Glu Met Met Ala Glu Ile Ile Ser Val Gln Val Pro  
865 870 875 880

Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val Lys Pro Ile Tyr Phe His Thr Gln  
885 890 895

<210> 16

<211> 896

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 16

Met Glu Val Gln Leu Gly Leu Gly Arg Val Tyr Pro Arg Pro Pro Ser  
1 5 10 15

Lys Thr Phe Arg Gly Ala Phe Gln Asn Leu Phe Gln Ser Val Arg Glu  
20 25 30

Val Ile Gln Asn Pro Gly Pro Arg His Pro Glu Ala Ala Ser Ala Ala  
35 40 45

Pro Pro Gly Ala Arg Leu Gln Gln Gln Gln Leu Gln Gln Gln Glu Thr  
50 55 60

Ser Pro Arg Arg Gln Gln Gln Gln Gln Gln Pro Ser Glu Asp Gly  
65 70 75 80

Ser Pro Gln Val Gln Ser Arg Gly Pro Thr Gly Tyr Leu Ala Leu Asp  
85 90 95

Glu Lys Gln Gln Pro Ser Gln Gln Gln Ser Ala Pro Glu Cys His Pro  
100 105 110

Glu Ser Gly Cys Thr Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Ala Ala Ser Lys  
115 120 125

Gly Leu Gln Gln Gln Pro Pro Ala Pro Pro Asp Glu Asp Asp Ser Ala  
130 135 140

Ala Pro Ser Thr Leu Ser Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro Gly Leu Ser  
145 150 155 160

Ser Cys Ser Thr Asp Leu Lys Asp Ile Leu Ser Glu Ala Gly Thr Met  
 165 170 175

Gln Leu Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Glu Ala Val  
 180 185 190

Ser Glu Gly Asn Ser Ser Gly Arg Ala Arg Glu Ala Thr Gly Ala Pro  
 195 200 205

Ile Ser Ser Lys Asp Ser Tyr Leu Gly Gly Ser Ser Thr Ile Ser Asp  
 210 215 220

Ser Ala Lys Glu Leu Cys Lys Ala Val Ser Val Ser Met Gly Leu Gly  
 225 230 235 240

Val Glu Ala Leu Glu His Leu Ser Pro Gly Glu Gln Leu Arg Gly Asp  
 245 250 255

Cys Met Tyr Ala Pro Leu Leu Thr Gly Pro Pro Ser Val Arg Pro Thr  
 260 265 270

Pro Cys Ala Pro Leu Ala Glu Cys Lys Gly Ser Leu Leu Asp Asp Gly  
 275 280 285

Pro Gly Lys Ser Asn Glu Glu Thr Ala Glu Tyr Ser Pro Phe Lys Ala  
 290 295 300

Gly Tyr Thr Lys Gly Leu Asp Ser Glu Ser Leu Gly Cys Ser Ser Gly  
 305 310 315 320

Gly Glu Ala Gly Gly Ser Gly Thr Leu Glu Leu Pro Ser Ala Leu Ser  
 325 330 335

Leu Tyr Lys Ser Gly Ala Leu Asp Asp Val Ala Ala Tyr Pro Ser Arg  
 340 345 350

Asp Tyr Tyr Asn Phe Pro Leu Ala Leu Ala Gly Pro Pro Pro Pro Pro  
 355 360 365

Pro Pro Pro His Pro His Ala Arg Ile Lys Leu Glu Asn Pro Leu Asp  
 370 375 380

Tyr Gly Ser Ala Trp Ala Ala Ala Ala Ala Gln Cys Arg Tyr Gly Asp  
 385 390 395 400

Leu Ala Ser Leu His Gly Gly Gly Ala Pro Gly Pro Gly Ser Gly Ser  
 405 410 415

Pro Ser Ala Thr Ser Ser Ser Ser Trp His Thr Leu Phe Thr Ala Glu  
 420 425 430

Glu Ser Gln Leu Tyr Gly Pro Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ala  
 435 440 445

Gly Glu Ala Gly Ala Val Ala Pro Tyr Gly Tyr Thr Arg Pro Pro Gln  
 450 455 460

Gly Leu Ala Gly Gln Glu Gly Asp Leu Ala Ile Pro Asp Ile Trp Tyr  
 465 470 475 480

Pro Gly Gly Val Val Ser Arg Val Pro Tyr Pro Ser Pro Ser Cys Val  
 485 490 495

Lys Ser Glu Met Gly Pro Trp Met Glu Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Gly  
 500 505 510

Asp Met Arg Leu Glu Pro Thr Arg Asp His Val Leu Pro Ile Asp Tyr  
 515 520 525

Tyr Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys Leu Ile Cys Gly Asp Glu Ala Ser  
 530 535 540

Gly Cys His Tyr Gly Ala Leu Thr Cys Gly Ser Cys Lys Val Phe Phe  
 545 550 555 560

Lys Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln Lys Tyr Leu Cys Ala Ser Arg Asn  
 565 570 575

Asp Cys Thr Ile Asp Lys Phe Arg Arg Lys Asn Cys Pro Ser Cys Arg  
 580 585 590

Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Ala Gly Met Thr Leu Gly Ala Arg Lys Leu  
 595 600 605

Lys Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu Gln Glu Glu Gly Glu Ala Ser Ser  
 610 615 620

Ala Thr Ser Pro Thr Glu Glu Pro Ala Gln Lys Leu Thr Val Ser His  
 625 630 635 640

Ile Glu Gly Tyr Glu Cys Gln Pro Ile Phe Leu Asn Val Leu Glu Ala  
 645 650 655

Ile Glu Pro Gly Val Val Cys Ala Gly His Asp Asn Asn Gln Pro Asp  
 660 665 670

Ser Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn Glu Leu Gly Glu Arg Gln  
675 680 685

Leu Val His Val Val Lys Trp Ala Lys Ala Leu Pro Gly Phe Arg Asn  
690 695 700

Leu His Val Asp Asp Gln Met Ala Val Ile Gln Tyr Ser Trp Met Gly  
705 710 715 720

Leu Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg Ser Phe Thr Asn Val Asn Ser  
725 730 735

Arg Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp Leu Val Phe Asn Glu Tyr Arg Met  
740 745 750

His Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys Val Arg Met Arg His Leu Ser  
755 760 765

Gln Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr Pro Gln Glu Phe Leu Cys Met  
770 775 780

Lys Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile Ile Pro Val Asp Gly Leu Lys Asn  
785 790 795 800

Gln Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met Asn Tyr Ile Lys Glu Leu Asp  
805 810 815

Arg Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn Pro Thr Ser Cys Ser Arg Arg  
820 825 830

Phe Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Ser Val Gln Pro Ile Ala Arg  
835 840 845

Glu Leu His Gln Phe Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys Ser His Met Val  
850 855 860

Ser Val Asp Phe Pro Glu Met Met Ala Glu Ile Ile Ser Val Gln Val  
865 870 875 880

Pro Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val Lys Pro Ile Tyr Phe His Thr Gln  
885 890 895

<210> 17

<211> 709

<212> PRT

<213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 17

His His Gln Gln Gln Gln Asp Ala Ala Thr Glu Gly Ser Ser Ser Gly

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |
| Arg | Ala | Arg | Arg | Pro | Ser | Gly | Ala | Ser | Thr | Ser | Ser | Lys | Asp | Ser | Tyr |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Leu | Gly | Ser | Thr | Ser | Val | Ile | Ser | Asp | Ser | Ala | Lys | Glu | Leu | Cys | Lys |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Ala | Val | Ser | Val | Ser | Leu | Gly | Leu | Gly | Val | Glu | Ala | Leu | Glu | His | Leu |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Ser | Ser | Gly | Glu | Gln | Leu | Arg | Gly | Asp | Cys | Met | Tyr | Ala | Pro | Leu | Leu |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Gly | Gly | Pro | Pro | Val | Val | Arg | Pro | Thr | Pro | Cys | Leu | Pro | Leu | Val | Glu |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Cys | Lys | Gly | Ser | Leu | Leu | Asp | Asp | Gly | Pro | Gly | Lys | Gly | Thr | Glu | Glu |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Thr | Ala | Glu | Tyr | Thr | Pro | Phe | Lys | Gly | Gly | Tyr | Asn | Lys | Gly | Leu | Glu |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     |     | 125 |     |     |
| Ala | Glu | Ser | Leu | Gly | Cys | Ser | Gly | Ser | Gly | Glu | Ala | Gly | Ser | Ser | Gly |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Thr | Leu | Glu | Leu | Pro | Ser | Thr | Leu | Ser | Leu | Tyr | Lys | Ser | Gly | Thr | Leu |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Asp | Glu | Ala | Ala | Ala | Tyr | Gln | Thr | Arg | Asp | Tyr | Tyr | Asn | Phe | Pro | Leu |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Ala | Leu | Ala | Gly | Gln | Pro | Pro | Pro | Pro | His | Pro | Arg | Arg | Ile | Lys | Leu |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Glu | Asn | Pro | Leu | Asp | Tyr | Gly | Ser | Ala | Trp | Ala | Ala | Ala | Ala | Ala | Gln |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Cys | Arg | Tyr | Gly | Asp | Leu | Ala | Ser | Leu | His | Gly | Gly | Gly | Ala | Ala | Gly |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Pro | Gly | Ser | Gly | Ser | Pro | Ser | Thr | Ala | Ala | Ser | Ser | Ser | Trp | His | Thr |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Leu | Phe | Thr | Thr | Glu | Glu | Gly | Gln | Leu | Tyr | Gly | Leu | Cys | Gly | Gly | Gly |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Gly | Gly | Ser | Gly | Pro | Gly | Glu | Ala | Gly | Ala | Val | Ala | Pro | Tyr | Gly | Tyr |

260

265

270

Thr Arg Pro Pro Gln Gly Leu Thr Gly Gln Glu Gly Asp Phe Pro Ala  
 275 280 285

Pro Glu Val Trp Tyr Pro Gly Gly Val Val Ser Arg Val Pro Tyr Pro  
 290 295 300

Asn Pro Ser Cys Val Lys Ser Glu Met Gly Pro Trp Met Glu Ser Tyr  
 305 310 315 320

Ser Gly Pro Tyr Gly Asp Met Arg Leu Glu Thr Ala Arg Asp His Val  
 325 330 335

Leu Pro Ile Asp Tyr Tyr Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys Leu Ile Cys  
 340 345 350

Gly Asp Glu Ala Ser Gly Cys His Tyr Gly Ala Leu Thr Cys Gly Ser  
 355 360 365

Cys Lys Val Phe Phe Lys Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln Lys Tyr Leu  
 370 375 380

Cys Ala Ser Arg Asn Asp Cys Thr Ile Asp Lys Phe Arg Arg Lys Asn  
 385 390 395 400

Cys Pro Ser Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Ala Gly Met Thr Leu  
 405 410 415

Gly Ala Arg Lys Leu Lys Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu Gln Glu Glu  
 420 425 430

Gly Glu Ser Ser Ser Ala Ser Ser Pro Thr Glu Asp Thr Thr Gln Lys  
 435 440 445

Leu Thr Val Ser His Ile Glu Gly Tyr Glu Cys Gln Pro Ile Phe Leu  
 450 455 460

Asn Val Leu Glu Ala Ile Glu Pro Gly Val Val Cys Ala Gly His Asp  
 465 470 475 480

Asn Asn Gln Pro Asp Ser Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn Glu  
 485 490 495

