(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202090782 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.07.31

(22) Дата подачи заявки
2013.07.26

(51) Int. Cl. ***C07K 14/72*** (2006.01)
A61P 35/00 (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) **201792520; 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 изобретении 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.

202090782 A1

202090782 A1

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) характеризации 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) характеризации 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 характеризации 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 - характеризации 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: (a) 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) характеризацию 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: (a) 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: (a) 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 α-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}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/SRαF876L 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. (A) Пролиферация клеток LNCaP/AR(cs) и LNCaP/SRαF876L. 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. (B) Пролиферация клеток LNCaP/AR(cs), LNCaP/SRαF876L 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 HepG2. 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/SRαF876L, 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/SRαF876L. 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 ± 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. (A) 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. (B) 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 ≥0,5 (число геномных эквивалентов в образце плазмы x доля гранул с мутантом = ≥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, превалирующими 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. Кодируемыми 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 α-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 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) аспартат 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 вариантные 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 осуществления 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, санитара, 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 5α-дигидротестостерон (5α-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-α-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 (TOK001) или абиратерона ацетат. В некоторых вариантах осуществления антагонист AR, который ингибирует продукцию андрогена и показывает связывание с AR, представляет собой TAK-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 (T) на цитозин (C), 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 (T) на цитозин (C) в позиции 2988 (первая позиция кодона, кодирующего фенилаланин, который кодируется в экзоне 8 гена AR) и мутацию с потерей смысла цитозина (C) на аланин (A) 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 неметилированными. 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 характеризации 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 характеризации 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 характеризации субъекта как не имеющего чувствительности к ингибитору AR, который представляет собой ингибитор CYP17A, такой как, например, галетерон (TOK001), TAK-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, c-myc, 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 (T) на цитозин (C) в первой позиции кодона, который кодирует F876 полипептида AR, и вторую мутацию с потерей смысла, которая содержит замену тимина (T) на аденозин (A) 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 TTT на CTA. В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой мутацию с потерей смысла, которая содержит замену тимина (T) на цитозин (C) в нуклеотидной позиции 2626, и вторую мутацию с потерей смысла, которая содержит замену тимина (T) на аденозин (A) 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 (T) на цитозин (C) в первой позиции кодона, который кодирует F876 полипептида AR, и вторую мутацию с потерей смысла, которая содержит замену тимина (T) 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 TTT на CTG. В некоторых вариантах осуществления модификация представляет собой мутацию с потерей смысла, которая содержит замену тимина (T) на цитозин (C) в нуклеотидной позиции 2626, и вторую 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 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 специфичного 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 специфичных 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 специфичных 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 специфичных 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 $F(ab')_2$, 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 аллельспецифичных 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 KABAT®, базы данных Los Alamos или базы данных Swiss Protein, по гомологии с нуклеотидной и аминокислотной последовательностями антитела-донора. В некоторых вариантах осуществления антитело человека, характеризуемое 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 (TOK001), TAK-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 (TOK001), TAK-700 или

абиратерона ацетат.

В некоторых вариантах осуществления предложены способы характеризации 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) характеризацию 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 характеризации 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) характеризацию 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 характеризации 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) характеризацию 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 (TOK001), TAK-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) характеризацию субъекта как кандидата на терапию антагонистом AR второго поколения при отсутствии у субъекта модификации. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает характеризацию 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) характеризацию субъекта как кандидата на терапию антагонистом AR первого поколения при отсутствии у субъекта модификации. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает характеризацию 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) характеризацию субъекта как кандидата на терапию антагонистом AR, который представляет собой ингибитор CYP17A, при отсутствии у субъекта модификации. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает характеризацию 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 (TOK001), TAK-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) характеризацию 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) характеризацию 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) характеризацию 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) характеризацию 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 (TOK001), TAK-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) характеризацию 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) характеризацию 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) характеризацию 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 (TOK001), TAK-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 (TOK001), TAK-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, центральноспинальную текучую среду, брюшинную текучую среду, панкреатическую текучую среду, цереброспинальную текучую среду, мозговую текучую среду, асцит, перикардиальную 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 (CTC). 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 ненекротические 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 (TOK001), TAK-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 наношариками ДНК, секвенирование HeliScope и секвенирование отдельных молекул в реальном времени (SMRT).

В некоторых вариантах осуществления образец представляет собой образец плазмы или сыворотки, содержащий ДНК (цоДНК), РНК (цоРНК) 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 компартментализации 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 (a) 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, Hastia 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 (a) 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, β-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), простазин, ген snail homolog 2 (SLUG), сериновую трансмембранную протеазу 2 (TMPRSS2), семейство шестых 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 CCAAT-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), простазин, ген snail homolog 2 (SLUG), сериновую трансмембранную протеазу 2 (TMPRSS2), семейство шестых 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 CCAAT-энхансер белок-δ, 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), плазмидах (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 соединение-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 соединение-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, проявляет минимальную модуляцию ГАМК-зависимого хлоридного канала. В некоторых вариантах осуществления соединение-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, проявляет минимальное связывание с ГАМК-зависимым хлоридным каналом. В некоторых вариантах осуществления соединение-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, имеет минимальный антагонизм к ГАМК-зависимому хлоридному каналу. В некоторых вариантах осуществления соединение-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 соединение-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, представляет собой модулятор AR с минимальным взаимодействием с $ГАМК_A$-зависимым хлоридным каналом. В некоторых вариантах осуществления соединение-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, представляет собой модулятор AR с минимальным взаимодействием с $ГАМК_A$-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 $GABA_A$ 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 соединение-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 (TOK001), TAK-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 (TOK001) рак предстательной железы. В некоторых вариантах осуществления рак предстательной железы представляет собой резистентный к TAK-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 соединение-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, вводят внутривенно.

В некоторых вариантах осуществления соединение-ингибитор AR третьего поколения, выявленное с применением предложенных в настоящем документе способов, вводят топически. В таких вариантах осуществления соединение-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 соединение-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 (TOK001), TAK-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 дня, 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). 1×10^6 клеток LNCaP-ARcs в смеси 50% бессывороточной RPMI и 50% Matrigel™ инжектировали 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 $мм^3$ (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 E-TPGS и 65% 0,5% вес/об. карбоксиметилцеллюлозы (CMC) в 20 мМ цитратном буфере (pH 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 $мм^3$, 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 $см^2$ 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 $см^2$. 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 $3{,}16\times10^{-5}$ M до $3{,}18\times10^{-10}$ M, тогда как для синтетического андрогена метилтриенолона (R1881) анализ проводили при конечной концентрации в диапазоне от $3{,}16\times10^{-8}$ M до $3{,}18\times10^{-13}$ M. 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×([RLU образца-RLU среды без клеток]/[RLU обработанных 1881 клеток-RLU среды без клеток]) (таблица 1A). Для анализа в режиме антагониста процентную долю жизнеспособности образцов рассчитывали следующим образом: %

жизнеспособности = 100×([RLU образца-RLU день 0]/[RLU обработанных R1881 клеток - RLU 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 Pb-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 люциферазного буфера (20 мМ трицин, 0,1 мМ ЭДТА, 1,07 мМ $(MgCo_3)_4$ $Mg(OH)_2 \cdot 5H_2O$, 2,67 мМ $MgSO_4$, 33,3 мМ DTT, 270 мкМ кофермента А,

470 мкМ люциферина, 530 мкМ АТФ). Люциферазу *Renilla* измеряли после добавления 40 мкл коэлентеразинового буфера (1,1 М NaCl, 2,2 мМ Na_2ЭДТА, 0,22 М K_xPO_4 (pH 5,1), 0,44 мг/мл БСА, 1,3 мМ NaN_3, 1,43 мкМ коэлентеразина, 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 pGL4 Pb-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 2A

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 2B

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 (ПСА, SLUG, TMPRSS2, STEAP4, FKBP5, ORM1, NOV, FASN, NKX3.1, AMIGO2, BDNF,

CAMK2N1, HPGD, NCAPD3, PLD1) нормировали на экспрессию GAPDH и выражали относительно обработанных несущей средой родительских клеточных линий. Результаты по относительной экспрессии представлены в таблице 3A. Использованные для ПЦР праймеры приведены в таблице 3B.

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 выраженно (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 3A

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

		ПСА	SLUG	TMPRSS2	STEAP4	FKBP5	ORM1	NOV
LNCaP	ДМСО	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	R1881	++	+++	++	++++	++	+++	--
	Бикалутамид	+	+	+	+	+	-	+
	MDV3100	+	+	+	-	+	+	+
LNCaP/ AR(cs)	ДМСО	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	R1881	+++	+++	++	++++	++	++++	--
	Бикалутамид	++	+	+	++	+	+++	+
	MDV3100	+	+	+	+	+	+	+
Класс 1	ДМСО	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	R1881	++	+++	+	++++	+++	++++	--
	Бикалутамид	+	+++	+	+++	++	++	+
	MDV3100	+	+	+	+	+	+	+
Класс 2	ДМСО	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 3B

Последовательность олигонуклеотидов для проведения ПЦР в реальном времени для транскрипционного анализа

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

TMPRSS2	TAGTGAAACCAGTGTGTCTGCCCA (SEQ ID NO: 44)	AGCGTTCAGCACTTCTGAGGTCTT (SEQ ID NO: 45)
FASN	CGCTCTGGTTCATCTGCTCTG (SEQ ID NO: 46)	TCATCAAAGGTGCTCTCGTCTG (SEQ ID NO: 47)
NKX3.1	TGGAGAGGAAGTTCAGCCATCAGA (SEQ ID NO: 48)	AGGAGAGCTGCTTTCGCTTAGTCT (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 4A и 4B.

