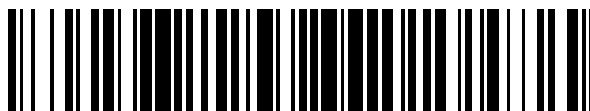


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 798 899**

51 Int. Cl.:

C12Q 1/68 (2008.01)

C07K 14/705 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

C07K 14/72 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.02.2014** **E 17206756 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.03.2020** **EP 3327144**

54 Título: **Mutación novedosa del receptor de andrógenos**

30 Prioridad:

25.02.2013 US 201361768860 P

17.09.2013 US 201361878669 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

14.12.2020

73 Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

72 Inventor/es:

COOKE, VESSELINA;
KORN, JOSHUA;
KORPAL, MANAV;
ZHOU, WENLAI;
ZHU, PING;
DELACH, SCOTT y
CAPONIGRO, GIORDANO

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 798 899 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Mutación novedosa del receptor de andrógenos

5 Campo técnico

La presente divulgación se refiere en general a composiciones y métodos útiles para tratar afecciones asociadas con el receptor de andrógenos (AR, por sus siglas en inglés), tales como enfermedades de la próstata, tales como cáncer de próstata (PCa, por sus siglas en inglés), cáncer de mama y varias otras enfermedades. La divulgación se relaciona más particularmente con composiciones que comprenden un receptor de andrógenos con una mutación novedosa en F877 o fragmentos o variantes de este [AR (F877)] donde la posición 877 de los aminoácidos está de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 1. Esta mutación es útil para estratificar a los pacientes, predecir la sensibilidad a los fármacos y diseñar pautas terapéuticas, ya que hace que el AR sea resistente a algunos agentes terapéuticos (tales como MDV3100) y no a otros (tales como la bicalutamida antiandrogénica o los inhibidores CDK4/6 LEE011 y PD0332991). Esta mutación F877 puede incluso causar un cambio de antagonista a agonista para MDV3100. La presente divulgación también está relacionada con polipéptidos que comprenden el AR mutante, anticuerpos contra él y polinucleótidos que lo codifican, todos los cuales pueden usarse para identificar tratamientos novedosos para enfermedades relacionadas con AR. La divulgación también se refiere a una mutación doble en AR en las posiciones W742 y T878, que también confiere resistencia a MDV3100. Estas mutaciones en AR son, por lo tanto, útiles para la estratificación de pacientes y el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos para enfermedades relacionadas con AR. Esta divulgación también se refiere a métodos de tratamiento que conllevan combinaciones de terapias.

Antecedentes de la invención

El receptor de andrógenos (AR) es un receptor que se une a ligandos tales como la testosterona y la dihidrotestosterona, y posteriormente se transloca al núcleo. Allí actúa como un factor de la transcripción que se une al ADN, y regula la expresión génica y muchas otras funciones. La sobreexpresión o mutación de AR se ha involucrado en diversas enfermedades, incluido el cáncer, incluido el cáncer de próstata y muchas otras enfermedades.

El cáncer de próstata es uno de los cánceres diagnosticados con mayor frecuencia en el mundo. Kawata *et al. The Prostate* 70, 745-754 (2010); y Jemal *et al. CA* 58, 71-96 (2008). Aunque los tumores localizados a menudo son curables, las metástasis a distancia emergen en una fracción significativa de pacientes. Scher *et al. Journal of clinical oncology* 23, 8253-8261 (2005); y Clegg *et al. Cancer research* 72, 1494-1503 (2012). La terapia de privación de andrógenos, incluida la castración quirúrgica o química, es inicialmente efectiva; sin embargo, casi siempre se adquiere resistencia que da como resultado una forma de tumor mucho más agresiva conocida como cáncer de próstata resistente a la castración (CRPC, por sus siglas en inglés). CRPC es la segunda causa más común de muertes relacionadas con el cáncer en hombres estadounidenses [Jemal *et al. CA: a cancer journal for clinicians* 60, 277-300 (2010)] y en la actualidad es incurable. Una característica conservada de CRPC es la actividad sostenida de la señalización de AR [Chen *et al. Nature Medicine* 10, 33-39 (2004)], en virtud de muchos mecanismos que incluyen la sobreexpresión/amplificación del gen de AR y las mutaciones del gen de AR. Scher *et al. Journal of clinical oncology* 23, 8253-8261 (2005). La dependencia continua de la señalización de AR en CRPC condujo al desarrollo de inhibidores competitivos que compiten con los andrógenos para unirse a la cavidad de unión al ligando de AR. La bicalutamida es un antiandrógeno de este tipo que se ha utilizado en entornos clínicos durante muchos años como monoterapia o en combinación con la castración para bloquear la acción de los andrógenos. Sin embargo, en el contexto de CRPC, la bicalutamida experimenta un cambio de antagonista a agonista, y paradójicamente mejora la actividad de señalización de AR. Culig *et al. British journal of cancer* 81, 242-251 (1999).