Leu Gly Glu Arg Gln Leu Val His Val Val Lys Trp Ala Lys Ala Leu  
 500 505 510

Pro Gly Phe Arg Asn Leu His Val Asp Asp Gln Met Ala Val Ile Gln

515

520

525

Tyr Ser Trp Met Gly Leu Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg Ser Phe  
530 535 540

Thr Asn Val Asn Ser Arg Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp Leu Val Phe  
545 550 555 560

Asn Glu Tyr Arg Met His Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys Val Arg  
565 570 575

Met Arg His Leu Ser Gln Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr Pro Gln  
580 585 590

Glu Phe Leu Cys Met Lys Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile Ile Pro Val  
595 600 605

Asp Gly Leu Lys Asn Gln Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met Asn Tyr  
610 615 620

Ile Lys Glu Leu Asp Arg Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn Pro Thr  
625 630 635 640

Ser Cys Ser Arg Arg Phe Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Ser Val  
645 650 655

Gln Pro Ile Ala Arg Glu Leu His Gln Phe Thr Phe Asp Leu Leu Ile  
660 665 670

Lys Ser His Met Val Ser Val Asp Phe Pro Glu Met Met Ala Glu Ile  
675 680 685

Ile Ser Val Gln Val Pro Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val Lys Pro Ile  
690 695 700

Tyr Phe His Thr Gln  
705

<210> 18

<211> 2760

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 18

atggaagtgc agttagggct ggaagggtc taccctcggc cgccgtccaa gacctaccga 60

ggagctttcc agaatctggt ccagagcgtg cgccaagtga tccagaacc gggccccagg 120

caccagagg ccgcgagcgc agcacctccc ggcgccagtt tgctgctgct gcagcagcag 180

cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcaa 240



|            |             |             |             |             |            |      |
|------------|-------------|-------------|-------------|-------------|------------|------|
| gagactagcc | ccaggcagca  | gcagcagcag  | caggggtgagg | atggttctcc  | ccaagcccat | 300  |
| cgtagaggcc | ccacaggcta  | cctggctctg  | gatgaggaac  | agcaaccttc  | acagccgcag | 360  |
| tcggccctgg | agtgccaccc  | cgagagaggt  | tgcgtcccag  | agcctgggagc | cgccgtggcc | 420  |
| gccagcaagg | ggctgccgca  | gcagctgcca  | gcacctccgg  | acgaggatga  | ctcagctgcc | 480  |
| ccatccacgt | tgtccctgct  | gggccccact  | ttccccggct  | taagcagctg  | ctccgctgac | 540  |
| cttaaagaca | tcttgagcga  | ggccagcacc  | atgcaactcc  | ttcagcaaca  | gcagcaggaa | 600  |
| gcagtatccg | aaggcagcag  | cagcggggaga | gcgagggagg  | cctcggggggc | tcccacttcc | 660  |
| tccaaggaca | attacttagg  | gggcacttcg  | accatttctg  | acaacgcaa   | ggagttgtgt | 720  |
| aaggcagtgt | cggtgtccat  | gggcctgggt  | gtggaggcgt  | tggagcatct  | gagtccaggg | 780  |
| gaacagcttc | ggggggattg  | catgtacgcc  | ccacttttgg  | gagttccacc  | cgctgtgcgt | 840  |
| cccactcctt | gtgccccatt  | ggccgaatgc  | aaaggttctc  | tgctagacga  | cagcgcaggg | 900  |
| aagagcactg | aagatactgc  | tgagtattcc  | cctttcaagg  | gaggttacac  | caaagggcta | 960  |
| gaaggcgaga | gcctaggctg  | ctctggcagc  | gctgcagcag  | ggagctccgg  | gacacttgaa | 1020 |
| ctgccgtcta | ccctgtctct  | ctacaagtcc  | ggagcactgg  | acgaggcagc  | tgcgtaccag | 1080 |
| agtgcgcact | actacaactt  | tccactggct  | ctggccggac  | cgccgcccc   | tccgcccct  | 1140 |
| ccccatcccc | acgctcgcat  | caagctggag  | aaccgcctgg  | actacggcag  | cgctggggcg | 1200 |
| gctgcggcgg | cgcagtgccg  | ctatggggac  | ctggcgagcc  | tgcatggcgc  | gggtgcagcg | 1260 |
| ggaccegggt | ctgggtcacc  | ctcagccgcc  | gcttcctcat  | cctggcacac  | tctcttcaca | 1320 |
| gccgaagaag | gccagttgta  | tggaccgtgt  | ggtggtggtg  | ggggtgggtg  | cggcggcggc | 1380 |
| ggcggcggcg | gcggcggcgg  | cggcggcggc  | ggcggcggcg  | aggcgggagc  | tgtagcccc  | 1440 |
| tacggctaca | ctcggcccc   | tcaggggctg  | gcgggccagg  | aaagcgactt  | caccgcacct | 1500 |
| gatgtgtggt | accctggcgg  | catggtgagc  | agagtgcctt  | atcccagtcc  | cacttgtgtc | 1560 |
| aaaagcgaaa | tgggccccctg | gatggatagc  | tactccggac  | cttacgggga  | catgcgtttg | 1620 |
| gagactgcca | gggaccatgt  | tttgcccatt  | gactattact  | ttccaccca   | gaagacctgc | 1680 |
| ctgatctgtg | gagatgaagc  | ttctgggtgt  | cactatggag  | ctctcacatg  | tggaagctgc | 1740 |
| aaggctttct | tcaaaagagc  | cgctgaaggg  | aaacagaagt  | acctgtgcgc  | cagcagaaat | 1800 |
| gattgcacta | ttgataaatt  | ccgaaggaaa  | aattgtccat  | cttgtcgtct  | tcggaatgt  | 1860 |
| tatgaagcag | ggatgactct  | gggagccccg  | aagctgaaga  | aacttggtaa  | tctgaaacta | 1920 |
| caggaggaag | gagaggcttc  | cagcaccacc  | agccccactg  | aggagacaac  | ccagaagctg | 1980 |
| acagtgtcac | acattgaagg  | ctatgaatgt  | cagcccatct  | ttctgaatgt  | cctggaagcc | 2040 |
| attgagccag | gtgtagtgtg  | tgctggacac  | gacaacaacc  | agcccgactc  | ctttgcagcc | 2100 |
| ttgctctcta | gcctcaatga  | actgggagag  | agacagcttg  | tacacgtggt  | caagtgggcc | 2160 |

aaggccttgc ctggcttccg caacttacac gtggacgacc agatggctgt cattcagtac 2220  
tcctggatgg ggctcatggt gtttgccatg ggctggcgat ccttcaccaa tgtcaactcc 2280  
aggatgctct acttcgcccc tgatctgggt ttcaatgagt accgcatgca caagtcccgg 2340  
atgtacagcc agtgtgtccg aatgaggcac ctctctcaag agtttgatg gctccaaatc 2400  
acccccagg aattcctgtg catgaaagca ctgctactct tcagcattat tccagtggat 2460  
gggctgaaaa atcaaaaatt ctttgatgaa cttcgaatga actacatcaa ggaactcgat 2520  
cgtatcattg catgcaaaag aaaaaatccc acatcctgct caagacgctt ctaccagctc 2580  
accaagctcc tggactccgt gcagcctatt gcgagagagc tgcattcagtt cacttttgac 2640  
ctgctaataca agtcacacat ggtgagcgtg gactttccgg aatgatggc agagatcatc 2700  
tctgtgcaag tgcccaagat cttttctggg aaagtcaagc ccatctattt ccacaccag 2760

<210> 19  
<211> 2760  
<212> ДНК  
<213> Homo sapiens

<400> 19  
atggaagtgc agttagggct ggggaagggtc taccctcggc cgccgtccaa gacctaccga 60  
ggagctttcc agaatctggt ccagagcgtg cgccaagtga tccagaacctc gggccccagg 120  
caccagagg ccgagagcgc agcacctccc ggcgccagtt tgctgctgct gcagcagcag 180  
cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcaa 240  
gagactagcc ccaggcagca gcagcagcag cagggtgagg atggttctcc ccaagcccat 300  
cgtagaggcc ccacaggcta cctggctctg gatgaggaac agcaaccttc acagccgcag 360  
tcggccctgg agtgccacct cgagagaggt tgcgtcccag agcctggagc cgccgtggcc 420  
gccagcaagg ggctgccgca gcagctgcca gcacctccgg acgaggatga ctcagctgcc 480  
ccatccagct tgtccctgct gggccccact ttccccggct taagcagctg ctccgctgac 540  
cttaaagaca tcctgagcga ggccagcacc atgcaactcc ttcagcaaca gcagcaggaa 600  
gcagtatccg aaggcagcag cagcgggaga gcgagggagg cctcgggggc tcccacttcc 660  
tccaaggaca attacttagg gggcacttctg accatttctg acaacgcaa ggagttgtgt 720  
aaggcagtgt cgggtgcatc gggcctgggt gtggaggcgt tggagcatct gagtccaggg 780  
gaacagcttc ggggggattg catgtacgcc ccacttttgg gagttccacc cgctgtgcgt 840  
cccactcctt gtgccccatt ggccgaatgc aaaggttctc tgctagacga cagcgcagggc 900  
aagagcactg aagatactgc tgagtattcc cttttcaagg gaggttacac caaagggcta 960  
gaaggcgaga gcctaggctg ctctggcagc gctgcagcag ggagctccgg gacacttgaa 1020  
ctgccgtcta ccctgtctct ctacaagtcc ggagcactgg acgagggcagc tgcgtaccag 1080

agtcgcgact actacaactt tccactggct ctggccggac cgccgcccc tccgccgct 1140  
ccccatcccc acgctcgcat caagctggag aaccgctgg actacggcag cgctggggcg 1200  
gctgcggcgg cgcagtgccg ctatggggac ctggcgagcc tgcattggcg gggcgcagcg 1260  
ggaccgggtt ctgggtcacc ctcagccgcc gcttcctcat cctggcacac tctcttcaca 1320  
gccgaagaag gccagttgta tggaccgtgt ggtggtggtg ggggtggtgg cggcggcggc 1380  
ggcggcggcg gcggcggcg cggcggcggc ggcggcggcg aggcgggagc tgtagcccc 1440  
tacggctaca ctcggcccc tcaggggctg gcgggcccagg aaagcgactt caccgcacct 1500  
gatgtgtggt accctggcgg catggtgagc agagtgcctt atcccagtcc cacttgtgtc 1560  
aaaagcгаа tgggcccctg gatggatagc tactccggac cttacgggga catgcgtttg 1620  
gagactgcca gggaccatgt tttgccatt gactattact ttccaccca gaagacctgc 1680  
ctgatctgtg gagatgaagc ttctgggtgt cactatggag ctctcacatg tggaagctgc 1740  
aaggtcttct tcaaaagagc cgctgaaggg aaacagaagt acctgtgccc cagcagaaat 1800  
gattgacta ttgataaatt ccgaaggaaa aattgtccat cttgtcgtct tcggaaatgt 1860  
tatgaagcag ggatgactct gggagcccgg aagctgaaga aacttggtaa tctgaaacta 1920  
caggaggaag gagaggcttc cagcaccacc agccccactg aggagacaac ccagaagctg 1980  
acagtgtcac acattgaagg ctatgaatgt cagcccatct ttctgaatgt cctggaagcc 2040  
attgagccag gtgtagtgtg tgctggacac gacaacaacc agcccgactc ctttgcagcc 2100  
ttgctctcta gcctcaatga actgggagag agacagcttg tacacgtggt caagtgggcc 2160  
aaggccttgc ctggcttccg caacttacac gtggacgacc agatggctgt cattcagtac 2220  
tcctggatgg ggctcatggt gtttgccatg ggctggcgat ccttcaccaa tgtcaactcc 2280  
aggatgctct acttcgcccc tgatctggtt ttcaatgagt accgcatgca caagtcccgg 2340  
atgtacagcc agtgtgtccg aatgaggcac ctctctcaag agtttgatg gctccaaatc 2400  
acccccagg aattcctgtg catgaaagca ctgctactct tcagcattat tccagtggat 2460  
gggctgaaaa atcaaaaatt ctttgatgaa cttcgaatga actacatcaa ggaactcgat 2520  
cgtatcattg catgcaaaag aaaaaatccc acatcctgct caagacgctt ctaccagctc 2580  
accaagctcc tggactccgt gcagcctatt gcgagagagc tgcatcagct cacttttgac 2640  
ctgctaataca agtcacacat ggtgagcgtg gactttccgg aatgatggc agagatcatc 2700  
tctgtgcaag tgcccaagat cttttctggg aaagtcaagc ccatctattt ccacaccag 2760