Таблица 4A

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

	LNCaP				LNCaP/AR(cs)				LNCaP ARN-509r1			
Ген	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
ПСА	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
ПСА	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 4B

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

	LNCaP/AR-Luc				LNCaP/AR-Luc ENZr2			
Ген	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
ПСА	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 мМ Tris, 150 мМ NaCl, 1% (об/об) NP-40, 0,5% дезоксихолата, 0,1% SDS, 5 мМ 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 бикалутамид 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 (T) на цитозин (C), 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 17α-OH 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 Pb-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 люциферазного буфера (20 мМ трицин, 0,1 мМ ЭДТА, 1,07 мМ $(MgCo_3)_4$ $Mg(OH)_2 \cdot 5H_2O$, 2,67 мМ $MgSO_4$, 33,3 мМ DTT, 270 мкМ кофермента А, 470 мкМ люциферина, 530 мкМ АТФ). Люциферазу *Renilla* измеряли после добавления 40 мкл коэлентеразинового буфера (1,1 М NaCl, 2,2 мМ Na_2ЭДТА, 0,22 М K_xPO_4 (pH 5,1), 0,44 мг/мл БСА, 1,3 мМ NaN_3, 1,43 мкМ коэлентеразина, конечная pH 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 Pb-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 (энзалутамид)	ARN509
AR дикого 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. 4A). И наоборот, антиандрогены первого поколения бикалутамид, нилутамид и гидроксифлутамид проявляли минимальную активность в качестве агониста на мутанте F876L (таблица 6, Фиг. 4) (Emax = 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

	Анализ репортера 4X ARE			
Соединение	Дикий тип, IC_{50} (□M)	Дикий тип, Emax	F876L IC_{50} (□M)	F876L Emax
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 конструкты 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 пМ 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) (Emax = 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

	AR-VP16			
Соединение	Дикий тип, IC_{50} (□M)	Дикий тип, Emax	F876L IC_{50} (□M)	F876L Emax
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 SRαF876L. Выделяли индивидуальные клоны LNCaP/pCDNA-F876L с последующей селекцией в 400 мкг/мл гентамицина. Проводили селекцию пулов клеток LNCaP/SRαF876L 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. Ki рассчитывали как Ki=IC50/(1+([^{3}H-R1881]/Kd)), [^{3}H-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) (Kd 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, дикий тип, K_i (нМ)	Связывание AR, F876L, K_i (нМ)
ARN-509	18,07±7,46	0,68±0,15
Энзалутамид	26,30±12,77	0,60±0,17
Бикалутамид	26,56±12,51	360,36±283,85
Гидроксифлутамид	14,56±8,25	150,57±55,10
Нилутамид	17,74±5,65	197,42±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/SRαF876L 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/SRαF876L 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 SRαF876L 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 SRαF876L 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. 7A, таблица 9A). Оба антагониста блокировали индуцируемую R1881 транскрипцию и

пролиферацию до уровней, соответствующих их активности в качестве агонистов при наивысшей концентрации (Фиг. 7B, таблица 9B). 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. 7A и 7B, таблицы 9C-F).

Таблица 9A

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
ПСА	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

Таблица 9B

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
ПСА	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

Таблица 9C

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
ПСА	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

Таблица 9D

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
ПСА	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

Таблица 9E

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
ПСА	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

Таблица 9F

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
ПСА	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 SRαF876L высевали в чашки 150 мм (7×10^6

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°С 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
ПСА E2	ACCTGCTCAGCCTTTGTCTCTGAT (SEQ ID NO: 50)	AGATCCAGGCTTGCTTACTGTCCT (SEQ ID NO: 51)
ПСА D1	ATTCTGGGTTGGGAGTGCAAGGAA (SEQ ID NO: 52)	AGGAGACATGCCCAGGATGAAACA (SEQ ID NO: 53)
STEAP4	ACTAGGCAGGACATTGACATCCCA (SEQ ID NO: 54)	ACAGTAAACCTCTCCACACATGGC (SEQ ID NO: 55)
FASN	TATGACACCCAGGGCTTTCGTTCA (SEQ ID NO: 56)	TAACGTTCCCTGCGCGTTTACAGA (SEQ ID NO: 57)
TMPRSS2	TCCCAAATCCTGACCCCA (SEQ ID NO: 58)	ACCACACAGCCCCTAGGAGA (SEQ ID NO: 59)
NKX3.1	ACAGGGTGGCCCAAATAGAAC (SEQ ID NO: 60)	CCTGTCTTGGACAAGCGGAGA (SEQ ID NO: 61)
ORM1	GGGTCATTTCCACCACCTCAAACA (SEQ ID NO: 62)	GGAGAAAGGCCTTACAGTAGTCTC (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/SRαF876L. 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/SRαF876L (как описано выше) суспендировали в 50% RPMI, 50% Matrigel (BD Biosciences) и вводили путем инъекции 3×10^6 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 $мм^3$) 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/SRαF876L (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/SRαF876L

Соединение	**Доза**	**C_{24} (мкг/мл)**	**$T_{1/2}$ (час)**	**$ППК_{0-24}$ (мкг·час/мл)**	**C_{max} (мкг/мл)**	**T_{max} (час)**
Энзалутамид	30 мг/кг	9,14	9,9	527,3	33,5	1,0
ARN-509	30 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 PIKC3a 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 повышениями 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 неметастазирующим CRPC (50 пациентов с неметастазирующим 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 неметастазирующим 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 неметастазирующим 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

Позиция нуклеотида	Замена нуклеотида	Позиция аминокислоты	Замена аминокислоты
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 ≥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 низшей 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 Т0). 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 c2628a. 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 [Процентная доля от значения в день 0]**	**Классификация генотипа**	**Частота мутанта [мутантные гранулы/гранулы 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 ПСА на неделе 12	Анализ BEAMing Цикл лечения*	ПСА на момент проведения анализа BEAMing [Процентная доля от базового уровня]	Классификация генотипа на базовом уровне#	Классификация генотипа в процессе 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 Cignal 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.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение антагониста андрогенного рецептора (AR) первого или второго поколения при производстве лекарственного средства для лечения рака у субъекта, нуждающегося в таком лечении, где указанное лечение представляет собой поддерживающую терапию, которая включает:

(a) введение субъекту терапевтически эффективной дозы антагониста андрогенного рецептора (AR) первого или второго поколения в качестве элемента схемы поддерживающей терапии;

(b) проведение контроля субъекта при одном или более заданных интервалов времени в течение курса схемы поддерживающей терапии, чтобы определить, имеется ли у субъекта мутация в эндогенном гене, кодирующем AR, которая приводит к модификации в аминокислотной позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, где модификация представляет собой F876L; и

(c) продолжение введения антагониста андрогенного рецептора (AR) первого или второго поколения при выявлении у субъекта мутации F876L.

2. Применение антагониста андрогенного рецептора (AR) первого или второго поколения при производстве лекарственного средства для лечения рака у субъекта, нуждающегося в таком лечении, где указанное лечение представляет собой поддерживающую терапию, которая включает:

(a) введение субъекту терапевтически эффективной дозы антагониста андрогенного рецептора (AR) первого или второго поколения в качестве элемента схемы поддерживающей терапии;

(b) проведение контроля субъекта при одном или более заданных интервалов времени в течение курса схемы поддерживающей терапии, чтобы определить, имеется ли у субъекта мутация в эндогенном гене, кодирующем AR, которая приводит к модификации в аминокислотной позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, где модификация представляет собой F876L; и

(c) прекращение введения антагониста андрогенного рецептора (AR) первого или второго поколения при выявлении у субъекта мутации F876L.

3. Применение по п. 1 или 2, где проведение контроля включает тестирование образца, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептид AR, от субъекта, чтобы

определить, имеет ли кодированный полипептид AR модификацию F876L.

4. Применение по любому из предыдущих пунктов, где в качестве элемента схемы поддерживающей терапии вводят антагонист андрогенного рецептора (AR) третьего поколения, если субъект имеет модификацию F876L.

5. Применение по любому из пунктов 1-4, где антагонист андрогенного рецептора (AR) первого или второго поколения ингибирует полипептид AR дикого типа за счет конкурентного антагонизма.

6. Применение по п. 4 или 5, где антагонист андрогенного рецептора (AR) третьего поколения ингибирует полипептид AR дикого типа за счет конкурентного антагонизма.

7. Применение по любому из пунктов 1-6, где антагонист андрогенного рецептора (AR) первого поколения выбирают из бикалутамида, флутамида, гидроксифлутамида или нилутамида.

8. Применение по любому из пунктов 1-6, где антагонист андрогенного рецептора (AR) второго поколения выбирают среди ARN-509, энзалутамида (MDV3100) и RD162.

9. Применение по любому из пунктов 1-8, где рак представляет собой рак предстательной железы, рак молочной железы, рак мочевого пузыря или гепатоцеллюлярный рак.

10. Применение по п. 9, где рак представляет собой рак предстательной железы.

11. Применение по п. 10, где рак представляет собой кастрационно-резистентный рак предстательной железы.

12. Применение по любому из пунктов 1-11, где субъект имеет солидная опухоль.

13. Применение по любому из пунктов 1-12, где 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.

14. Применение по любому из пунктов 3-13, где нуклеиновая кислота представляет собой РНК или ДНК.

15. Применение по п. 14, где ДНК представляют собой геномнуюДНК.

16. Применение по любому из пунктов 3-14, где тестирование дополнительно включате выделение мРНК из образца РНК.

17. Применение по любому из пунктов 3-16, где тестирование включает амплификацию нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную позицию 876 полипептида AR.

18. Применение по п. 17, где амплификацию проводят с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

19. Применение по п. 18, где ПЦР-амплификация включает применение пары олигонуклеотидных праймеров, которые фланкируют область, кодирующую аминокислотную позицию 876 полипептида AR.

20. Применение по любому из пунктов 17-19, дополнительно включающее секвенирование амплифицированной нуклеиновой кислоты.

21. Применение по любому из пунктов 3-20, где тестирование включает приведение нуклеиновой кислоты в контакт со специфичным к последовательности нуклеиновой кислоты зондом, причем специфичный к последовательности нуклеиновой кислоты зонд:

(a) 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 аимнокислотном положении 876.

22. Применение по любому из пунктов 3-21, где образец представляет собой образец клеток опухоли субъекта.