Recientemente, se ha descubierto un antiandrógeno más potente, MDV3100 (enzalutamida, comercializado como XTANDI® por Astellas Pharma US, Inc., Northbrook, IL, y Medivation Inc., San Francisco, CA), que carece de actividad agonista. Tran *et al. Science* 324, 787-790 (2009). Basándose en datos preclínicos y clínicos convincentes, MDV3100 ha sido aprobado por la FDA para el tratamiento de hombres con CRPC metastásico tratado previamente con docetaxel. Los ensayos clínicos en curso también están estudiando MDV3100 como monoterapia en pacientes con cáncer de próstata avanzado que aún no han sido castrados y como una terapia neoadyuvante en hombres diagnosticados con cáncer de próstata pero que aún no se han sometido a prostatectomía.

Aunque MDV3100 ha demostrado una tremenda eficacia en ensayos clínicos, muchos de los que inicialmente respondieron favorablemente desde entonces han desarrollado resistencia a este antiandrógeno de segunda generación. Kim *et al. Current treatment options in oncology* 13, 189-200 (2012).

Por lo tanto, se necesitan nuevas composiciones y métodos para la estratificación de pacientes y la predicción de la sensibilidad a los fármacos para tratamientos para el cáncer de próstata, cáncer de mama y otras enfermedades relacionadas con AR. También se necesitan terapias novedosas para enfermedades relacionadas con AR.

Compendio de la invención

La invención se refiere a una composición terapéutica para su uso en el tratamiento de un paciente que padece cáncer de próstata o de mama, asociado con una mutación del receptor de andrógenos, donde el aminoácido en la posición 877 del receptor de andrógenos en dicho paciente está ausente o es un aminoácido diferente de fenilalanina, y donde la

composición terapéutica comprende el inhibidor de CDK4/6 LEE011 y donde la posición 877 de los aminoácidos está de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 1. Un objeto de esta divulgación es proporcionar herramientas y métodos para diagnosticar, pronosticar y tratar enfermedades relacionadas con el receptor de andrógenos (AR), tales como las enfermedades de la próstata, tales como el cáncer de próstata (PCa), incluido PCa resistente a la castración (CRPC) y

cáncer de mama, así como también otros trastornos relacionados con AR tales como la enfermedad de poliglutamato, alopecia, hiperplasia prostática benigna, hirsutismo, acné, atrofia espinal y muscular y enfermedad de Kennedy . En varios aspectos, la presente divulgación se refiere a una mutación novedosa y relevante desde un punto de vista clínico en AR, concretamente en la posición F877 (numerada de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 1 o 54), que confiere resistencia al MDV3100 terapéutico, e incluso causa un cambio de antagonista a agonista para este medicamento. La divulgación preestablecida también se refiere a los métodos de estratificación de pacientes, que conllevan el paso de detectar la presencia o ausencia de esta mutación en una muestra de células o tejidos de un paciente de una enfermedad relacionada con AR, y prescribir y diseñar un plan de tratamiento en consecuencia. La presente divulgación también se refiere a un método para tratar a un paciente con una enfermedad relacionada con el receptor de andrógenos (AR), donde el aminoácido en la posición 876 de AR está ausente o no es fenilalanina, y donde el método comprende el paso de administrar una composición terapéutica que comprende un inhibidor de CDK4/6. En un aspecto de la divulgación, el inhibidor de CDK4/6 es LEE011 o PD0332991, que puede usarse como un agente terapéutico para enfermedades relacionadas con AR. Esto incluye enfermedades relacionadas con AR donde AR comprende una mutación F877. Además, PD0332991, LEE011 y otros inhibidores de CDK4/6 son útiles como agentes terapéuticos contra enfermedades relacionadas con AR donde AR es de tipo natural. Los polipéptidos de AR con la mutación F877, los anticuerpos contra ellos y los polinucleótidos que los codifican también son útiles para el cribado de nuevos agentes terapéuticos. Además, en varios aspectos, la presente divulgación se refiere a una mutación doble en AR en las posiciones W742 y T878 (también numeradas de acuerdo con la secuencia de la SEQ ID NO: 1), que esta divulgación muestra que también confiere resistencia a MDV3100.

POLIPÉPTIDO DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS (AR) MUTANTE

En varios aspectos, la presente divulgación se refiere a AR(F877), que es un polipéptido o similar que comprende el receptor de andrógenos o un fragmento o variante de este que comprende o abarca la posición 877, donde el aminoácido en la posición 877 es sustituido o eliminado o es diferente de fenilalanina (F) (donde la posición de los aminoácidos está de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 54). En algunos aspectos de la divulgación, el aminoácido en la posición 877 es sustituido o eliminado. En algunos aspectos de la divulgación, el aminoácido en la posición 877 es leucina (L). En diversos aspectos de la divulgación, el polipéptido AR(F877) o fragmento o variante de este comprende opcionalmente una o más mutaciones en otras posiciones, de modo que el aminoácido en la posición 878 no es treonina (T), el aminoácido en la posición 875 no es histidina (H), el aminoácido en la posición 716 no es valina (V), y/o el aminoácido en la posición 742 no es triptófano (W) .