<210> 20  
<211> 20  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Последовательность праймера

<400> 20  
 agagactcag aggcgaccat 20

<210> 21  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Последовательность праймера

<400> 21  
 atcagсааас асаgсagctc 20

<210> 22  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Последовательность праймера

<400> 22  
 agagctgttg gatgaggacc агаа 24

<210> 23  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Последовательность праймера

<400> 23  
 aggctcсааа ggcacttgac tact 24

<210> 24  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Последовательность праймера

<400> 24  
 гассааgсgg gttgттattg а 21

<210> 25  
 <211> 23  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность

<220>  
 <223> Последовательность праймера

<400> 25  
 tgccttgтсg gтсататттt tca 23

<210> 26  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Последовательность праймера  
  
 <400> 26  
 cggagaасса aасggaаagg 20

<210> 27  
 <211> 19  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Последовательность праймера  
  
 <400> 27  
 cttcgсссac agtgaatgc 19

<210> 28  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Последовательность праймера  
  
 <400> 28  
 асаgсаgссg gtttattgtg cttc 24

<210> 29  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Последовательность праймера  
  
 <400> 29  
 tggcattcag tctcacacca ctgt 24

<210> 30  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Последовательность праймера  
  
 <400> 30  
 ассаctсacc atcatctсаа ggsа 24

<210> 31  
 <211> 24  
 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Последовательность праймера  
 <400> 31  
 tgctcttctt tgccagatcc tcgt 24

<210> 32  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Последовательность праймера  
 <400> 32  
 gccttaccct tgcagcttac 20

<210> 33  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Последовательность праймера  
 <400> 33  
 gagcatgctg tccactctgt 20

<210> 34  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Последовательность праймера  
 <400> 34  
 cttgcgcatc cccaagtcag atgt 24

<210> 35  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Последовательность праймера  
 <400> 35  
 tttctctctc ttctcgtgct gctt 24

<210> 36  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Последовательность праймера

|   |    |
|---|----|
| <400> 36<br>gagcctgcta cagatggtca   | 20 |
|   |    |
| <210> 37<br><211> 20<br><212> ДНК<br><213> Искусственная последовательность |    |
|   |    |
| <220><br><223> Последовательность праймера                                  |    |
|   |    |
| <400> 37<br>tgtctaccag caggacgaag   | 20 |
|   |    |
| <210> 38<br><211> 20<br><212> ДНК<br><213> Искусственная последовательность |    |
|   |    |
| <220><br><223> Последовательность праймера                                  |    |
|   |    |
| <400> 38<br>cctcctgaag aatcgattcc   | 20 |
|   |    |
| <210> 39<br><211> 20<br><212> ДНК<br><213> Искусственная последовательность |    |
|   |    |
| <220><br><223> Последовательность праймера                                  |    |
|   |    |
| <400> 39<br>gaggtccaca cactgaagtt   | 20 |
|   |    |
| <210> 40<br><211> 24<br><212> ДНК<br><213> Искусственная последовательность |    |
|   |    |
| <220><br><223> Последовательность праймера                                  |    |
|   |    |
| <400> 40<br>tttctgggct ggссааасат аагс                                      | 24 |
|   |    |
| <210> 41<br><211> 24<br><212> ДНК<br><213> Искусственная последовательность |    |
|   |    |
| <220><br><223> Последовательность праймера                                  |    |
|   |    |
| <400> 41<br>acacaaggta atgtgtgggt ccga                                      | 24 |

<210> 42  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Последовательность праймера  
  
 <400> 42  
 cggcaggtgt ttgtgtgtgg aaat 24

<210> 43  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Последовательность праймера  
  
 <400> 43  
 agaagasaca sagcasagca gaca 24

<210> 44  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Последовательность праймера  
  
 <400> 44  
 tagtgaaac agtgtgtctg ccca 24

<210> 45  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Последовательность праймера  
  
 <400> 45  
 agcgttcagc acttctgagg tctt 24

<210> 46  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Последовательность праймера  
  
 <400> 46  
 cgctctgggt catctgctct g 21

<210> 47  
 <211> 22  
 <212> ДНК



<213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Последовательность праймера  
 <400> 47  
 tcatcaaagg tgctctcgtc tg 22

<210> 48  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Последовательность праймера  
 <400> 48  
 tggagaggaa gttcagccat caga 24

<210> 49  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Последовательность праймера  
 <400> 49  
 aggagagctg ctttcgctta gtct 24

<210> 50  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Последовательность праймера  
 <400> 50  
 acctgctcag cttttgtctc tgat 24

<210> 51  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Последовательность праймера  
 <400> 51  
 agatccaggc ttgcttactg tcct 24

<210> 52  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
 <220>  
 <223> Последовательность праймера

<400> 52  
attctggggtt gggagtgcaa ggaа 24

<210> 53  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Последовательность праймера

<400> 53  
aggagacatg cccaggatga ааса 24

<210> 54  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Последовательность праймера

<400> 54  
actaggcagg acattgacat ccca 24

<210> 55  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Последовательность праймера

<400> 55  
acagtaaacc tctccacaca tggc 24

<210> 56  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Последовательность праймера

<400> 56  
tatgacaccc agggctttcg ttca 24

<210> 57  
<211> 24  
<212> ДНК  
<213> Искусственная последовательность

<220>  
<223> Последовательность праймера

<400> 57  
taacgttccc tgcgcttta caga 24

<210> 58  
 <211> 18  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Последовательность праймера  
  
 <400> 58  
 tccsaaatcc tgacccca 18

<210> 59  
 <211> 20  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Последовательность праймера  
  
 <400> 59  
 ассасасагс ссстаггага 20

<210> 60  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Последовательность праймера  
  
 <400> 60  
 асагггтггс ссааатагаа с 21

<210> 61  
 <211> 21  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Последовательность праймера  
  
 <400> 61  
 сстгтсггг асаагсггга а 21

<210> 62  
 <211> 24  
 <212> ДНК  
 <213> Искусственная последовательность  
  
 <220>  
 <223> Последовательность праймера  
  
 <400> 62  
 гггтсаттс сассастса ааса 24

<210> 63  
 <211> 24  
 <212> ДНК

<213> Искусственная последовательность

<220>

<223> Последовательность праймера

<400> 63

ggagaaaggc cttacagtag tctc

1

24

- 107 -

Досье WSGR № 31951-731.101

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Слитый белок, содержащий полипептид андрогенного рецептора (AR), имеющий по меньшей мере 95% идентичность лиганд-связывающему домену, имеющему аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности от положения 554-919 последовательности SEQ ID NO: 1, и имеющий аминокислотную замену F876L относительно SEQ ID NO: 1, где указанный полипептид AR слит с гетерологическим полипептидом, сигнальной последовательностью секреции, эпитопной меткой или аффинной меткой.

2. Слитый белок по п. 1, где полипептид AR имеет по меньшей мере 96% идентичность лиганд-связывающему домену.

3. Слитый белок по п. 1, где полипептид AR имеет по меньшей мере 97% идентичность лиганд-связывающему домену.

4. Слитый белок по п. 1, где полипептид AR имеет по меньшей мере 98% идентичность лиганд-связывающему домену.

5. Слитый белок по п. 1, где полипептид AR содержит последовательность аминокислот, представленную SEQ ID NO: 5.

6. Слитый белок по п. 1, где полипептид AR дополнительно содержит одну или более аминокислотных замен в дополнение к аминокислотной замене F876L.

7. Слитый белок по п. 6, где одна или более аминокислотных замен представляют собой T877A, W741C, W741L, W741R, L701H или H874Y.

8. Слитый белок по п. 1, где полипептид AR дополнительно содержит одну из:

(a) замены треонина в аминокислотном положении 877 последовательности SEQ ID NO: 1 лейцином, изолейцином, валином, аланином, фенилаланином, глицином, метионином, серином, цистеином, триптофаном, лизином, аргинином, гистидином, пралином, тирозином, аспарагином, глутамином, аспарагиновой кислотой или глутаминовой кислотой;

(b) замены триптофана в аминокислотном положении 741 последовательности SEQ ID NO: 1 лейцином, изолейцином, валином, аланином, фенилаланином, глицином, метионином, серином, треонином, цистеином, лизином, аргинином, гистидином, пралином, тирозином, аспарагином, глутамином, аспарагиновой кислотой или глутаминовой кислотой;

(с) замены лейцина в аминокислотном положении 701 последовательности SEQ ID NO: 1 изолейцином, валином, аланином, фенилаланином, глицином, метионином, гистидином, серином, треонином, цистеином, лизином, аргинином, триптофаном, пролином, тирозином, аспарагином, глутамином, аспарагиновой кислотой или глутаминовой кислотой; и

(d) замены гистидина в аминокислотном положении 874 последовательности SEQ ID NO: 1 лейцином, изолейцином, валином, аланином, фенилаланином, глицином, метионином, серином, треонином, цистеином, лизином, аргинином, триптофаном, пролином, тирозином, аспарагином, глутамином, аспарагиновой кислотой или глутаминовой кислотой.

9. Слитый белок по п. 1, где гетерологическим полипептидом является гетерологический ДНК связывающий домен, флуоресцентный белок или биолюминесцентный белок.

10. Слитый белок по п. 9, где гетерологический ДНК связывающий домен выбран из группы, состоящей из GAL4 и LexA.

11. Слитый белок по п. 9, где полипептид AR связан с гетерологическим ДНК связывающим доменом через пептидный линкер.

12. Слитый белок по п. 9, где флуоресцентный белок выбран из группы, состоящей из зеленого флуоресцентного белка (GFP), красного флуоресцентного белка (RFP), голубого флуоресцентного белка (CFP), желтого флуоресцентного белка (YFP) и синего флуоресцентного белка (BFP).

13. Слитый белок по п. 1, где эпитопная метка выбрана из группы, состоящей из с-тус, V-5 гемагглютинаина (HA) и FLAG.

14. Слитый белок по п. 1, где аффинная метка выбрана из группы, состоящей из биотина, метки strep-tag, хитин-связывающего белка (CBP), мальтоза-связывающего белка (MBP), глутатион-S-трансферазы (GST) и поли(His) метки.