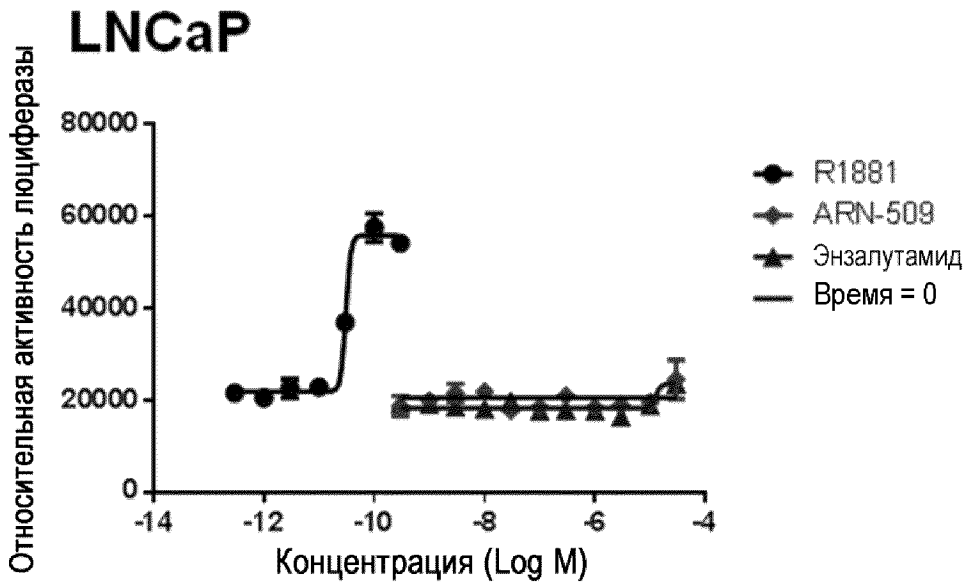
23. Применение по любому из пунктов 3-22, где образец представляет собой образец биопсии опухоли, образец крови, образец сыворотки, образец лимфы или образец аспирата костного мозга.

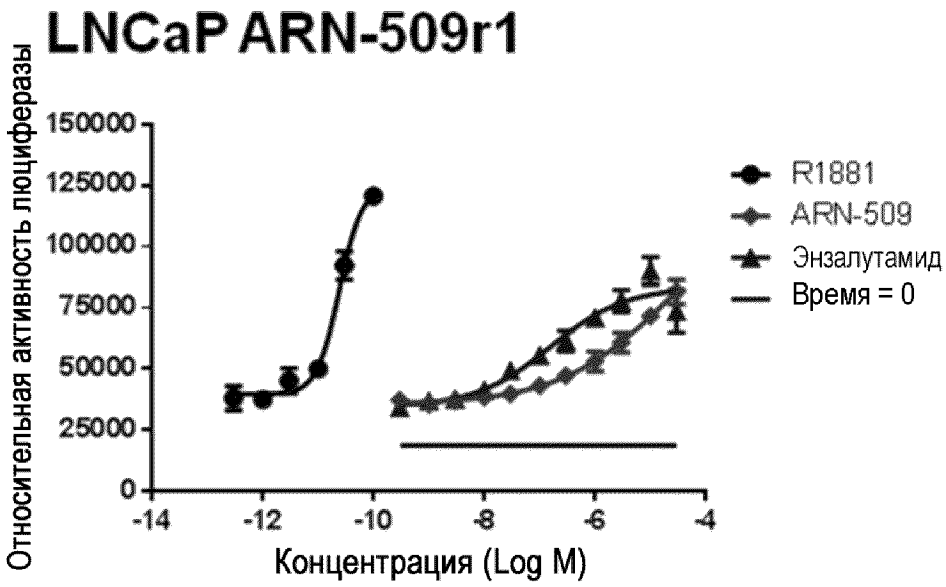
24. Применение по п. 22 или 23, где образец содержит циркулирующие опухолевые клетки (CTC) или клетки диссеминированной опухоли (DTC).

25. Применение антагониста андрогенного рецептора (AR) первого или второго поколения при производстве лекарственного средства для лечения рака у субъекта, у которого известно, что у него имеется мутация в эндогенном гене, кодирующем AR, которая приводит к модификации в аминокислотной позиции, соответствующей аминокислотной позиции 876 аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 1, где модификация представляет собой F876L.