En diversas realizaciones de la divulgación, el fragmento o variante de AR(F877) retiene al menos una actividad de AR de tipo natural (o "WT", por sus siglas en inglés), que carece de una mutación en F877, o AR(F877).

En un aspecto, la presente divulgación proporciona polipéptidos AR(F877) aislados que tienen la secuencia mencionada en la SEQ ID NO: 54, o una variante de esta que difiere en una o más delecciones, adiciones, inserciones o sustituciones de aminoácidos en no más de un 50% de los residuos en la SEQ ID NO: 54, de modo que el polipéptido retiene al menos una actividad de AR(F877).

En diversos aspectos, la presente divulgación se refiere a AR(F877), que es un polipéptido o similar que comprende el receptor de andrógenos o un fragmento de este que comprende la posición 877, donde el aminoácido en la posición 877 es un aminoácido diferente de fenilalanina (F).

MÉTODOS PARA DETECTAR AR(F877) Y ESTRATIFICAR PACIENTES

Dentro de aspectos adicionales, la presente divulgación proporciona métodos para detectar la presencia o ausencia de una mutación en la posición F877 en AR en una muestra en un paciente o de este. La mutación en F877 en AR es relevante desde un punto de vista clínico, ya que los pacientes que presentan un AR mutante de este tipo no deben tratarse con MDV3100, sino que deben tratarse con un tratamiento que no comprenda MDV3100 (por ejemplo, bicalutamida o un inhibidor de CDK4/6 tal como LEE011 o PD0332991). También se observa que los inhibidores de CDK4/6 (por ejemplo, LEE011 y PD0332991) también son eficaces en los métodos de tratamiento de enfermedades relacionadas con AR en las que el AR es de tipo natural. La respuesta a la inhibición de CDK4/6 no solo se limitó a las células portadoras de F877L, ya que las células 22Rv1 independientes de andrógenos, una línea de PCa que expresaba AR WT y capaz de mantener la señalización de AR y la expresión de *DHFR* y *TK1* en condiciones de tratamiento con MDV3100, también mostraron una fuerte sensibilidad a la inhibición de CDK4/6. Estos datos sugieren de manera acumulativa que actuar sobre la función de CDK4/6 puede servir como una estrategia eficaz para el tratamiento de múltiples mecanismos de resistencia a MDV3100 y la probable independencia de andrógenos en general.

Cabe señalar que las células dentro de una muestra pueden ser heterogéneas; algunas pueden expresar AR(F877), mientras que otras pueden expresar AR WT (de tipo natural) y/u otro AR mutante. En varios aspectos descritos en la presente, la presente divulgación se refiere a métodos para detectar una mutación en la posición F877 en AR de una muestra que puede comprender una mezcla de AR(F877), AR WT y/u otros AR mutantes.

En diversos aspectos, la presente divulgación proporciona un método para detectar una mutación en la posición F877 en un polinucleótido o polipéptido de AR en una muestra de un paciente, comprendiendo el método los pasos de: (a) obtener una muestra que comprende AR del paciente; y (b) determinar la secuencia del polinucleótido o polipéptido AR o una porción de este para determinar si el AR comprende una mutación en la posición F877. El método opcionalmente se

refiere al diagnóstico, pronóstico y/o tratamiento de un paciente y opcionalmente comprende además el paso adicional de: (c) administrar o recomendar la administración de una composición terapéutica que comprende MDV3100 si un AR no comprende una mutación en F877; o administrar o recomendar la administración de una composición terapéutica que no comprende MDV3100 si un AR comprende una mutación en F877. En diversos aspectos de la divulgación, la composición terapéutica que no comprende MDV3100 es bicalutamida o un inhibidor de CDK4/6 tal como LEE011 o PD0332991, o un ácido nucleico terapéutico. En varios aspectos de la divulgación, si se determina que la muestra comprende una mezcla de células que expresan AR(F877), AR WT y/u otros AR mutantes, pueden ser necesarios varios pasos para atacar los diferentes tipos de células dentro de la mezcla. Además, las proporciones de células presentadoras de AR WT y varios mutantes pueden cambiar según las subpoblaciones de células son eliminadas o posiblemente activadas por terapias, y surgen clones resistentes. Por lo tanto, los pasos (a), (b) y (c) pueden repetirse.

En varios aspectos de la divulgación, el método para determinar si el aminoácido en la posición 877 en AR es fenilalanina (F) incluye, sin carácter limitante y entre otros, el uso de secuenciación de ácidos nucleicos o el uso de un anticuerpo o ácido nucleico específico para AR(F877).

Dentro de otros aspectos, la presente divulgación proporciona un método para detectar la expresión de AR(F877) en una muestra, que comprende: (a) poner en contacto una muestra con un ácido nucleico o fragmento o variante de este específico para AR(F877) en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir la hibridación del ácido nucleico con un ácido nucleico en la muestra; y (b) detectar el nivel de hibridación.