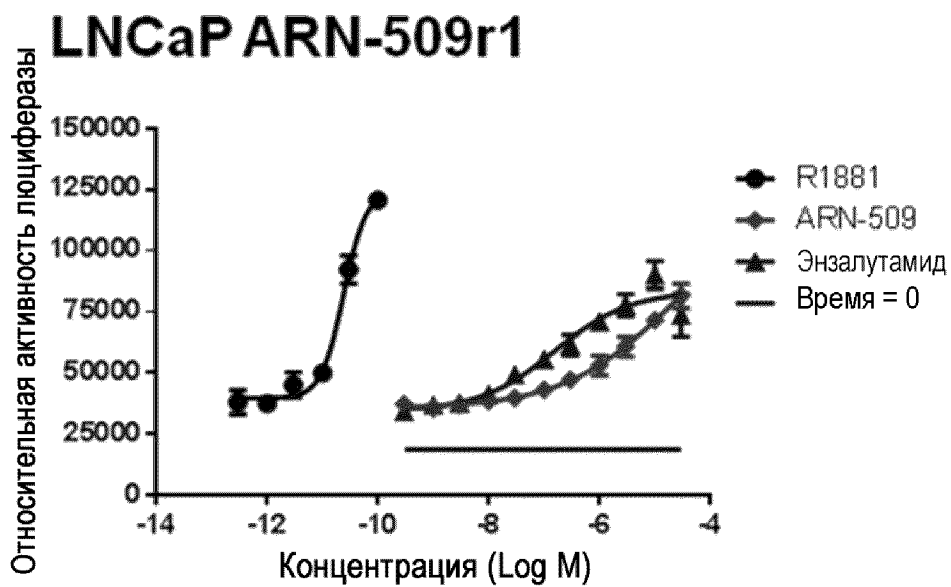
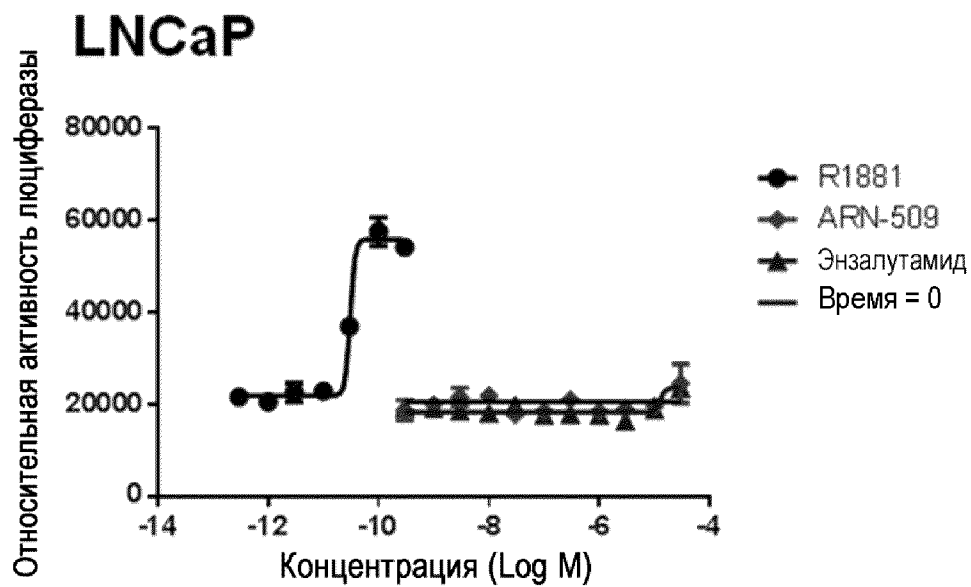
15. Молекула кДНК, кодирующая полипептид андрогенного рецептора (AR) имеющий по меньшей мере 95% идентичность лиганд-связывающему домену, имеющему аминокислотную последовательность, соответствующую последовательности от положения 554-919 последовательности SEQ ID NO: 1, и имеющий аминокислотную замену F876L относительно SEQ ID NO: 1.

16. Молекула кДНК по п. 15, где полипептид AR имеет по меньшей мере 96% идентичность лиганд-связывающему домену.

17. Молекула кДНК по п. 15, где полипептид AR имеет по меньшей мере 97% идентичность лиганд-связывающему домену.
18. Молекула кДНК по п. 15, где полипептид AR имеет по меньшей мере 98% идентичность лиганд-связывающему домену.
19. Молекула кДНК по п. 15, где молекула кДНК содержит нуклеотидную последовательность, представленную SEQ ID NO: 19.
20. Вектор, содержащий молекулу кДНК по п. 15.
21. Вектор по п. 20, где вектором является вирусный или плазмидный вектор.
22. Вектор по п. 20, где молекула кДНК функционально связана с промотором.
23. Вектор по п.22, где промотором является конститутивный или индуцируемый промотор.
24. Выделенная клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 20.
25. Выделенная клетка-хозяин по п. 24, где выделенной клеткой-хозяином является прокариотическая клетка.
26. Выделенная клетка-хозяин по п. 25, где выделенной клеткой-хозяином является бактериальная клетка.
27. Выделенная клетка-хозяин по п. 24, где выделенной клеткой-хозяином является эукариотическая клетка.
28. Выделенная клетка-хозяин по п. 27, где выделенной клеткой-хозяином является клетка млекопитающего, клетка дрожжей, клетка насекомого, клетка растения или клетка земноводного.
29. Микрочип, содержащий слитый белок по п. 1 или молекулу кДНК по п. 15.
30. Система для обнаружения, измененного AR, который устойчив к ингибированию антагонистом андрогенного рецептора (AR) первого или второго поколения, у субъекта, содержащая:
  - (a) образец, взятый у субъекта, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую полипептид AR; и
  - (b) микроматрицу, содержащую молекулу кДНК по п. 15.
31. Система по п. 30, где микроматрица содержится на микрочипе.