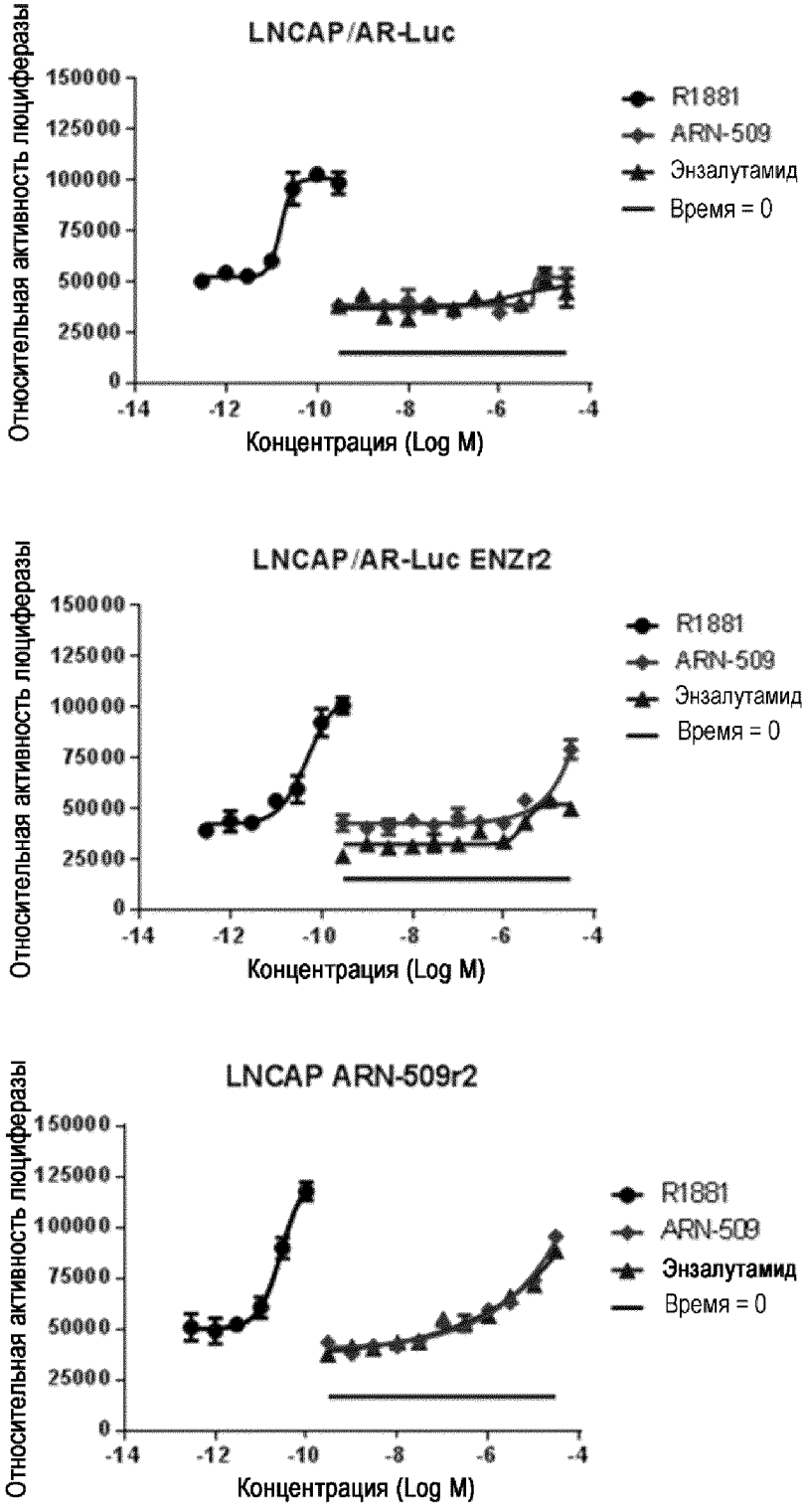
По доверенности

Фиг. 1A

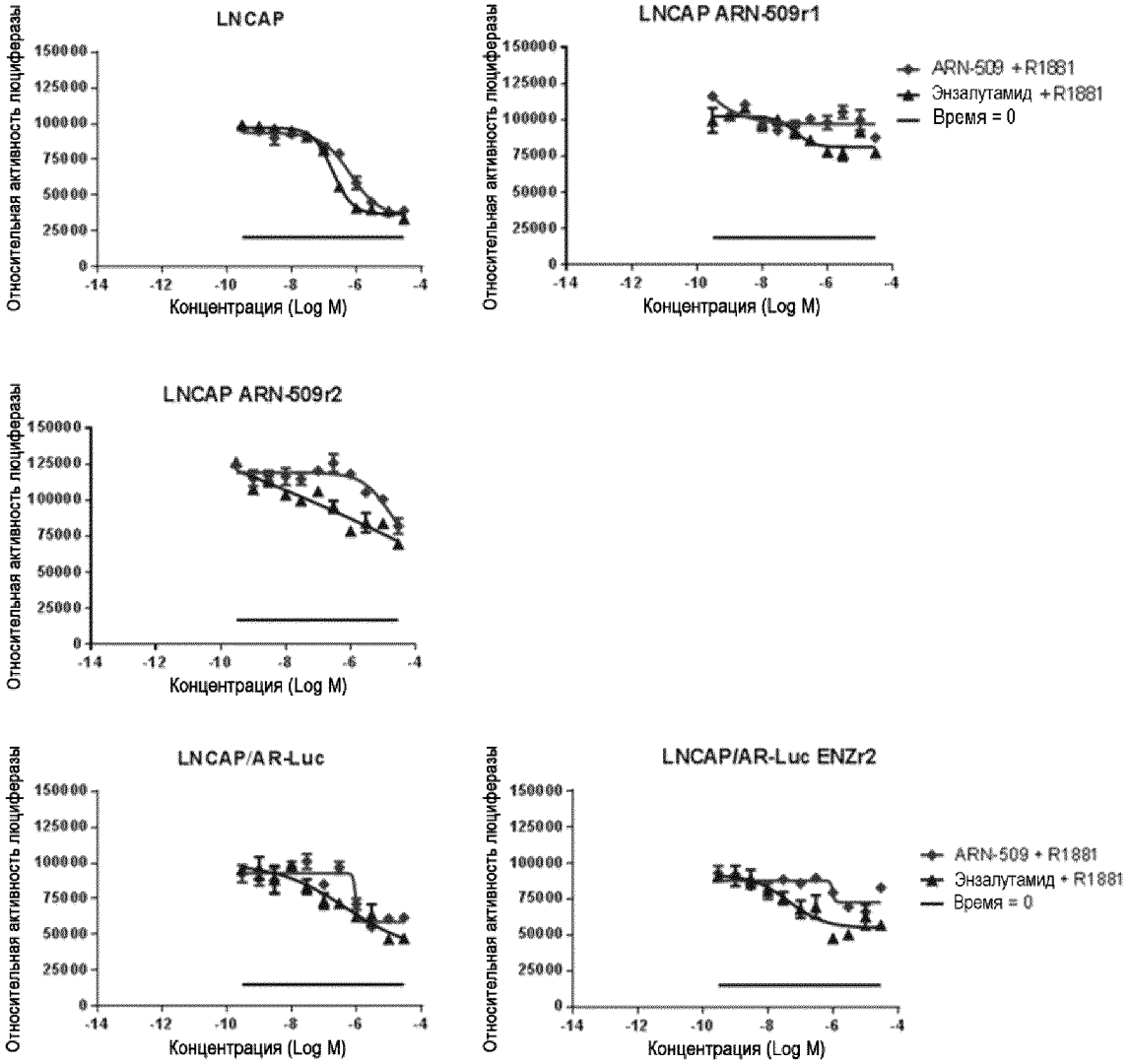

LNCaP
Относительная активность люциферазы
80000
60000
40000
20000
0
-14
-12
-10
-8
-6
-4
Концентрация (Log M)
R1881
ARN-509
Энзалутамид
Время = 0


LNCaP ARN-509r1
Относительная активность люциферазы
150000
125000
100000
75000
50000
25000
0
-14
-12
-10
-8
-6
-4
Концентрация (Log M)
R1881
ARN-509
Энзалутамид
Время = 0

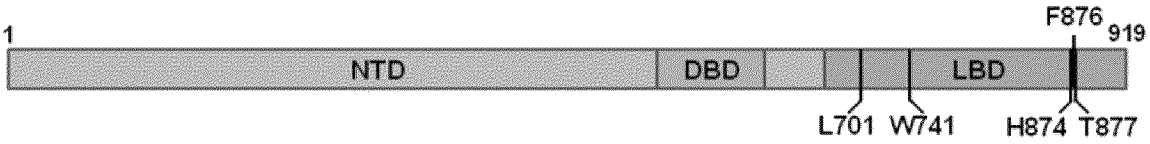
Фиг. 1B


LNCAP/AR-Luc
Относительная активность люциферазы
150000
125000
100000
75000
50000
25000
0
-14
-12
-10
-8
-6
-4
Концентрация (Log M)
R1881
ARN-509
Энзалутамид
Время = 0
LNCAP/AR-Luc ENZr2
Относительная активность люциферазы
150000
125000
100000
75000
50000
25000
0
-14
-12
-10
-8
-6
-4
Концентрация (Log M)
R1881
ARN-509
Энзалутамид
Время = 0
LNCAP ARN-509r2
Относительная активность люциферазы
150000
125000
100000
75000
50000
25000
0
-14
-12
-10
-8
-6
-4
Концентрация (Log M)
R1881
ARN-509
Энзалутамид
Время = 0

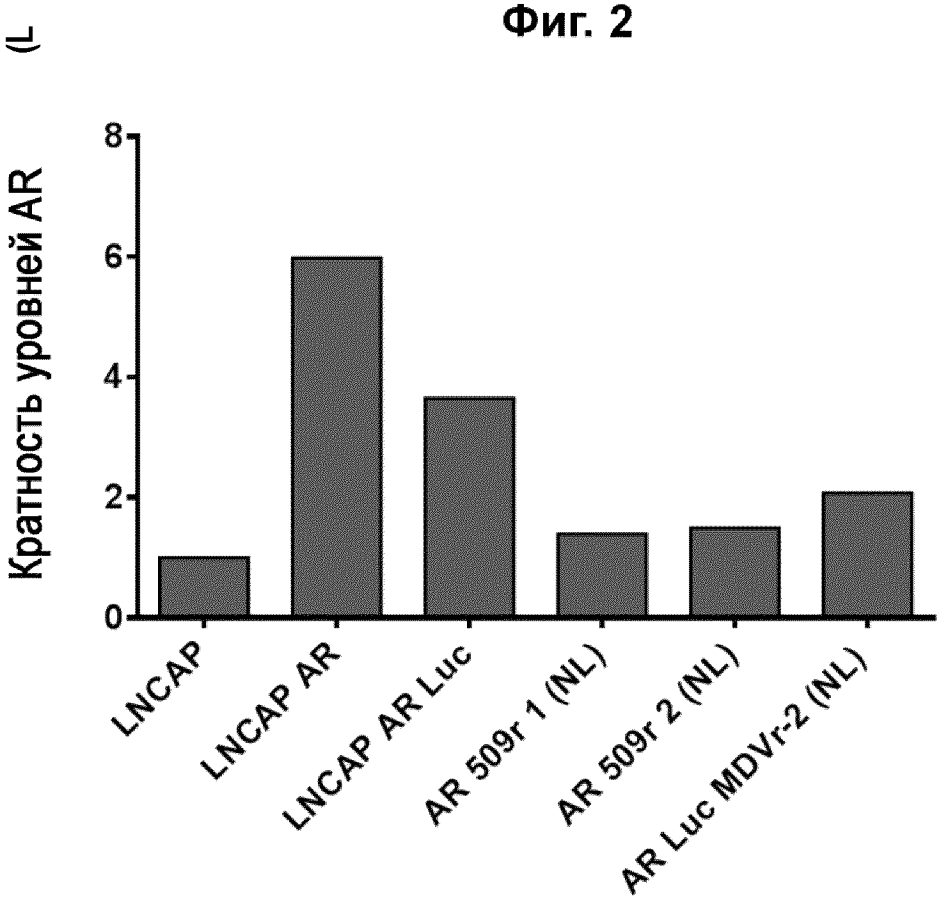
Фиг. 1C


LNCAP
LNCAP ARN-509r1
LNCAP ARN-509r2
LNCAP/AR-Luc
LNCAP/AR-Luc ENZr2
Относительная активность люциферазы
Концентрация (Log M)
ARN-509 + R1881
Энзалутамид + R1881
Время = 0