También se divulgan métodos para modular una respuesta proliferativa en una célula, que comprende el paso de poner en contacto una célula con un agente que modula la actividad de AR(F877).

Dentro de otros aspectos de la divulgación, se proporcionan métodos para modular la diferenciación de una célula, que comprenden el paso de poner en contacto una célula con un agente que modula la actividad de AR(F877).

La presente divulgación proporciona además métodos para modular la supervivencia celular, que comprenden el paso de poner en contacto una célula con un agente que modula la actividad de AR(F877).

Por lo tanto, en varios aspectos, la presente divulgación se refiere a varios métodos para detectar AR(F877) y estratificar pacientes que expresan o no este polipéptido.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para determinar la sensibilidad de una célula a MDV3100, comprendiendo el método: (a) determinar el aminoácido, si lo hay, en la posición 876 en el receptor de andrógenos en la célula, donde la posición 877 se determina de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 54; (b) comparar el aminoácido, si lo hay, en la posición 877 con un receptor de andrógenos de tipo natural, donde la ausencia de un aminoácido o la presencia de un aminoácido diferente de fenilalanina indica que la célula no es sensible a MDV3100. En un aspecto de la divulgación, la célula es una célula de cáncer de próstata, una célula de cáncer de mama u otra célula de una enfermedad relacionada con AR. En un aspecto de la divulgación, la enfermedad relacionada con AR es la enfermedad de poliglutamato, alopecia, hiperplasia prostática benigna, hirsutismo, acné, atrofia espinal y muscular o enfermedad de Kennedy.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para predecir la sensibilidad de un paciente de una enfermedad relacionada con AR al tratamiento con MDV3100, comprendiendo el método: (a) determinar el aminoácido, si lo hay, en la posición 877 en el receptor de andrógenos en la muestra en el paciente u obtenida de este, donde la posición 877 se determina de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 54; (b) comparar el aminoácido, si lo hay, en la posición 877 con un receptor de andrógenos de tipo natural, donde la ausencia de un aminoácido o la presencia de un aminoácido diferente de fenilalanina indica que el paciente no es sensible a MDV3100. En un aspecto, la enfermedad relacionada con AR es cáncer de próstata o de mama. En un aspecto, la enfermedad relacionada con AR es la enfermedad de poliglutamato, alopecia, hiperplasia prostática benigna, hirsutismo, acné, atrofia espinal y muscular o enfermedad de Kennedy.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar a un paciente con una enfermedad relacionada con AR, comprendiendo el método: (a) determinar el aminoácido, si lo hay, en la posición 877 en el receptor de andrógenos en la muestra en el paciente u obtenida de este, donde la posición 877 se determina de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 54; (b) comparar el aminoácido, si lo hay, en la posición 877 con un receptor de andrógenos de tipo natural, donde la ausencia de un aminoácido o la presencia de un aminoácido diferente de fenilalanina indica que el paciente no es sensible a MDV3100; (c) si el aminoácido en la posición 877 no es fenilalanina, administrar un tratamiento que no comprenda MDV3100; o si el aminoácido en la posición 877 es fenilalanina, administrar un tratamiento que comprenda MDV3100; y (d) analizar la progresión o atenuación de la enfermedad. En un aspecto de la divulgación, la enfermedad relacionada con AR es cáncer de próstata o de mama. En un aspecto, la enfermedad relacionada con AR es la enfermedad de poliglutamato, alopecia, hiperplasia prostática benigna, hirsutismo, acné, atrofia espinal y muscular o enfermedad de Kennedy.

MÉTODOS PARA DETECTAR AR(W742/T878) Y ESTRATIFICAR PACIENTES

Dentro de aspectos adicionales, la presente divulgación también se refiere a la mutación doble en las posiciones W742 y T878; métodos para detectar esta mutación doble en una muestra de un paciente; y métodos de estratificar pacientes, ya que los pacientes que presentan esta mutación doble no deben tratarse con MDV3100 o bicalutamida, sino que deben tratarse con un tratamiento que no comprenda MDV3100 o bicalutamida.

En diversos aspectos, la presente divulgación proporciona un método para detectar la expresión de AR(W742/T878) en un paciente, comprendiendo el método el paso de: determinar si los aminoácidos en las posiciones 742 y 878 de un receptor de andrógenos o fragmento de estos en el paciente son, respectivamente, triptófano (W) y treonina (T). En varios aspectos, el método comprende además los pasos de recomendar la administración y/o administrar al paciente: (a) bicalutamida o MDV3100 si los aminoácidos en las posiciones 742 y 878 son, respectivamente, triptófano (W) y treonina

(T); o (b) un tratamiento para la enfermedad de la próstata que no sea bicalutamida o MDV3100 si los aminoácidos en las posiciones 742 y 878 no son, respectivamente, triptófano (W) y treonina (T). En un aspecto de la divulgación, el tratamiento que no comprende bicalutamida o MDV3100 puede comprender, como ejemplos no limitantes, otro agente terapéutico, tal como un inhibidor de CDK4/6 tal como LEE011 o PD0332991, o un ácido nucleico terapéutico.