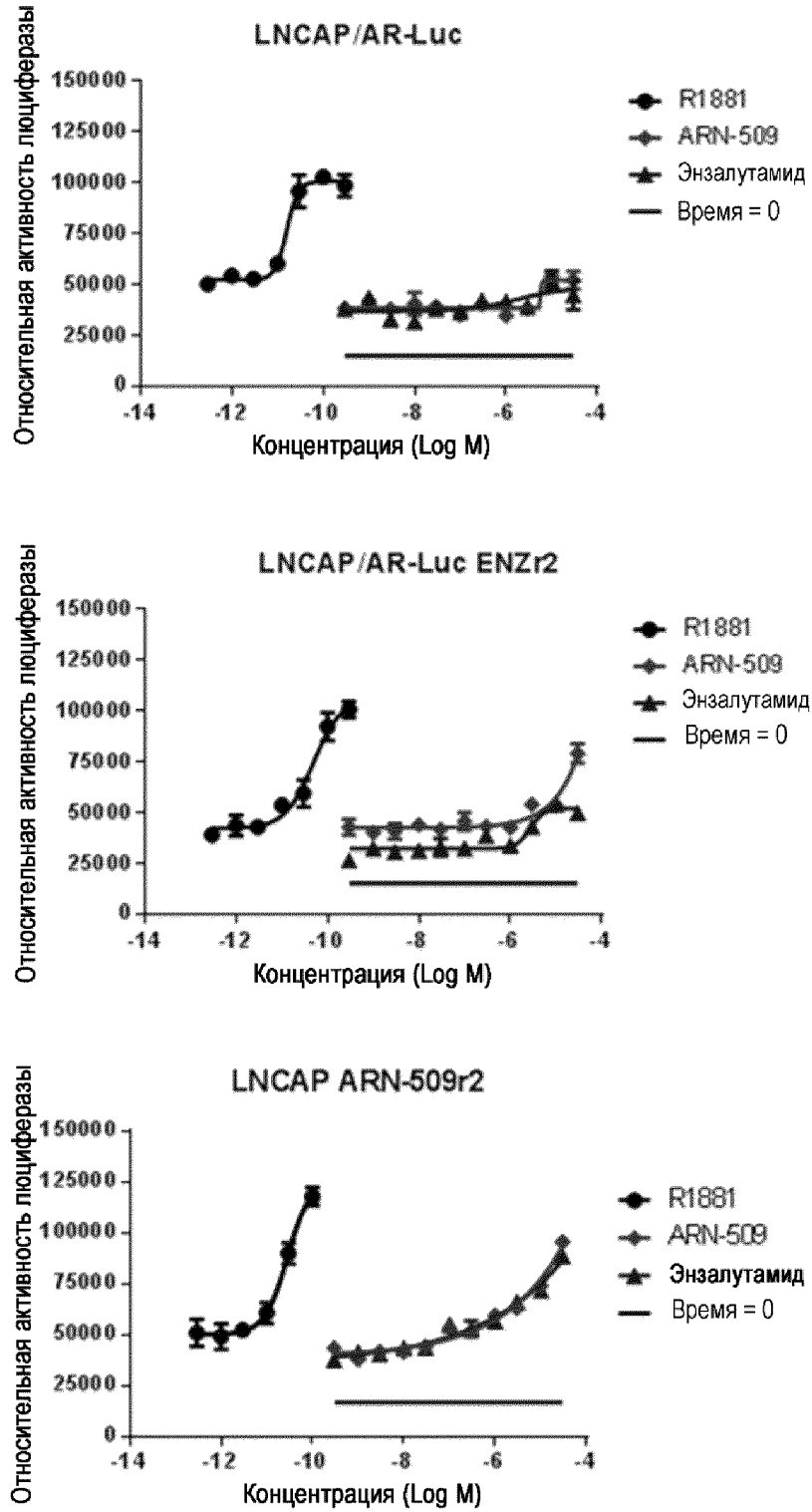
По доверенности

Фиг. 1А

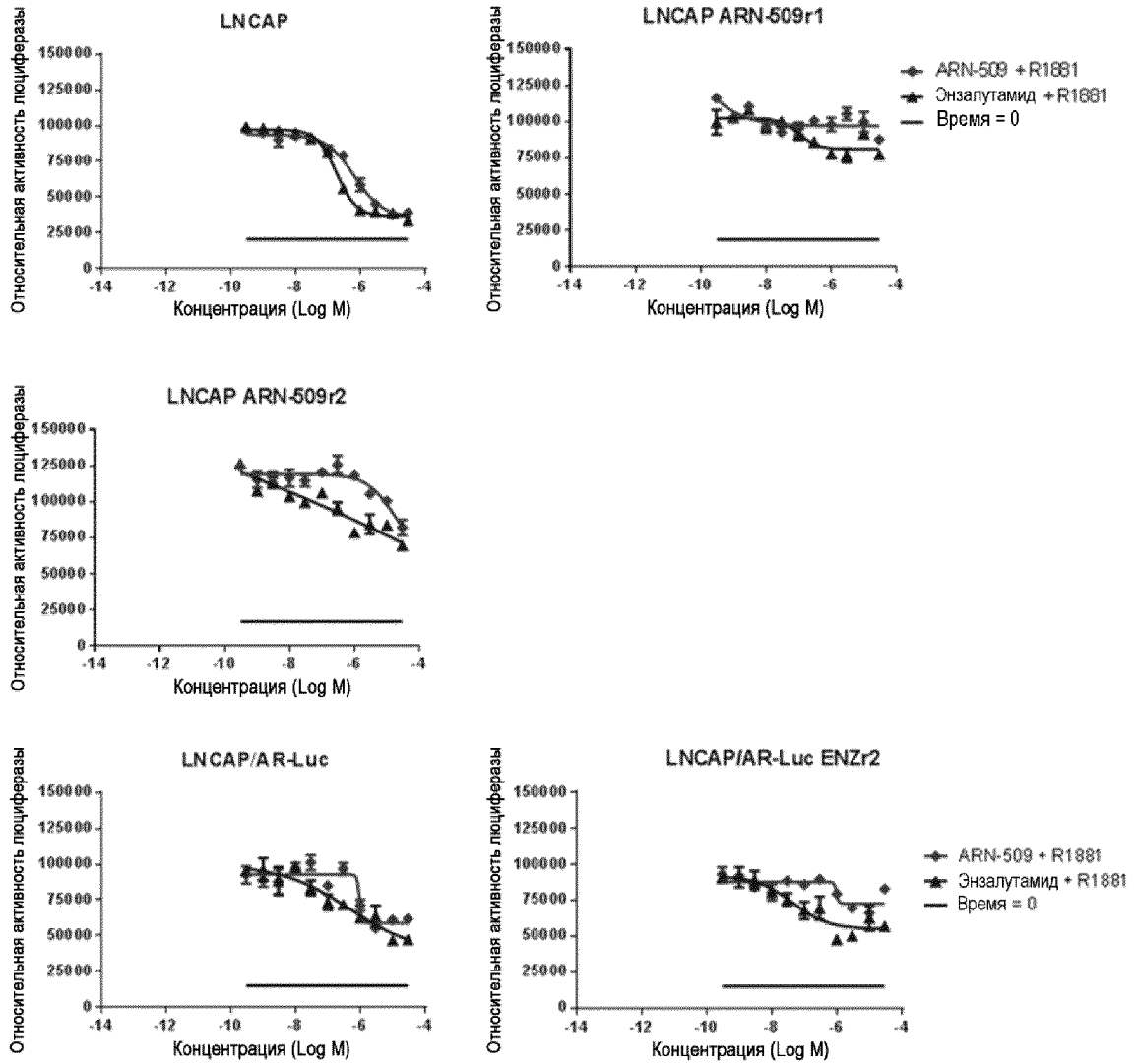




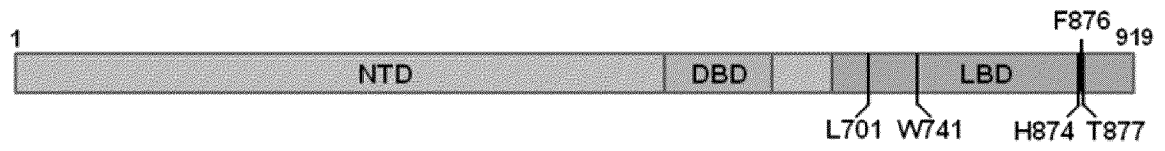
Фиг. 1В



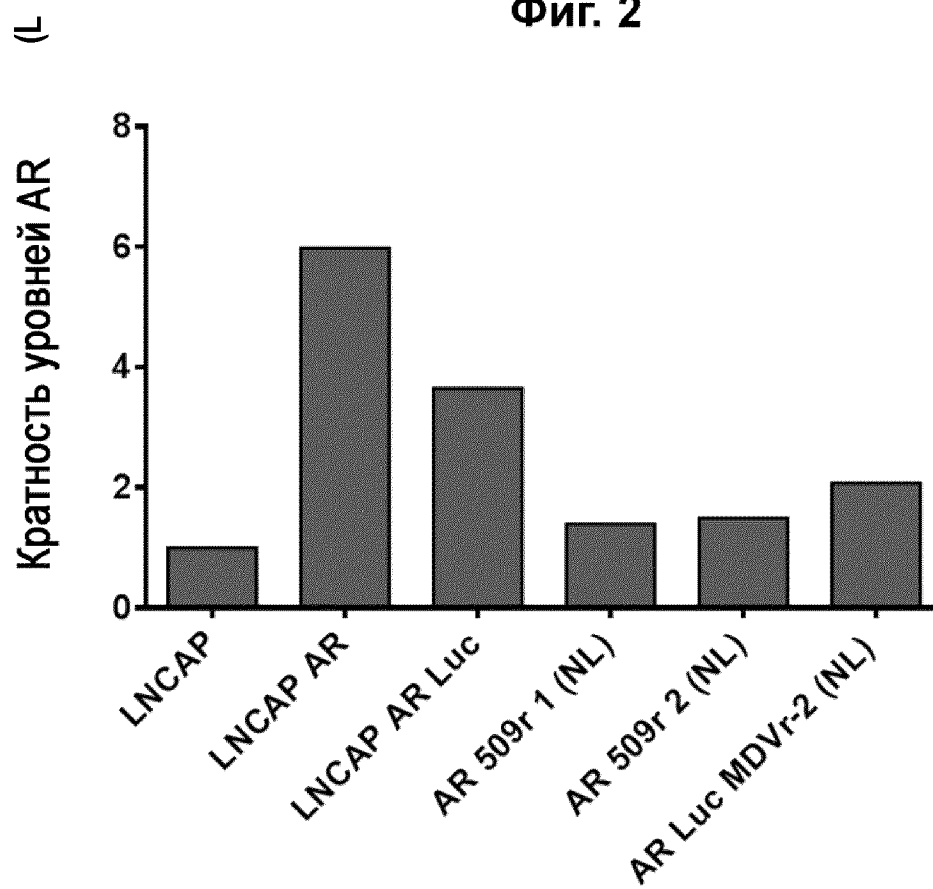
Фиг. 1С



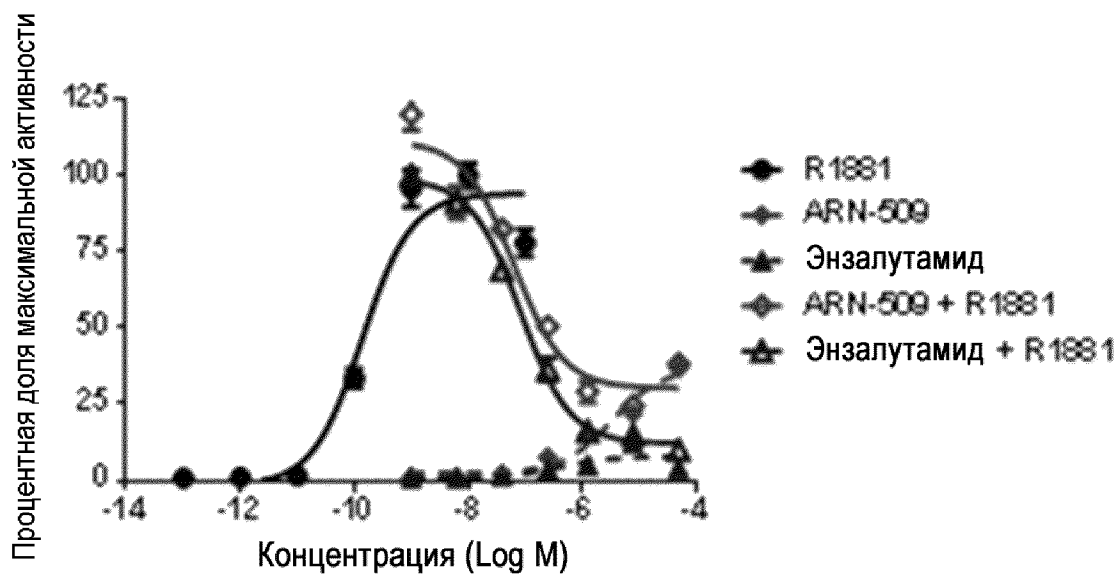
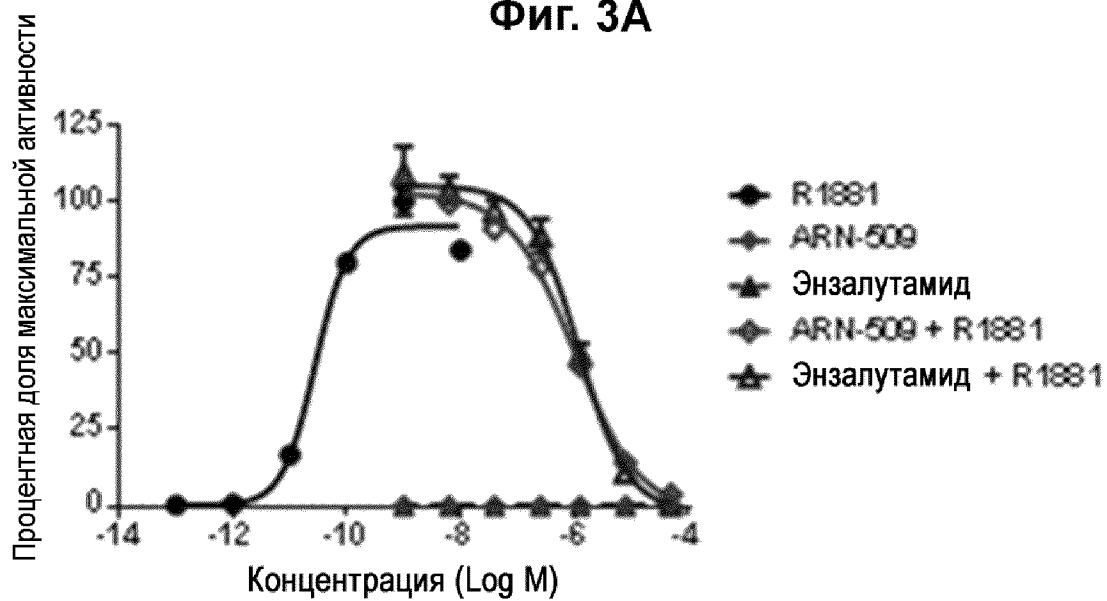
Фиг. 1D