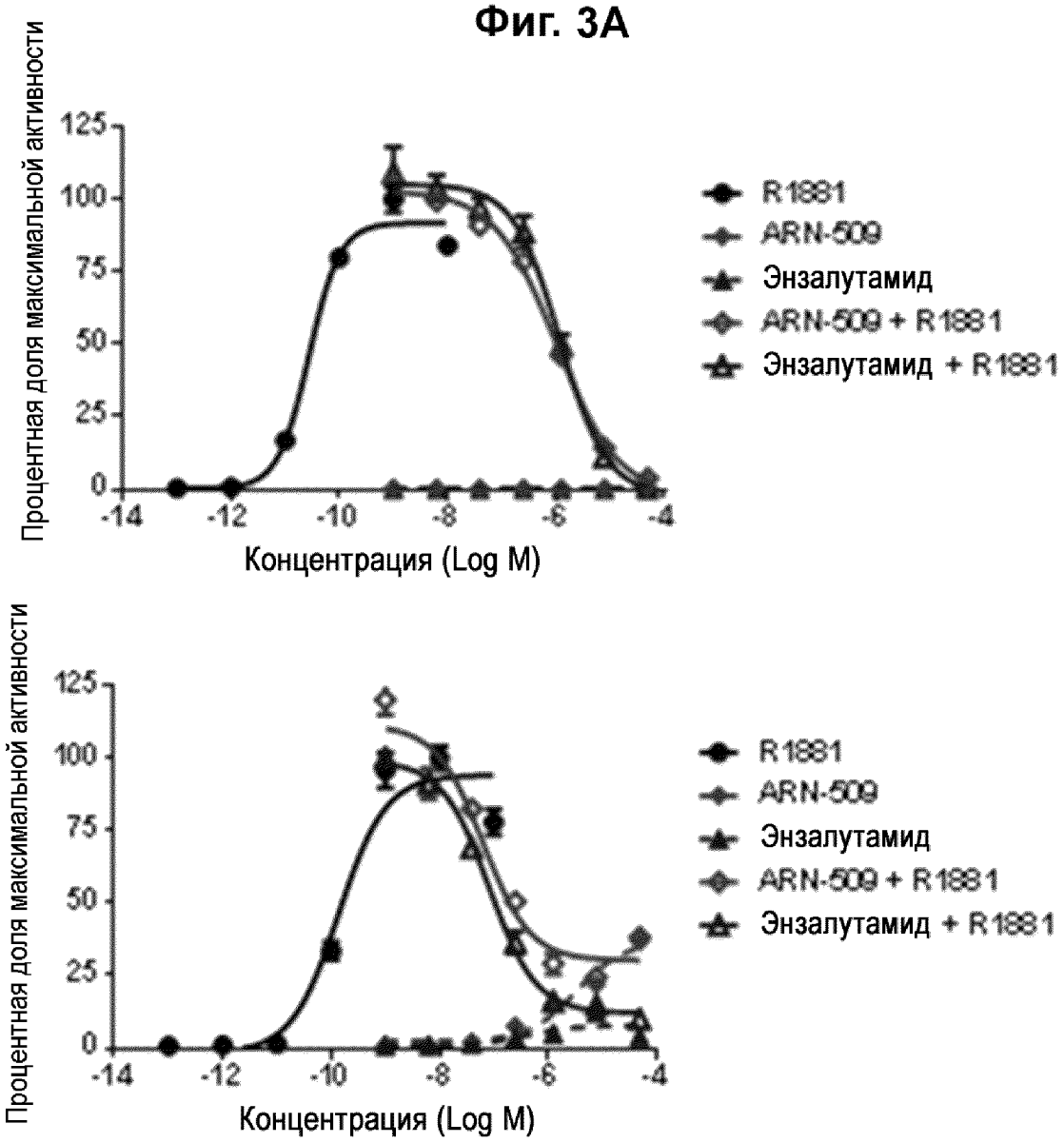
Фиг. 1D



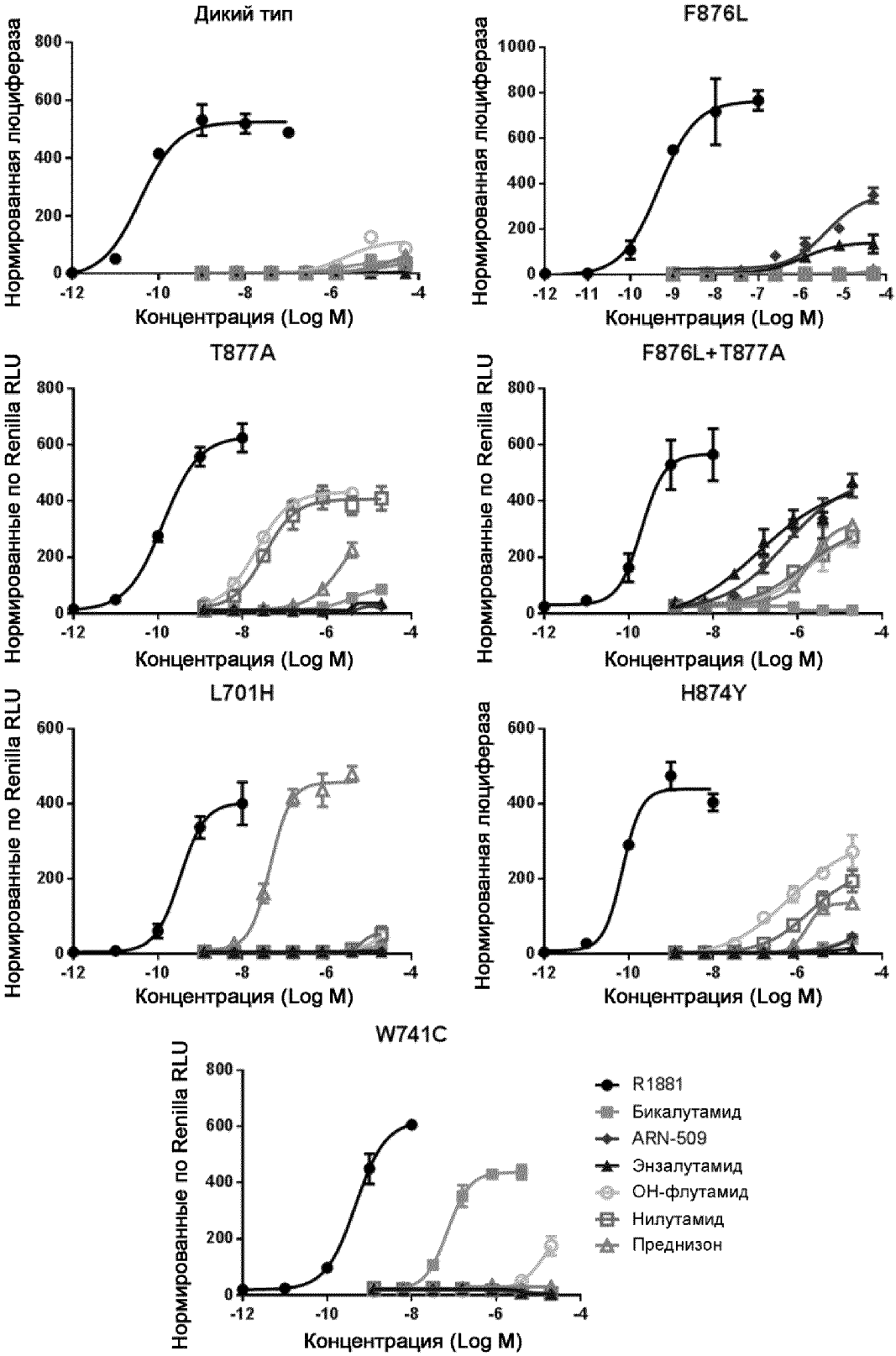
Фиг. 2


(L
Кратность уровней AR
8
6
4
2
0
LNCAP
LNCAP AR
LNCAP AR Luc
AR 509r 1 (NL)
AR 509r 2 (NL)
AR Luc MDVr-2 (NL)

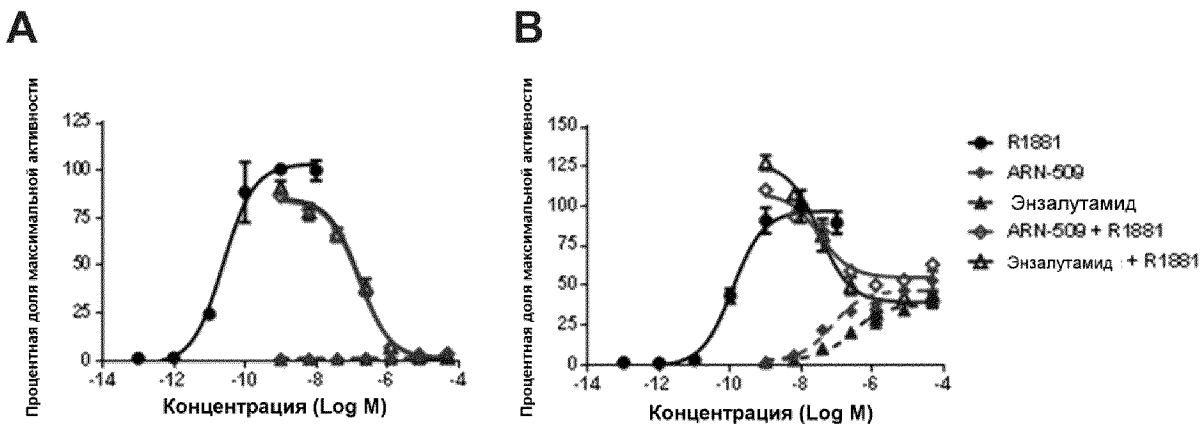
Фиг. 3А


Процентная доля максимальной активности
125
100
75
50
25
0
-14
-12
-10
-8
-6
-4
Концентрация (Log M)
R1881
ARN-509
Энзалутамид
ARN-509 + R1881
Энзалутамид + R1881
Процентная доля максимальной активности
125
100
75
50
25
0
-14
-12
-10
-8
-6
-4
Концентрация (Log M)
R1881
ARN-509
Энзалутамид
ARN-509 + R1881
Энзалутамид + R1881

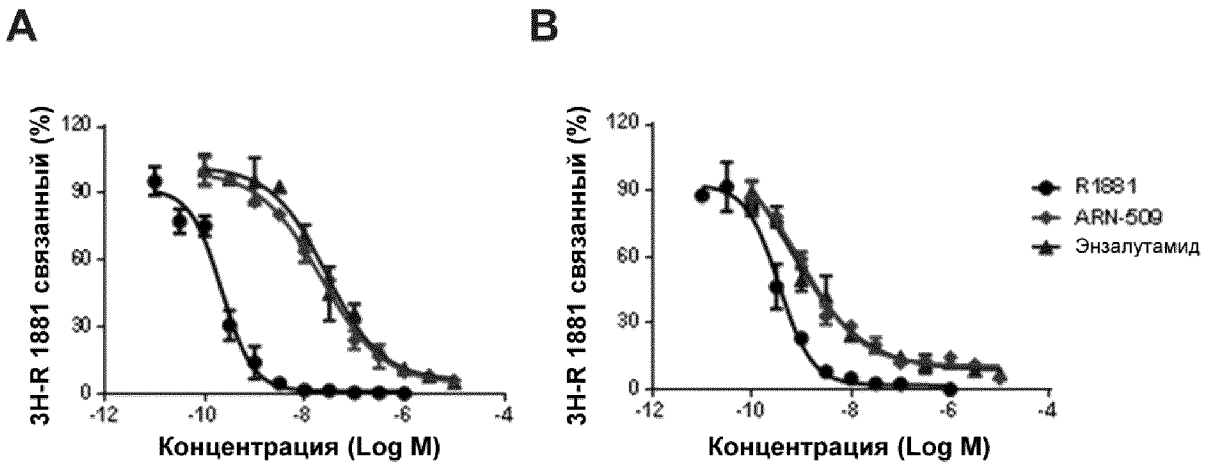
Фиг. 3B


Дикий тип
F876L
T877A
F876L+T877A
L701H
H874Y
W741C
Нормированная люцифераза
Нормированные по Renilla RLU
Концентрация (Log M)
R1881
Бикалутамид
ARN-509
Энзалутамид
OH-флутамид
Нилутамид
Преднизон