En diversos aspectos, la presente divulgación proporciona un método para diagnosticar, pronosticar y/o tratar a un paciente que tiene o se sospecha que tiene una enfermedad relacionada con AR, que comprende los pasos de: obtener del paciente una muestra biológica que comprende una célula que expresa el receptor de andrógenos; determinar si el receptor de andrógenos comprende una mutación doble en las posiciones 742 y 878 de modo que el aminoácido en la posición 742 no sea triptófano (W) y el aminoácido en la posición 878 no sea treonina (T), y: tratar al paciente con un tratamiento que comprende bicalutamida o MDV3100 si el receptor de andrógenos comprende un triptófano (W) en la posición aminoacídica 742 y una treonina (T) en la posición 878, o tratar al paciente con un tratamiento para la enfermedad de la próstata que no comprende bicalutamida o MDV3100 si el receptor de andrógenos comprende un aminoácido diferente de triptófano (W) en la posición aminoacídica 742 y un aminoácido diferente de treonina (T) en la posición aminoacídica 878. El tratamiento divulgado que no comprende bicalutamida o MDV3100 puede comprender, como ejemplos no limitantes, otro agente terapéutico, tal como un inhibidor de CDK4/6 tal como LEE011 o PD0332991, o un ácido nucleico terapéutico. Esta divulgación también señala que un inhibidor de CDK4/6 también puede usarse en un método de tratamiento de enfermedades relacionadas con AR en las que el AR es de tipo natural. Cabe señalar que una terapia combinada que comprende múltiples agentes y/o terapias puede usarse en el tratamiento de enfermedades relacionadas con AR (por ejemplo, bicalutamida y/o LEE011 y/o PD0332991 y/u otros tratamientos conocidos en la técnica).

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para determinar la sensibilidad de una célula a MDV3100, comprendiendo el método: (a) determinar el aminoácido, si lo hay, en las posiciones 742 y 878 en el receptor de andrógenos en la célula, donde las posiciones 742 y 878 se determinan de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 54; (b) comparar el aminoácido, si lo hay, en las posiciones 742 y 878 con un receptor de andrógenos de tipo natural, donde la combinación de la ausencia de un aminoácido o la presencia de un aminoácido diferente de triptófano (W) en la posición 742 y la ausencia de un aminoácido o la presencia de un aminoácido diferente de treonina (T) en la posición 878 indica que la célula no es sensible a MDV3100. En un aspecto de la divulgación, la célula es una célula de cáncer de próstata, una célula de cáncer de mama u otra célula de una enfermedad relacionada con AR. En un aspecto de la divulgación, la enfermedad relacionada con AR es la enfermedad de poliglutamato, alopecia, hiperplasia prostática benigna, hirsutismo, acné, atrofia espinal y muscular o enfermedad de Kennedy.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para predecir la sensibilidad de un paciente de una enfermedad relacionada con AR al tratamiento con MDV3100, comprendiendo el método: (a) determinar el aminoácido, si lo hay, en las posiciones 742 y 878 en el receptor de andrógenos en la muestra en el paciente u obtenida de este, donde las posiciones 742 y 878 se determinan de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 54; (b) comparar el aminoácido, si lo hay, en las posiciones 742 y 878 con un receptor de andrógenos de tipo natural, donde la combinación de la ausencia de un aminoácido o la presencia de un aminoácido diferente de triptófano (W) en la posición 742 y la ausencia de un aminoácido o la presencia de un aminoácido diferente de treonina (T) en la posición 878 indica que el paciente no es sensible a MDV3100. En un aspecto de la divulgación, la enfermedad relacionada con AR es cáncer de próstata o de mama. En un aspecto de la divulgación, la enfermedad relacionada con AR es la enfermedad de poliglutamato, alopecia, hiperplasia prostática benigna, hirsutismo, acné, atrofia espinal y muscular o enfermedad de Kennedy.

En un aspecto, la divulgación se refiere a un método para tratar a un paciente con una enfermedad relacionada con AR, comprendiendo el método: (a) determinar el aminoácido, si lo hay, en las posiciones 742 y 878 en el receptor de andrógenos en la muestra en el paciente u obtenida de este, donde las posiciones 742 y 878 se determinan de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 54; (b) comparar el aminoácido, si lo hay, en las posiciones 742 y 878 con un receptor de andrógenos de tipo natural, donde la combinación de la ausencia de un aminoácido o la presencia de un aminoácido diferente de triptófano (W) en la posición 742 y la ausencia de un aminoácido o la presencia de un aminoácido diferente de treonina (T) en la posición 878 indica que el paciente no es sensible a MDV3100; (c) si el aminoácido en la posición 877 no es fenilalanina, administrar un tratamiento que no comprenda MDV3100; o si el aminoácido en las posiciones 742 y 878 es fenilalanina, administrar un tratamiento que comprenda MDV3100; y (d) analizar la progresión o atenuación de la enfermedad. En un aspecto de la divulgación, la enfermedad relacionada con AR es cáncer de próstata o de mama. En un aspecto de la divulgación, la enfermedad relacionada con AR es la enfermedad de poliglutamato, alopecia, hiperplasia prostática benigna, hirsutismo, acné, atrofia espinal y muscular o enfermedad de Kennedy.