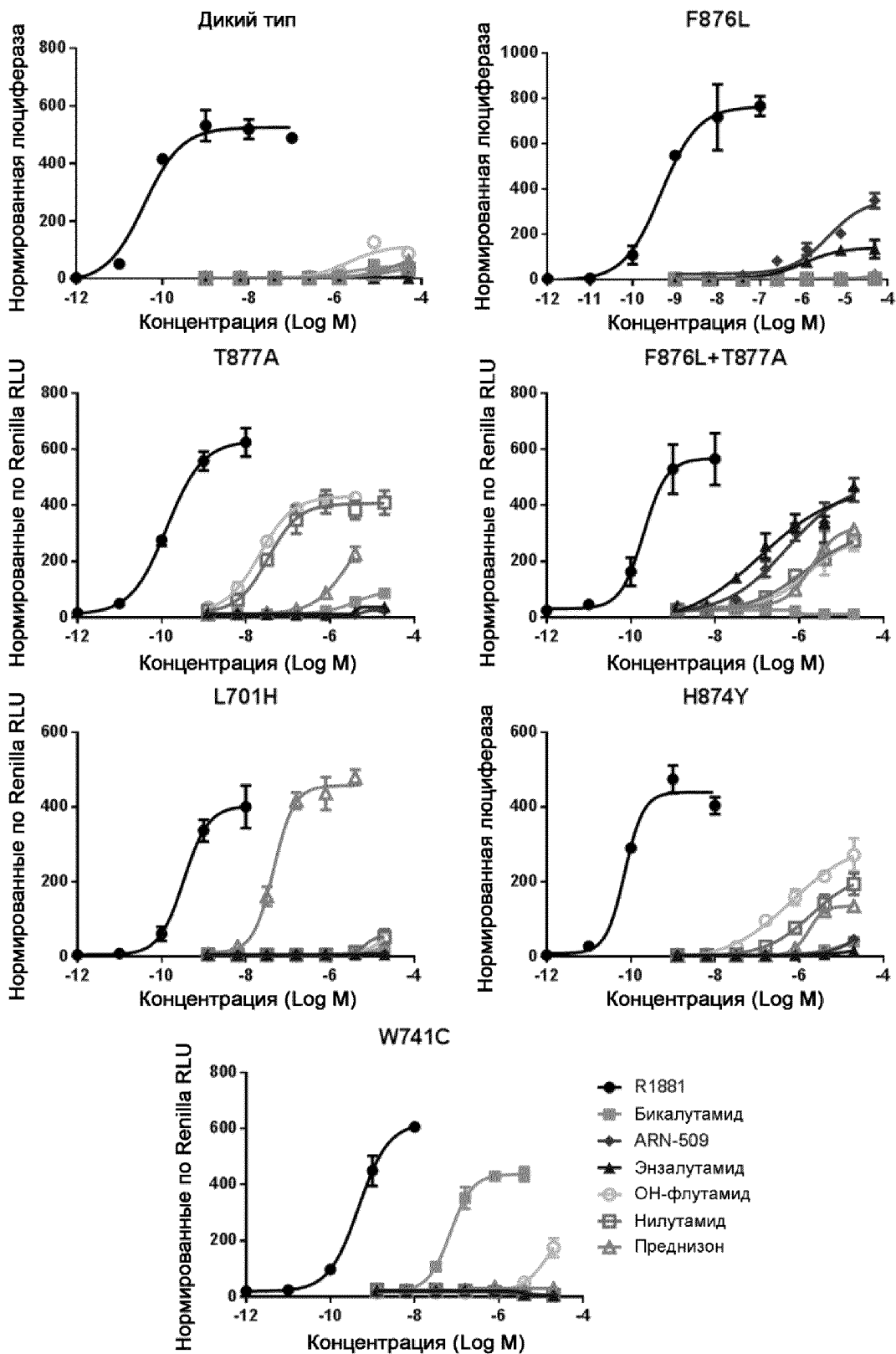
Фиг. 2



Фиг. 3А

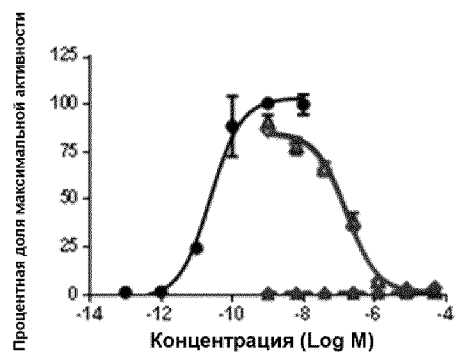


Фиг. 3В

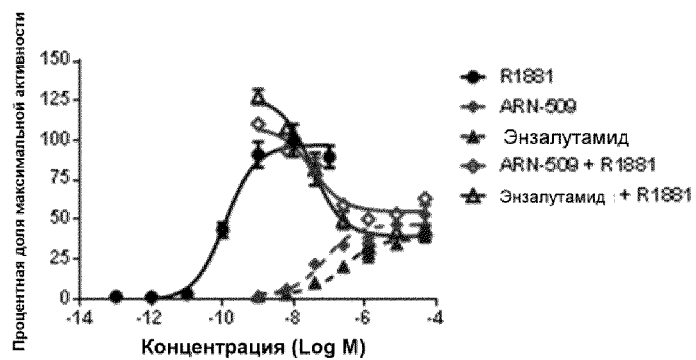


Фиг. 4

А

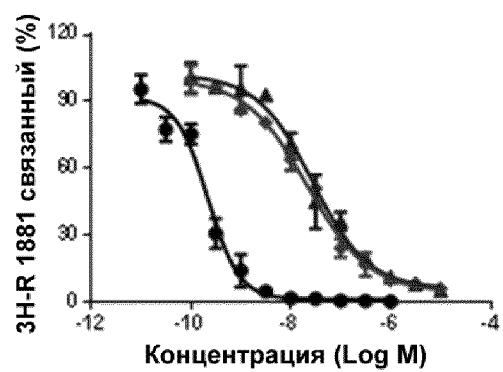


В

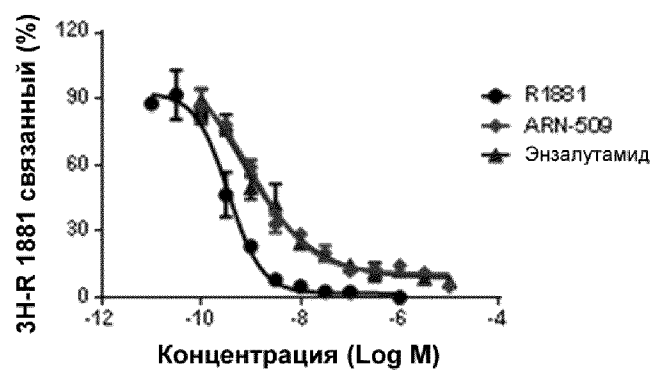


Фиг. 5

А

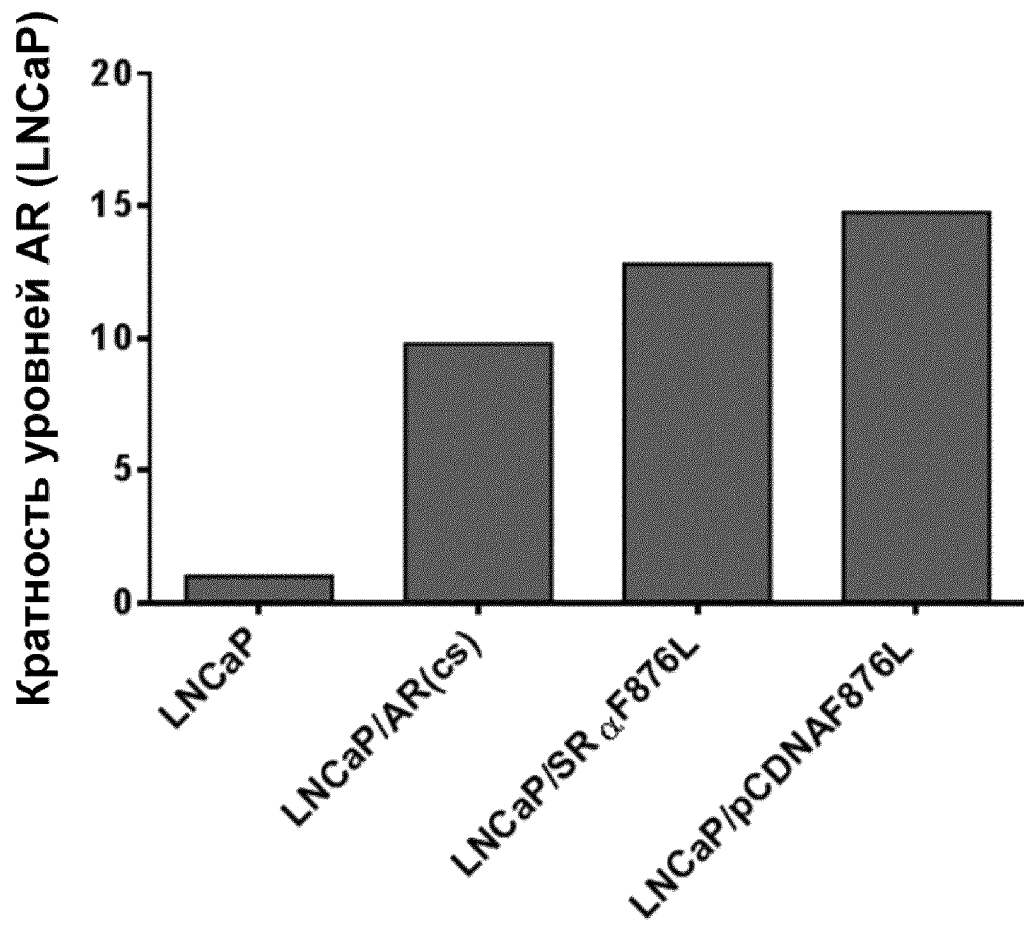