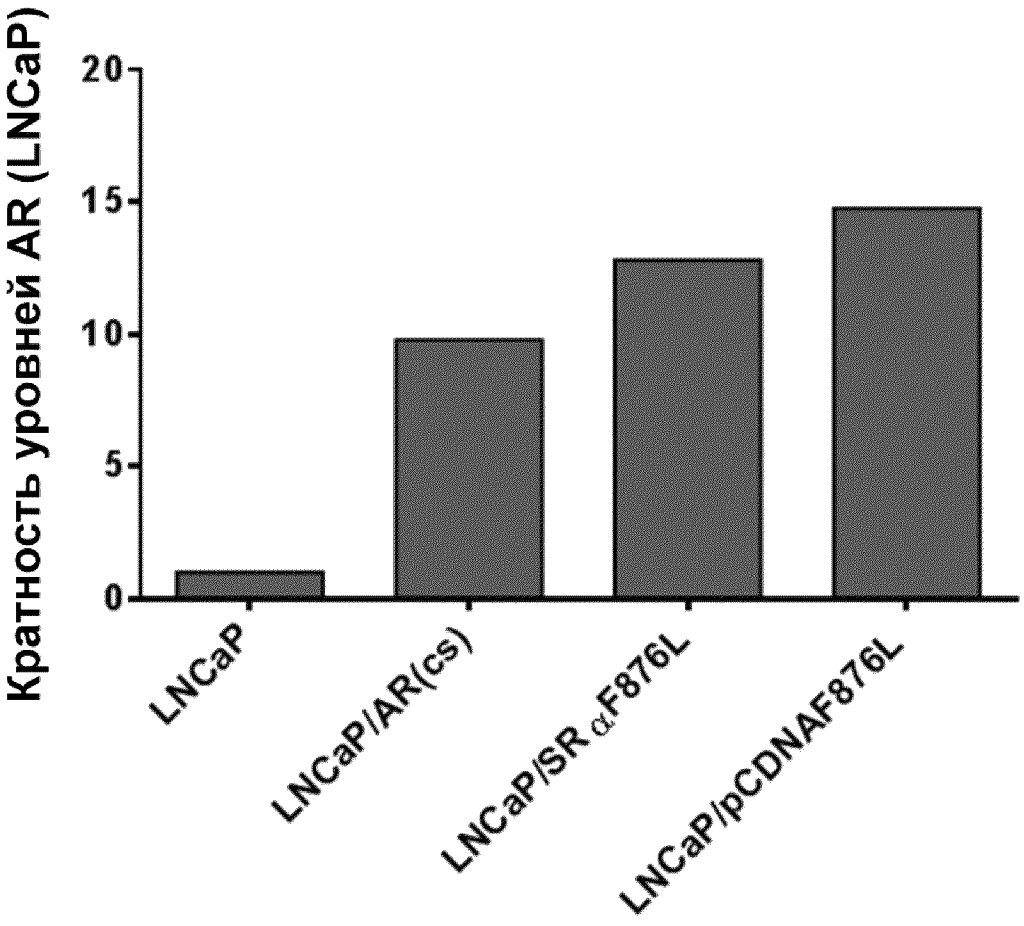
Фиг. 4


A
B
Процентная доля максимальной активности
125
100
75
50
25
0
-14
-12
-10
-8
-6
-4
Концентрация (Log M)
150
R1881
ARN-509
Энзалутамид
ARN-509 + R1881
Энзалутамид + R1881

Фиг. 5

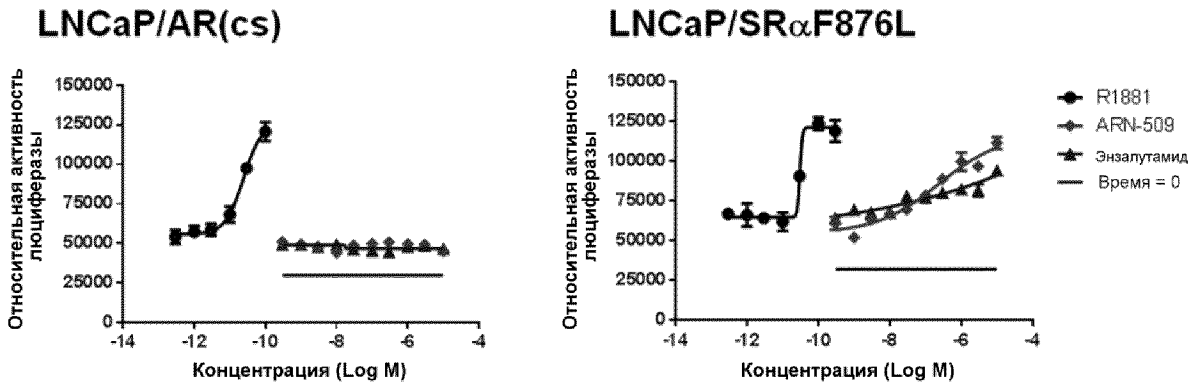

A
B
3H-R 1881 связанный (%)
120
90
60
30
0
-12
-10
-8
-6
-4
Концентрация (Log M)
R1881
ARN-509
Энзалутамид

Фиг. 6

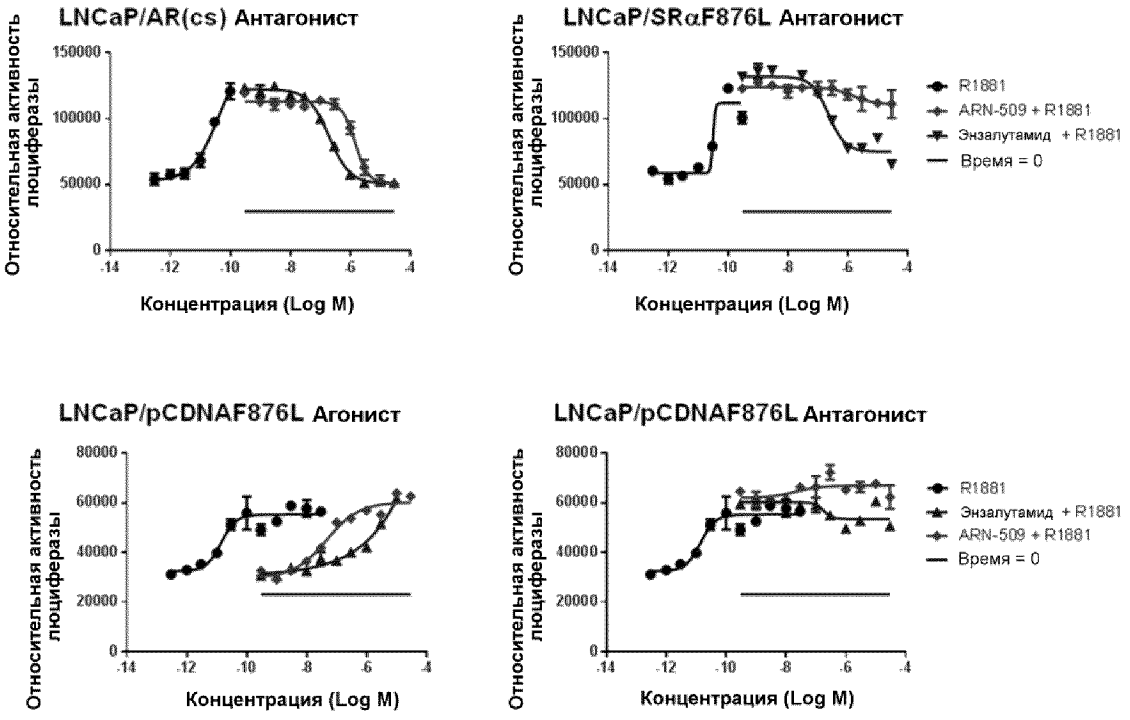

Кратность уровней AR (LNCaP)
20
15
10
5
0
LNCaP
LNCaP/AR(cs)
LNCaP/SR αF876L
LNCaP/pCDNAF876L

Фиг. 7

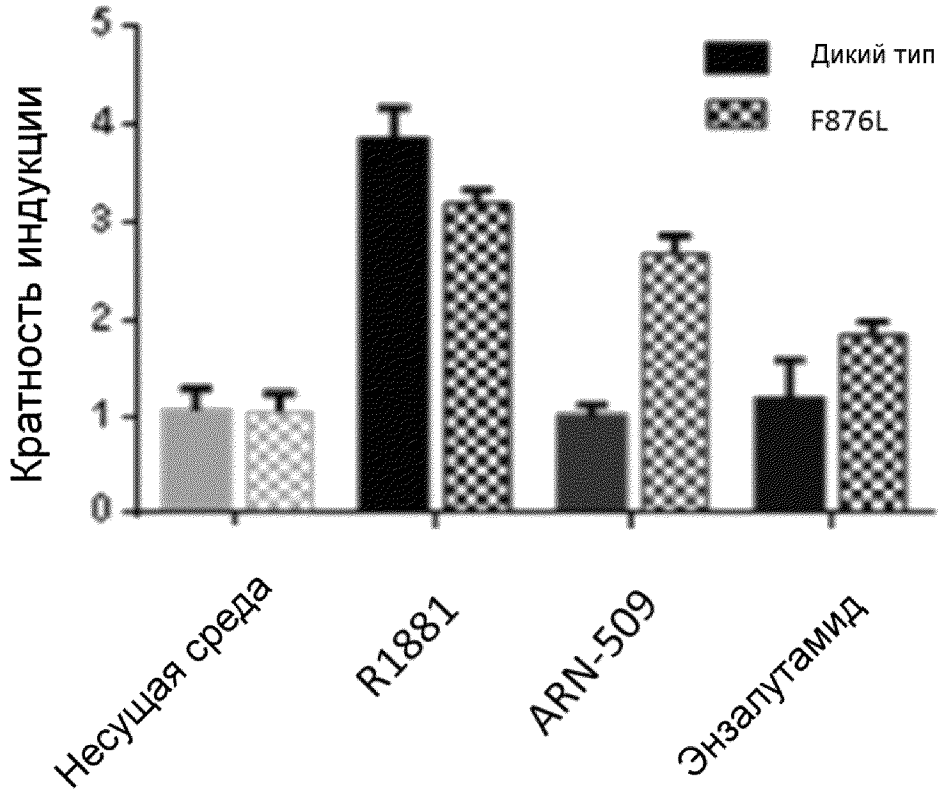
A


LNCaP/AR(cs)
LNCaP/SRαF876L
Относительная активность люциферазы
150000
125000
100000
75000
50000
25000
0
-14
-12
-10
-8
-6
-4
Концентрация (Log M)
R1881
ARN-509
Энзалутамид
Время = 0