Por lo tanto, en varios aspectos, la presente divulgación se refiere a varios métodos para detectar AR(W742/T878) y estratificar pacientes que expresan o no este polipéptido.

CRIBADO DE AGENTES TERAPÉUTICOS NOVEDOSOS

La mutación en la posición F877 permite que AR sea resistente a MDV3100 e incluso provoca un cambio de antagonista a agonista para este fármaco. Por lo tanto, se necesitan terapias novedosas que interactúen con AR(F877) y sean útiles para tratar pacientes con enfermedades relacionadas con AR que tienen una mutación en AR de este tipo.

La presente divulgación proporciona además, dentro de otros aspectos de la divulgación, métodos para cribar una molécula (por ejemplo, un potencial agente terapéutico) en función de su capacidad de interactuar con AR(F877), que comprenden los pasos de: (a) poner en contacto una molécula candidata con un polipéptido de AR(F877) en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que la molécula candidata y el polipéptido interactúen; y (b) detectar la presencia o ausencia de unión de la molécula candidata al polipéptido y/o la capacidad de interferir con o disminuir al menos una actividad del polipéptido. El paso de detección puede, por ejemplo, comprender el uso de un AR(F877) y un

indicador de AR, por ejemplo, un polinucleótido que comprende una ARE [secuencia de ADN a la que se unen WT o AT(F877)], un promotor y un gen indicador (por ejemplo, luciferasa). El paso de detección puede comprender, por ejemplo, determinar si la molécula candidata interfiere con o disminuye la capacidad del AR(F877) para dirigir la expresión del indicador de AR. El paso de detección puede comprender, por ejemplo, un paso de purificación por afinidad, un cribado de doble híbrido en levaduras o un cribado de una colección de presentación en fagos.

En algunos aspectos, los métodos de cribado de nuevos agentes terapéuticos implican el uso de un polipéptido de AR(F877) o fragmento o variante de este que comprende o abarca el aminoácido en la posición 877. Este polipéptido se puede producir de cualquier manera conocida en la técnica, incluida la expresión a partir de un polinucleótido que codifica el polipéptido.

La presente divulgación abarca métodos para producir un polipéptido de AR(F877).

La presente divulgación proporciona además, dentro de otros aspectos de la divulgación, métodos para producir un polipéptido de AR(F877), que comprende los pasos de: (a) cultivar una célula hospedadora como se ha descrito anteriormente en condiciones que permitan la expresión del polipéptido de AR(F877); y (b) aislar el polipéptido de AR(F877) a partir del cultivo de células hospedadoras.

Por lo tanto, la presente divulgación se refiere, en diversos aspectos, a composiciones y métodos para cribar y desarrollar nuevos agentes terapéuticos, que incluyen polipéptidos que comprenden, anticuerpos para polipéptidos que comprenden y polinucleótidos que codifican AR(F877).

MÉTODOS DE TRATAMIENTO

En diversas realizaciones, la presente divulgación se refiere a métodos de tratamiento de enfermedades relacionadas con AR, donde el AR tiene una mutación descrita en la presente.

En una realización, la presente divulgación se refiere a un método para tratar a un paciente con una enfermedad relacionada con el receptor de andrógenos (AR), donde el aminoácido en la posición 877 de AR está ausente o no es fenilalanina, y donde el método comprende el paso de administrar una composición terapéutica que no comprende MDV3100.

En diversas realizaciones de la divulgación, la composición terapéutica que no comprende MDV3100 es bicalutamida o un inhibidor de CDK4/6 tal como LEE011 o PD0332991, o un ácido nucleico terapéutico.

En una realización, la presente divulgación se refiere a un método para tratar a un paciente con una enfermedad relacionada con el receptor de andrógenos (AR), donde los aminoácidos en las posiciones 742 y 878 de AR son fenilalanina, y donde el método comprende el paso de administrar una composición terapéutica que comprende MDV3100.

En una realización, la presente divulgación se refiere a un método para tratar a un paciente con una enfermedad relacionada con el receptor de andrógenos (AR), donde el aminoácido en la posición 877 de AR está ausente o no es fenilalanina, y donde el método comprende el paso de administrar una composición terapéutica que comprende un inhibidor de CDK4/6.

En varias realizaciones de la divulgación, el inhibidor de CDK4/6 es LEE011 o PD0332991.

En varias realizaciones de la divulgación, la enfermedad relacionada con AR es cáncer de próstata o de mama. En varias realizaciones de la divulgación, la enfermedad relacionada con AR es la enfermedad de poliglutamato, alopecia, hiperplasia prostática benigna, hirsutismo, acné, atrofia espinal y muscular o enfermedad de Kennedy.