В



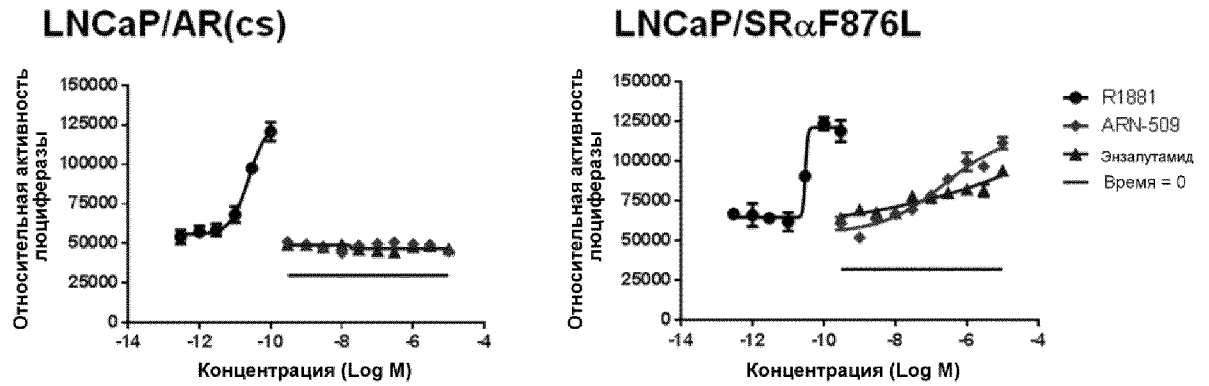


Фиг. 6

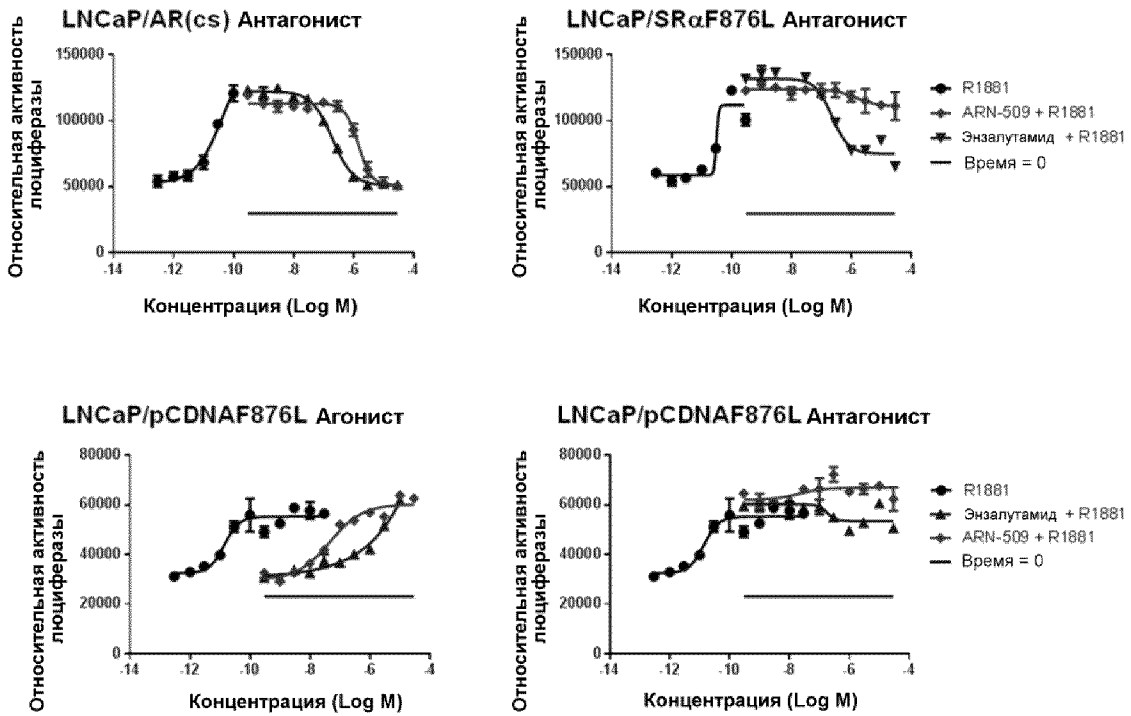


Фиг. 7

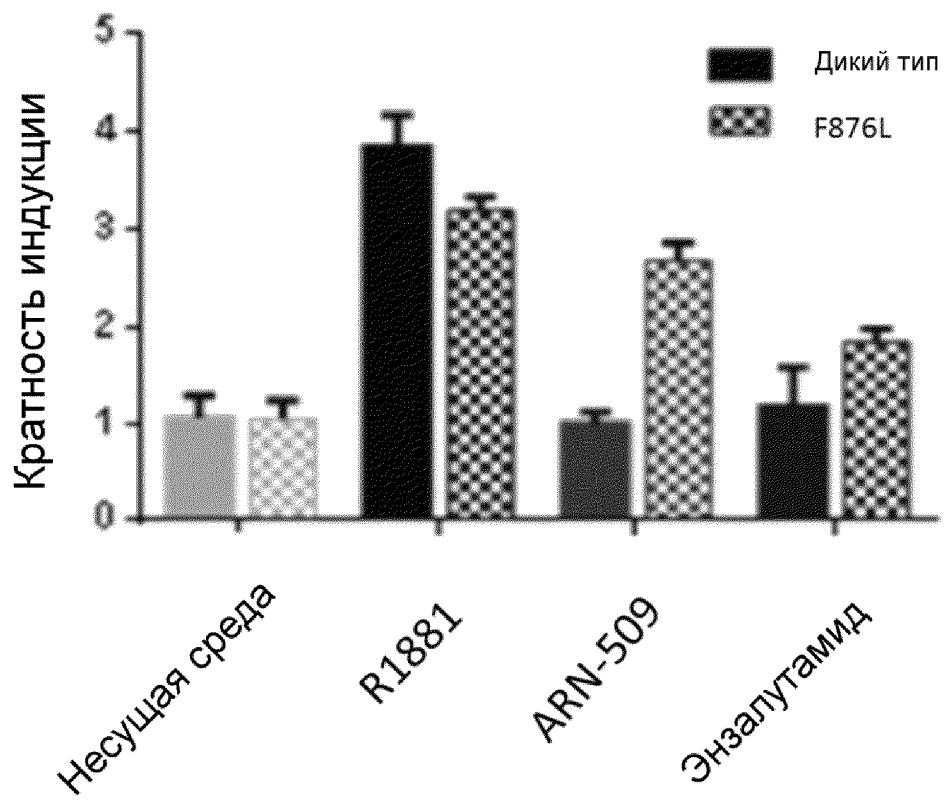
**A**



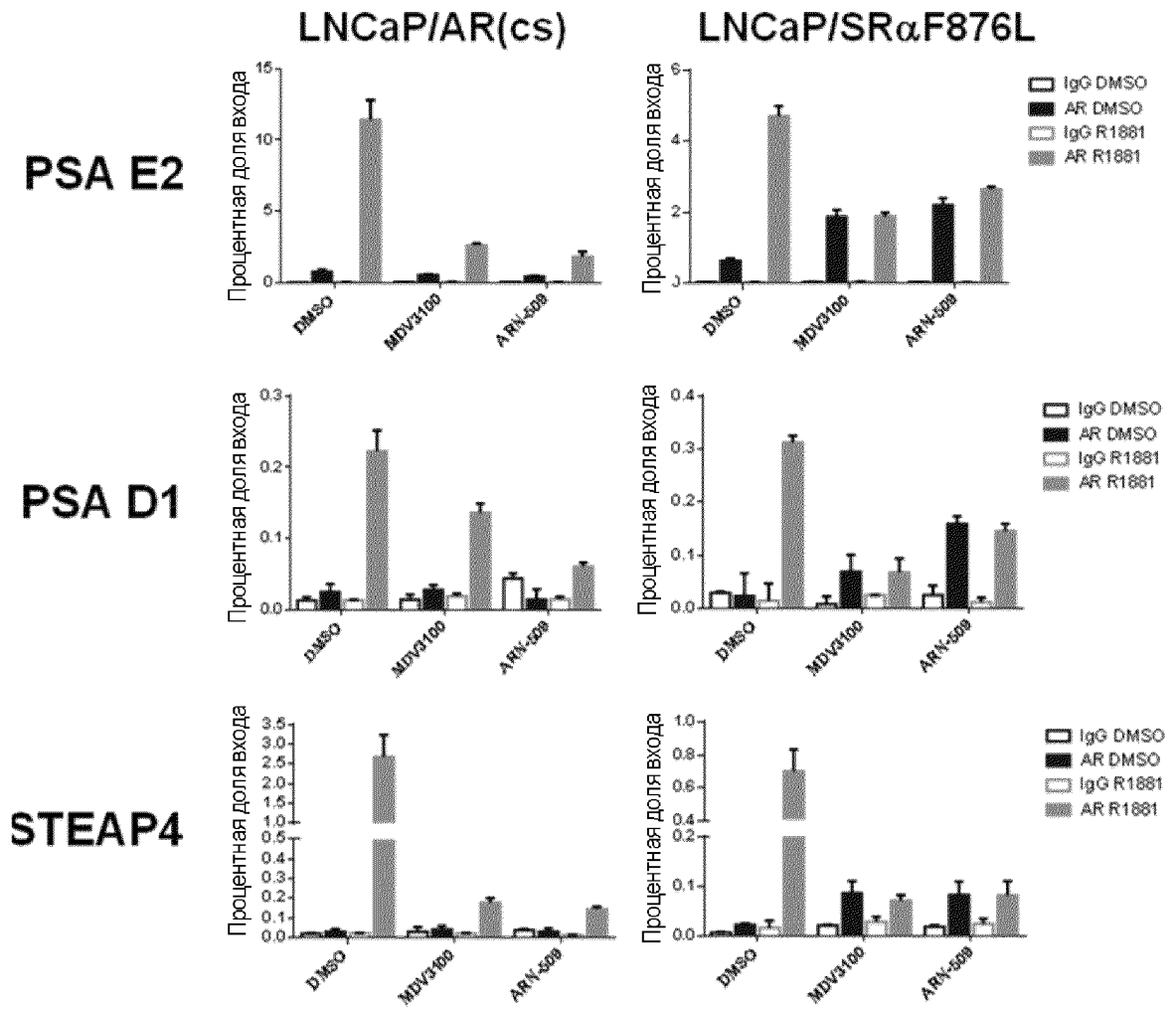
**B**



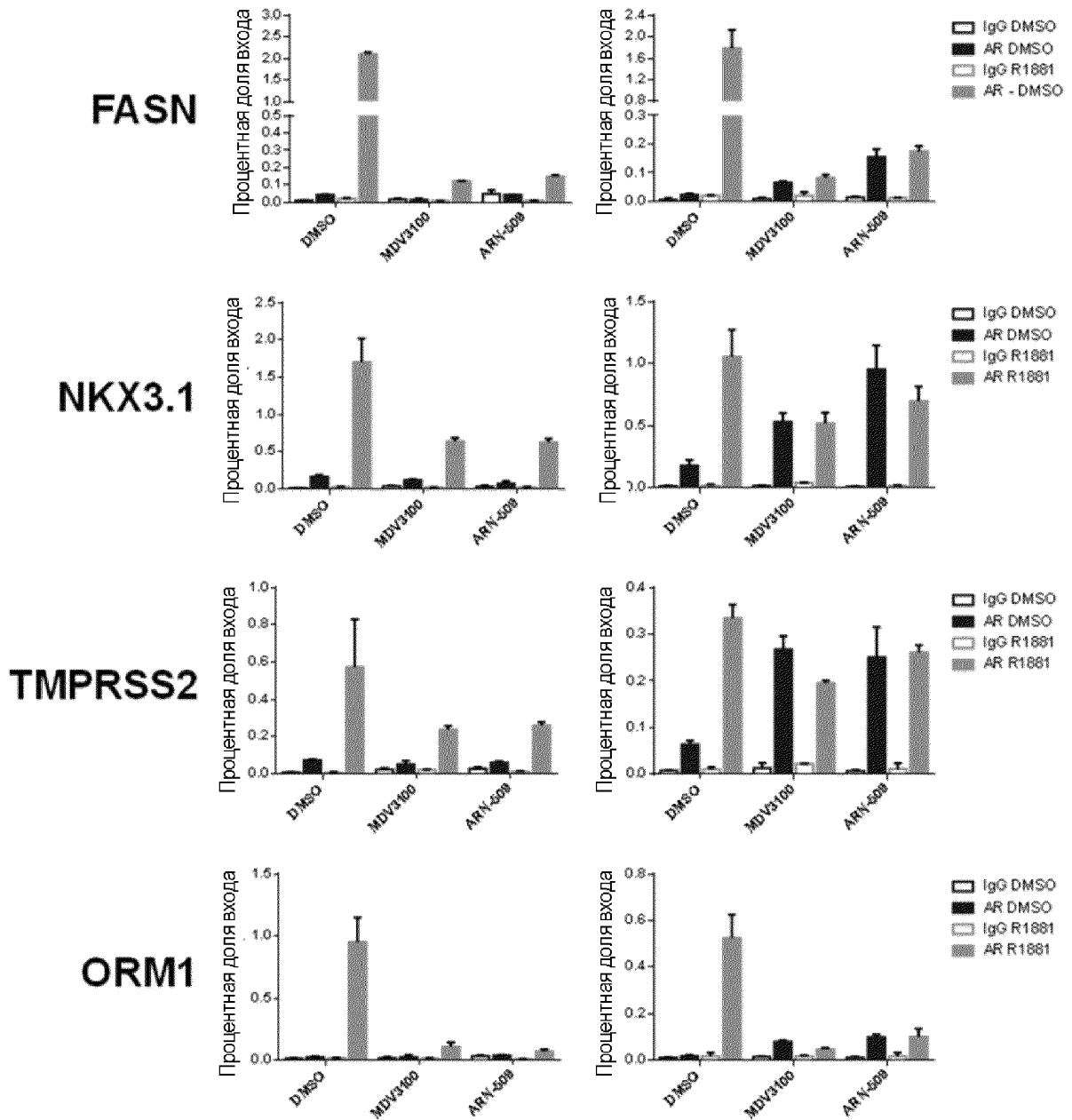
Фиг. 8



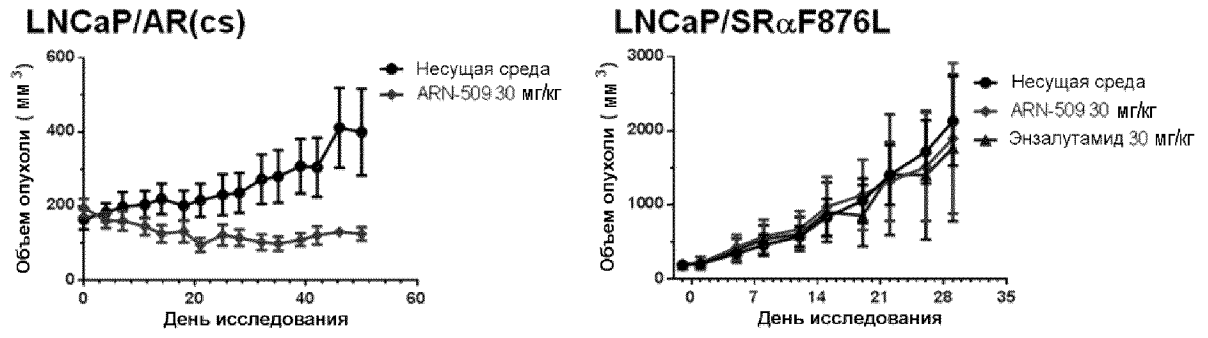