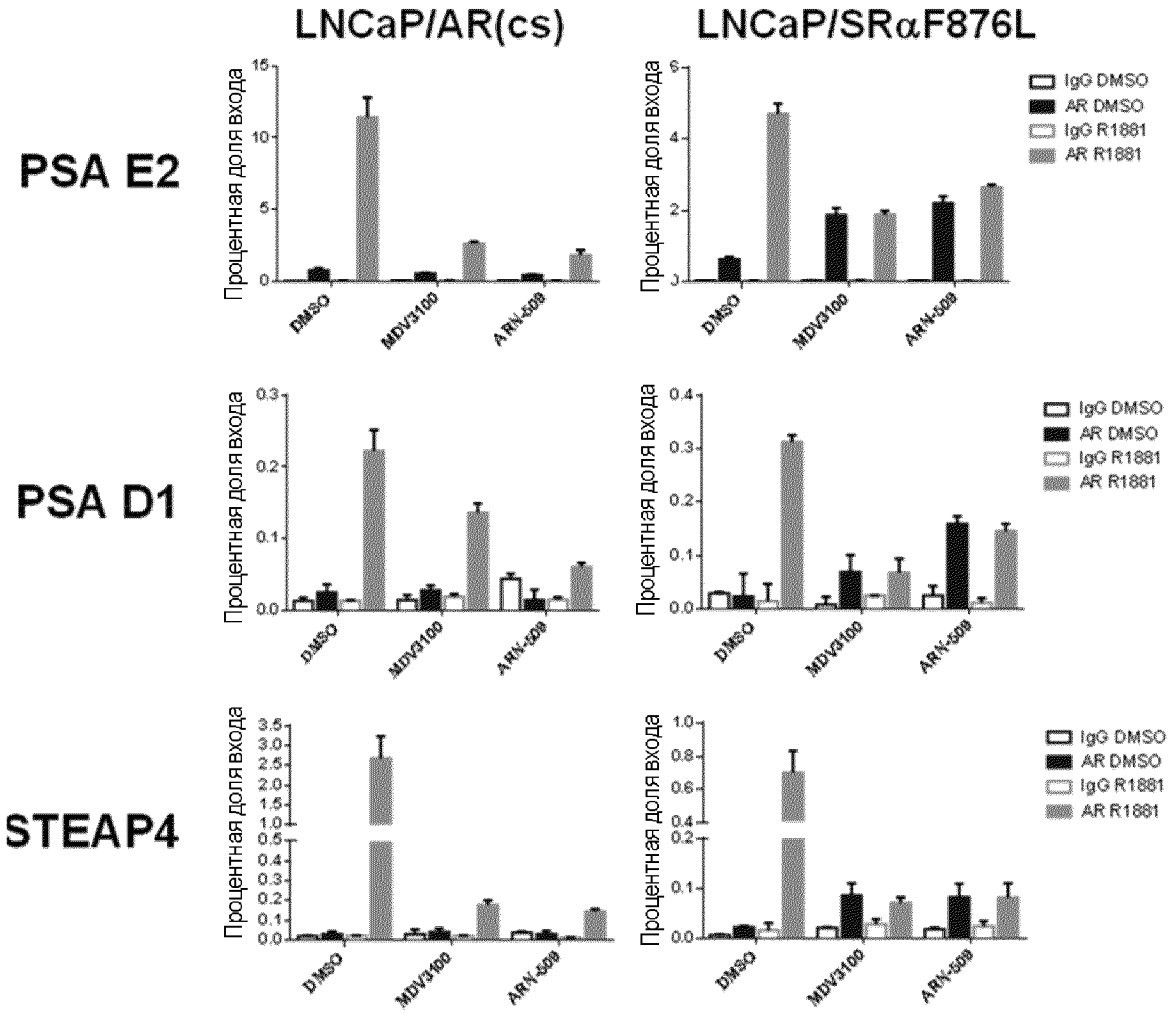
B


LNCaP/AR(cs) Антагонист
LNCaP/SRαF876L Антагонист
LNCaP/pCDNAF876L Агонист
LNCaP/pCDNAF876L Антагонист
Относительная активность люциферазы
Концентрация (Log M)
R1881
ARN-509 + R1881
Энзалутамид + R1881
Время = 0

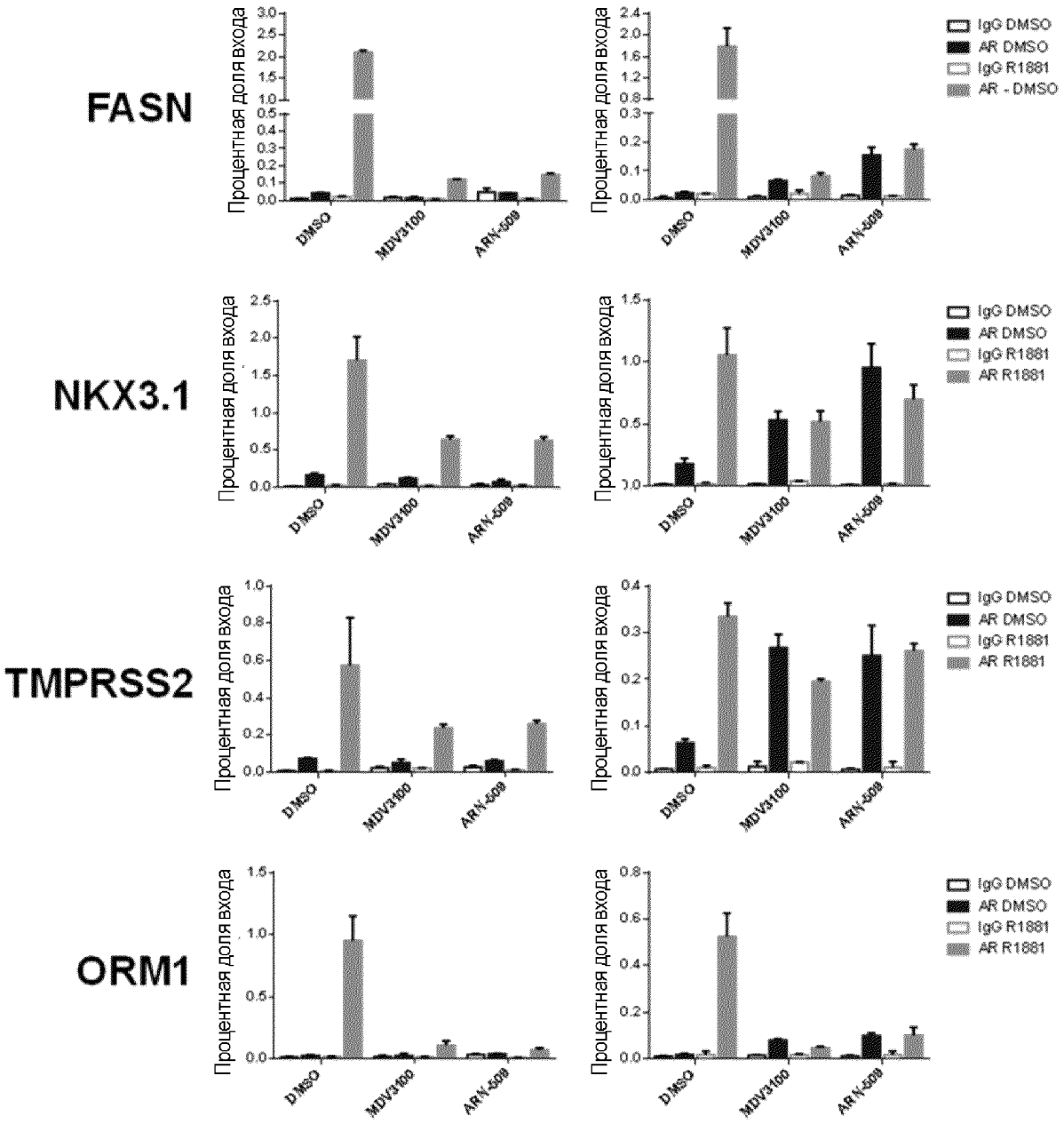
Фиг. 8


Кратность индукции
0
1
2
3
4
5
Дикий тип
F876L
Несущая среда
R1881
ARN-509
Энзалутамид

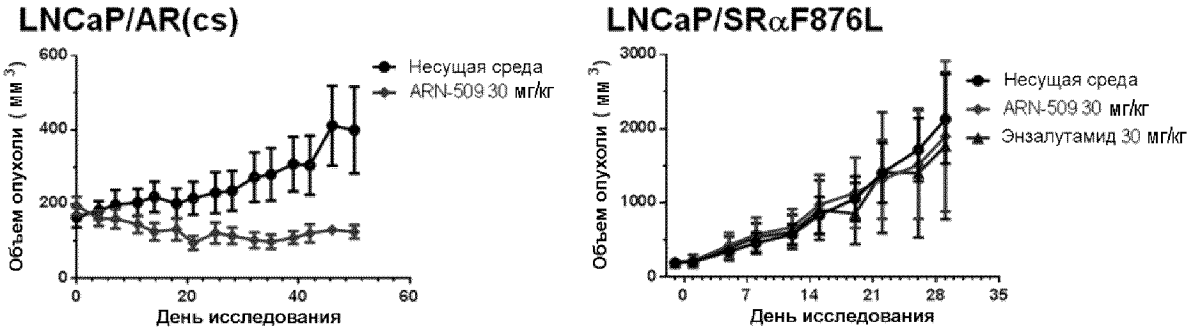
Фиг. 9


LNCaP/AR(cs)
LNCaP/SRαF876L
PSA E2
PSA D1
STEAP4
Процентная доля входа
IgG DMSO
AR DMSO
IgG R1881
AR R1881
DMSO
MDV3100
ARN-509