POLINUCLEÓTIDO AR(F877)

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un polinucleótido o un polinucleótido antisentido que comprende al menos 15 nucleótidos consecutivos (incluidos 0, 1, 2 o 3 emparejamientos erróneos) que tienen la secuencia de y/o son capaces de hibridarse de manera detectable con una secuencia que codifica al menos 5 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 54, que incluye la posición 877, donde el aminoácido en la posición 877 es sustituido o eliminado y es un aminoácido diferente de fenilalanina (F), donde la hibridación se realiza en condiciones que incluyen un lavado. Estos polinucleótidos pueden usarse para codificar (por ejemplo, expresar) un polipéptido de AR(7, o incorporarse a un ácido nucleico terapéutico [por ejemplo, un ARNip o similar a AR(F877)]).

Otra realización de la divulgación proporciona un polinucleótido del receptor de andrógenos aislado, donde el polinucleótido aislado o su complementario codifica al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 2, donde los al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos contiguos comprenden o abarcan la posición 876 de la SEQ ID NO: 2, y donde el aminoácido en la posición 877 no es Fenilalanina (F), y donde, opcionalmente, el aminoácido en la posición 878 no es treonina (T), el aminoácido en 875 no es histidina (H), el aminoácido en la posición 716 no es valina (V), y/o el aminoácido en la posición en 742 no es triptófano (W).

Otra realización de la divulgación proporciona un constructo de expresión (o vector) que comprende un polinucleótido del receptor de andrógenos aislado como se ha descrito anteriormente.

Otra realización de la divulgación proporciona una célula hospedadora que comprende un polinucleótido del receptor de andrógenos aislado como se ha descrito anteriormente.

Otra realización de la divulgación proporciona un polinucleótido que codifica un receptor de andrógenos mutante que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 excepto en que la proteína del receptor de andrógenos mutante codificada contiene una leucina (L) en la posición 877 de la SEQ ID NO: 2.

Otra realización de la divulgación proporciona un constructo que comprende: un promotor; y un segmento polinucleotídico que codifica un receptor de andrógenos mutante o un fragmento de este, donde la secuencia de aminoácidos del receptor de andrógenos se muestra en la SEQ ID NO: 2, donde dicha secuencia contiene una mutación en la posición aminoacídica 877 de la SEQ ID NO: 2 de modo que el aminoácido en la posición 877 no es fenilalanina (F), y donde, opcionalmente, el aminoácido en la posición 878 no es treonina (T), el aminoácido en 875 no es histidina (H), el aminoácido en la posición

716 no es valina (V), y/o el aminoácido en la posición 742 no es triptófano (W), y en donde la secuencia del fragmento comprende al menos 5 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 2 y comprende la posición 877, donde el segmento polinucleotídico se encuentra en dirección 3' respecto al promotor, donde la transcripción del segmento polinucleotídico se inicia en el promotor.

Otra realización de la divulgación proporciona un polinucleótido aislado, donde el polinucleótido aislado o su complementario codifica al menos 10, 15 o 20 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 54, donde los al menos 10 aminoácidos contiguos comprenden la posición 877 de la SEQ ID NO: 54, y donde el aminoácido en la posición 877 es sustituido o eliminado o no es Fenilalanina (F).

Otra realización de la divulgación proporciona una célula hospedadora que comprende un constructo que comprende un promotor; y cualquier polinucleótido como se describe en la presente.

Por lo tanto, en diversos aspectos, la presente divulgación se refiere a un polinucleótido que codifica un AR(F877) o fragmento o variante de este.

Estos y otros aspectos de la presente divulgación serán evidentes tras la referencia a la siguiente descripción detallada y los dibujos adjuntos.

Descripción de las figuras

Figura 1. Caracterización de clones resistentes a MDV3100 derivados de células LNCaP. **A**, imágenes de contraste de fase de células LNCaP cultivadas en medio RPMI complementado con un 10% de FCS (parte superior izquierda), 10% de CSS (parte superior derecha), 10% de FCS + MDV3100 1 μ M (parte inferior izquierda) y 10% de FCS + MDV3100 1 μ M + R18811 nM (parte inferior derecha). Barra de escala, 50 μ M. **B**, representación esquemática del paradigma experimental aplicado (véase el texto principal para más detalles). **C**, curvas de inhibición del crecimiento individuales (izquierda) y promedio (derecha) para los tres controles (línea marrón) y siete clones resistentes (verde y rojo) tratados con MDV3100 (parte superior) y bicalutamida (parte inferior). Los datos se presentan como porcentaje de crecimiento relativo a la condición de tratamiento en DMSO medido por el ensayo CellTiter-Glo. **D**, análisis de inmunoelectrotransferencia de la expresión de AR en líneas de control y resistentes. Se utilizó β -actina como control de carga. **E**, puntuaciones de actividad de la ruta de AR para C1-C3 y siete clones resistentes cultivados en un 10% de FCS en las condiciones de referencia (después de la retirada del fármaco durante 2 semanas) (barras de color beige). Las puntuaciones también se calcularon para C1-C3 tratados con MDV3100 10 μ M durante 24 h como referencia (barras verdes). Se utilizaron los genes con aumento regulado por andrógenos para el análisis.