Фиг. 9



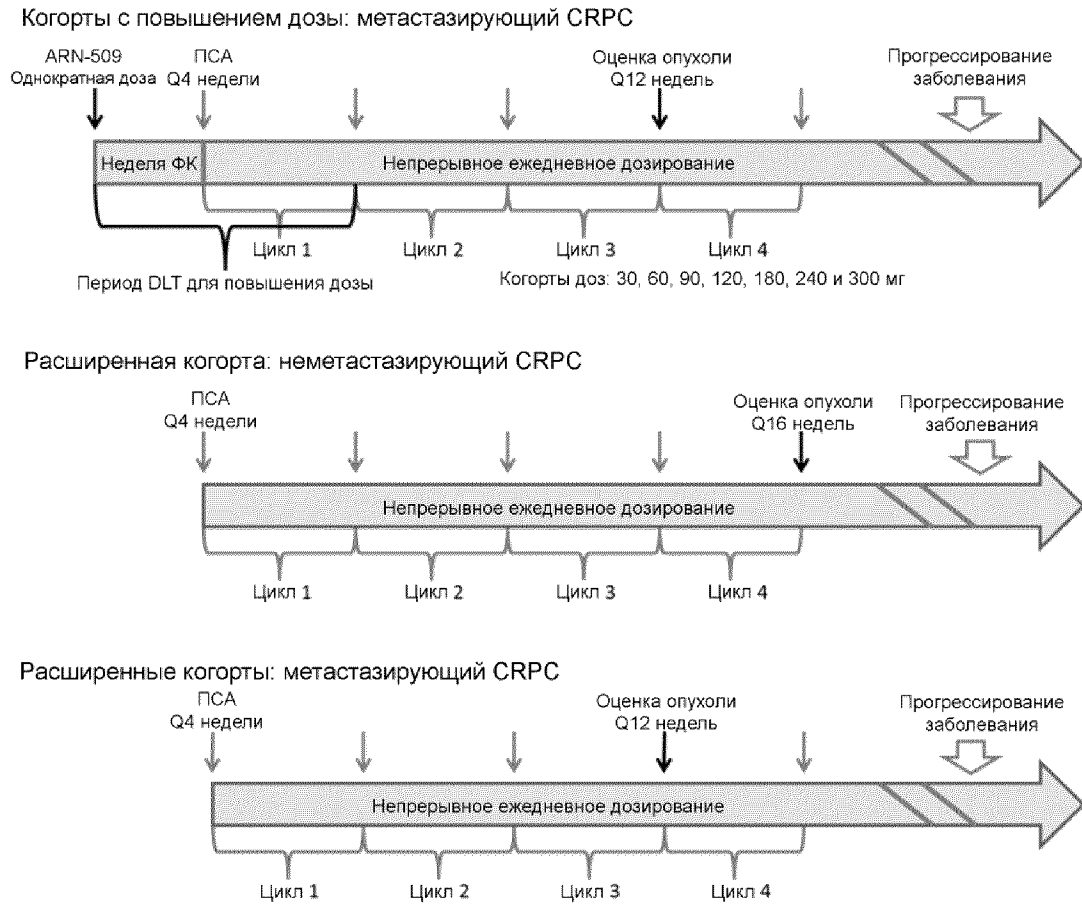
Фиг. 9 (продолжение)



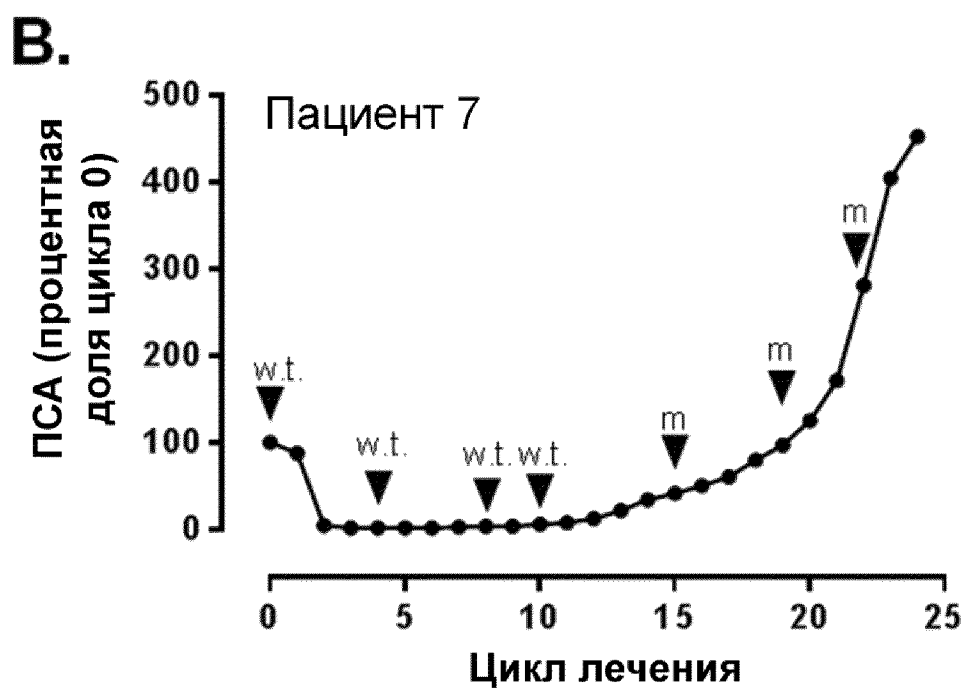
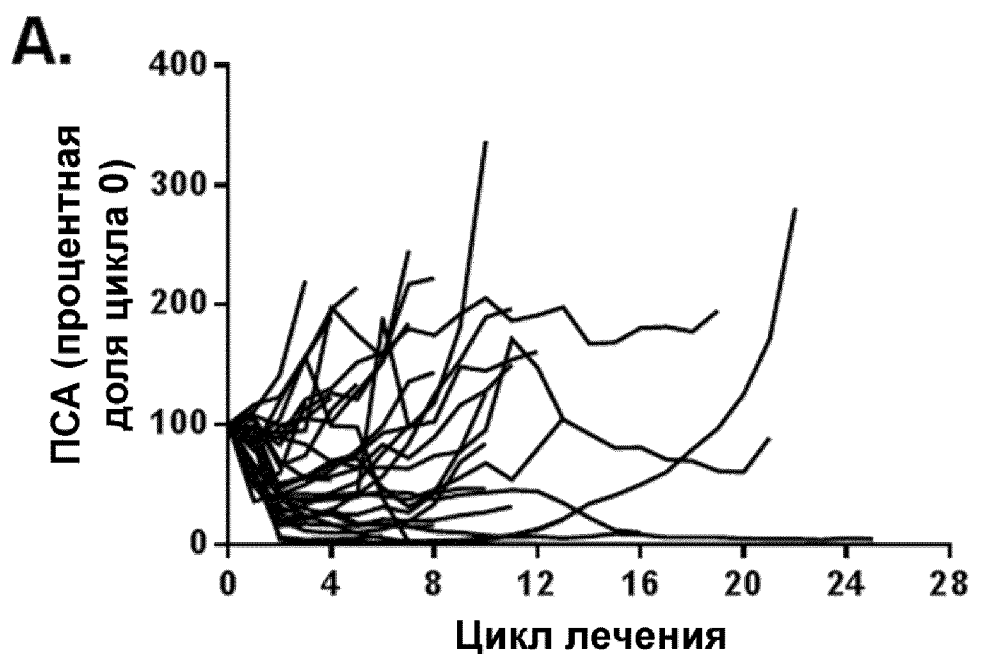
Фиг. 10



Фиг. 11

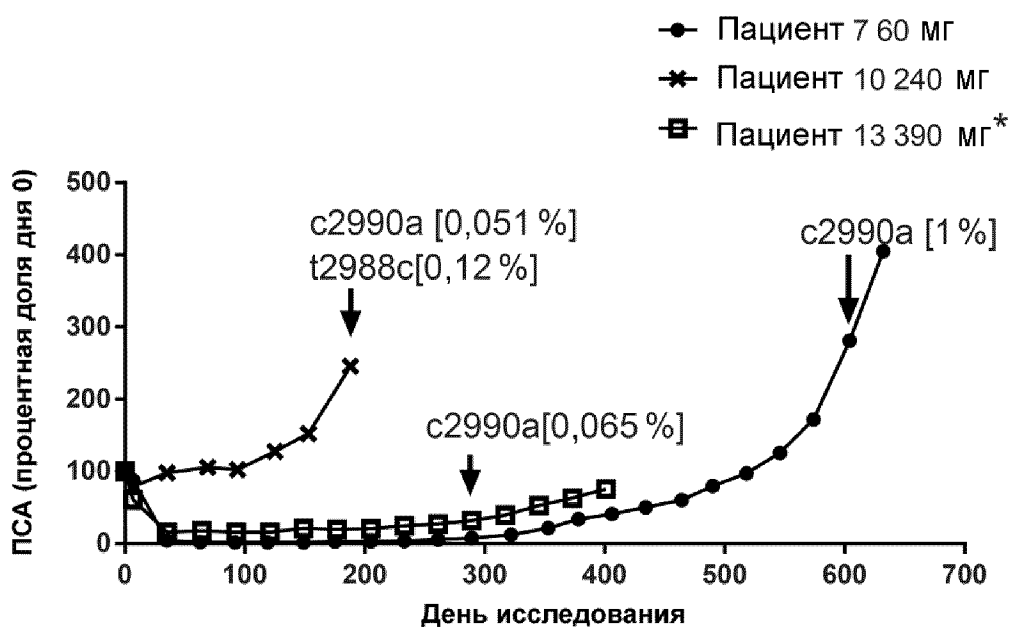


Фиг. 12





Фиг. 13



\* перевели на 240 мг после 2 циклов