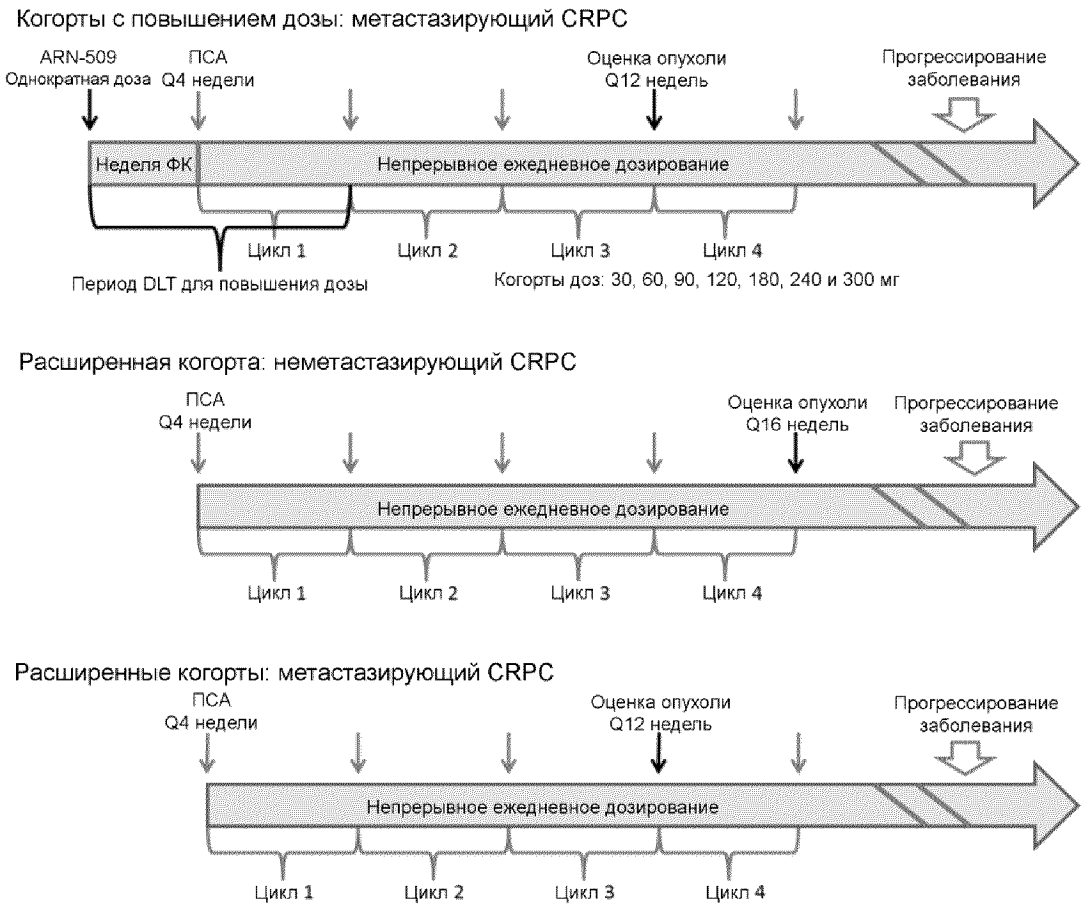
Фиг. 9 (продолжение)



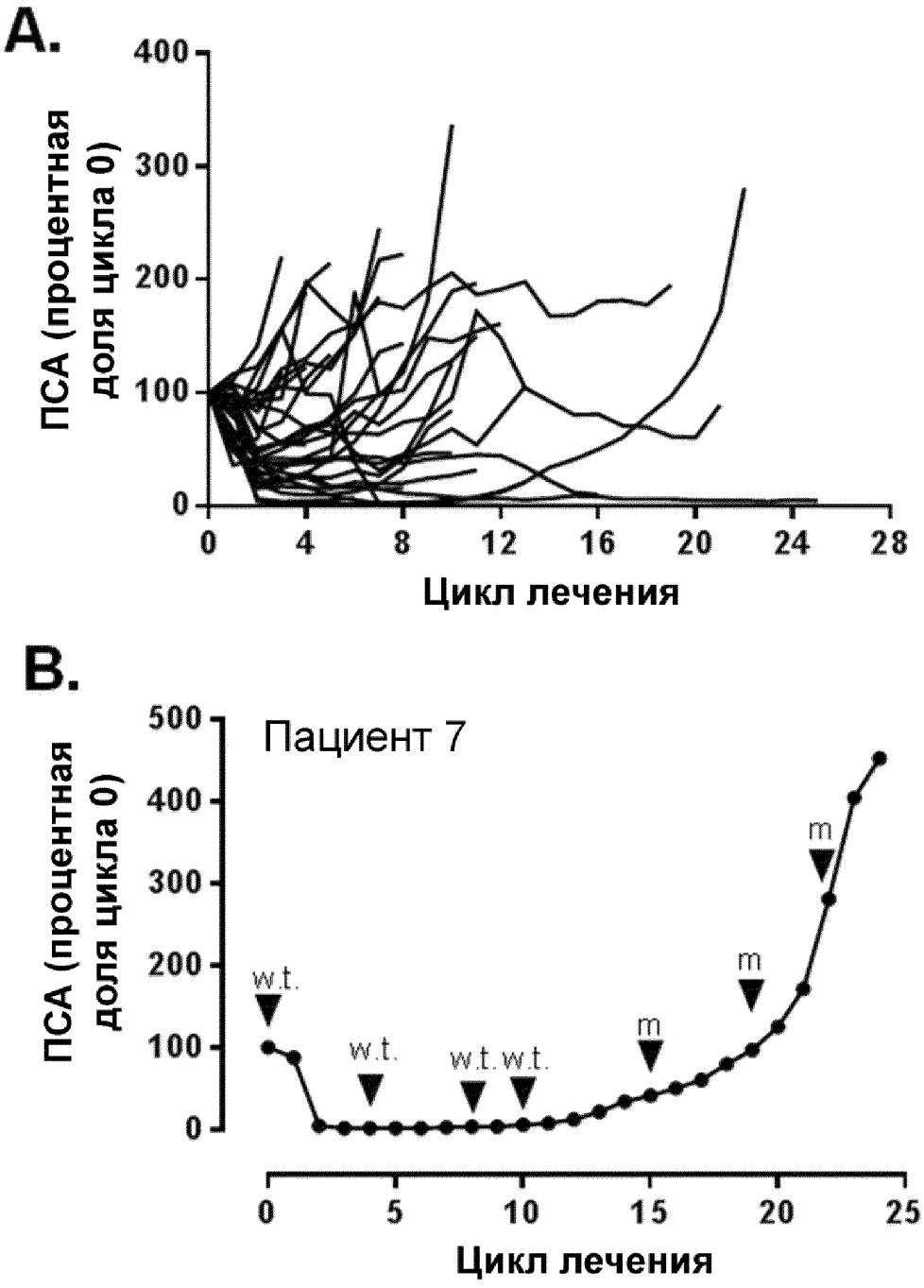
Фиг. 10


LNCaP/AR(cs)
Объем опухоли (мм 3)
600
400
200
0
0
20
40
60
День исследования
Несущая среда
ARN-509 30 мг/кг
LNCaP/SRαF876L
Объем опухоли (мм 3)
3000
2000
1000
0
0
7
14
21
28
35
День исследования
Несущая среда
ARN-509 30 мг/кг
Энзалутамид 30 мг/кг

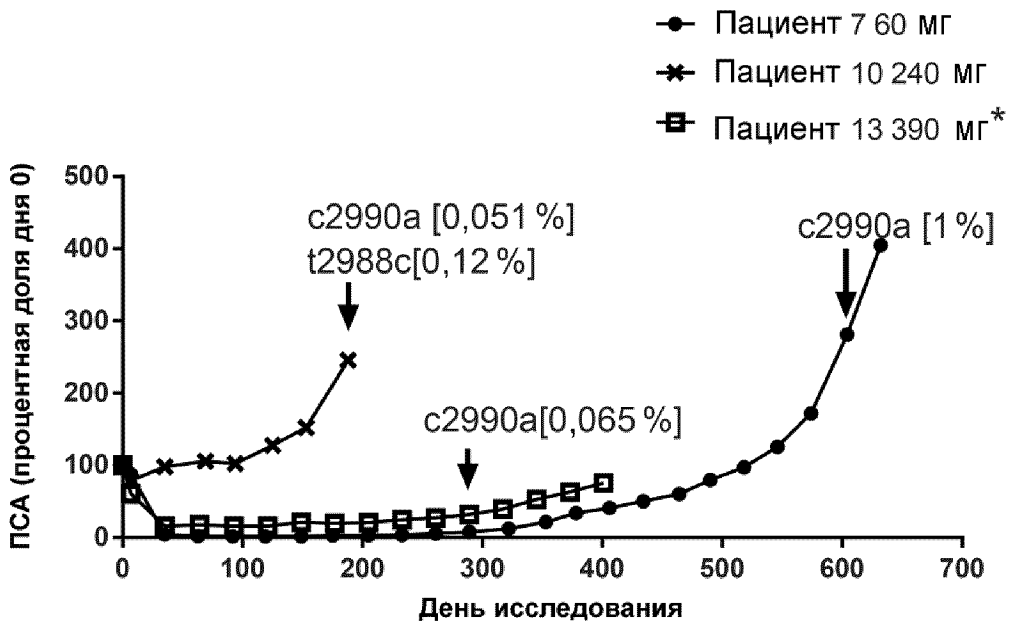
Фиг. 11


Когорты с повышением дозы: метастазирующий CRPC
ARN-509
Однократная доза
ПСА
Q4 недели
Оценка опухоли
Q12 недель
Прогрессирование
заболевания
Неделя ФК
Непрерывное ежедневное дозирование
Цикл 1
Цикл 2
Цикл 3
Цикл 4
Период DLT для повышения дозы
Когорты доз: 30, 60, 90, 120, 180, 240 и 300 мг
Расширенная когорта: неметастазирующий CRPC
ПСА
Q4 недели
Оценка опухоли
Q16 недель
Прогрессирование
заболевания
Непрерывное ежедневное дозирование
Цикл 1
Цикл 2
Цикл 3
Цикл 4
Расширенные когорты: метастазирующий CRPC
ПСА
Q4 недели
Оценка опухоли
Q12 недель
Прогрессирование
заболевания
Непрерывное ежедневное дозирование
Цикл 1
Цикл 2
Цикл 3
Цикл 4

Фиг. 12


A.
ПСА (процентная доля цикла 0)
400
300
200
100
0
0
4
8
12
16
20
24
28
Цикл лечения
B.
ПСА (процентная доля цикла 0)
500
400
300
200
100
0
Пациент 7
w.t.
w.t.
w.t.
w.t.
m
m
m
0
5
10
15
20
25
Цикл лечения

Фиг. 13



* перевели на 240 мг после 2 циклов