Figura 2. Clones resistentes segregados en función de la sensibilidad de la ruta de AR respecto a MDV3100. **A**, izquierda, mapa cromático que muestra la expresión diferencial de los genes en líneas de control (fuente marrón), poco resistentes (rojo) y muy resistentes (verde) tras el tratamiento con MDV3100 10 μ M durante 24 h. Se muestran conjuntos de sondas con un factor de cambio promedio de al menos 2 (MDV frente a DMSO) durante al menos un conjunto de muestras (controles, muestras poco resistentes y muestras muy resistentes). Los números romanos enumerados a la derecha representan clases amplias de genes expresados de manera diferencial. Centro, tabla que muestra los resultados del análisis de enriquecimiento de la ruta GO de genes de la clase III. El tono azul resalta un enriquecimiento significativo de genes del conjunto de genes «activación de AR». Derecha, imagen ampliada de la clase III que muestra la ubicación relativa de los genes regulados por AR (puntas de flecha azules) que se suman a la puntuación de significación del análisis de la ruta. Todos los datos se presentan como relación log₂ del tratamiento con MDV vs DMSO. **B**, correlación entre la firma génica de AR en comparación con los genes con una mejor calificación tras el tratamiento con MDV3100 10 μ M durante 24 h en las líneas de control (izquierda), poco resistentes (centro) y muy resistentes (derecha). La línea verde representa el nivel de actividad de la ruta: una desviación más fuerte de la diagonal negra representa una mayor inhibición de la actividad de la ruta debida al tratamiento con MDV3100. **C**, análisis por qPCR de la expresión de genes de AR diana canónicos en diez líneas tratadas con DMSO o MDV3100 durante 24 h. Los datos se presentan como porcentaje de expresión en la muestra tratada con MDV3100 respecto a DMSO (establecido arbitrariamente a un 100%). D, DMSO; M, MDV3100 10 μ M. Se utilizó *TBP* para normalizar la expresión. Los datos representan la media $\pm$ EEM; $n = 3$. * $P < 0,05$ (prueba de la *t* de Student). **D**, cuantificación de la relación nuclear a citoplasmática de la expresión endógena de AR en el control (C1, marrón) y el clon resistente (n.º 1, verde) tratados con DMSO, MDV3100 10 μ M (MDV) o R1881 0,1 nM (R1881) durante 24 h. Los datos de inmunoelectrotransferencia presentados en la Fig. Complementaria S3 se analizaron con ImageJ para determinar las relaciones.

Figura 3. El análisis de secuenciación del transcriptoma completo identifica una mutación F877L novedosa en AR en líneas muy resistentes y tumores de xenoinjerto. **A**, superior, agrupamiento jerárquico sin sesgo de mutaciones somáticas detectadas en controles (fuente marrón), clones poco resistentes (fuente roja) y muy resistentes (fuente verde). La línea gris representa la falta de mutación; la línea naranja representa una mutación heterocigótica recurrente única; la línea roja representa una mutación homocigótica recurrente; la línea verde representa una mutación recurrente en AR, como lo indica la punta de flecha verde. Inferior, representación esquemática del receptor de andrógenos humano. NTD, dominio N-terminal; DBD, dominio de unión a ADN; LBD, dominio de unión al ligando. El sitio de mutación F877L se indica con una línea verde y fuente verde. **B**, izquierda, gráfico de IGV que muestra la naturaleza heterocigótica de la mutación F877L en el exón 8 de AR en clones muy resistentes (se indica con puntas de flecha verdes). La mutación F877L es adyacente a una mutación T878A homocigótica preexistente (tono naranja) en LNCaP. Derecha, recuentos sin procesar de alelos AR de tipo natural (WT, sombra roja) y mutantes (Mut, sombra verde) en clones muy resistentes. **C**, cinética de crecimiento tumoral de dos tumores LNCaP tratados con vehículo (curvas rojas) y cuatro tratados con MDV3100 (curvas verdes). **D**, gráfico de IGV que muestra la posición y frecuencia relativas de sustituciones de nucleótidos que promueven F877L en tumores resistentes a MDV3100. C1-C2, tumores tratados con vehículo; R1-R4, tumores resistentes a MDV3100. **E**, tabla

que resume los datos del gráfico de IGV. El tono rojo representa tumores portadores de AR WT, mientras que el tono verde resalta tumores portadores de AR mutante F877L. **F**, gráficos de barras que muestran la expresión relativa de genes de AR diana *KLK3* y *NKX3-1* en tumores LNCaP. Barras rojas, datos de expresión de tumores que expresan AR-WT; barras verdes, datos de expresión de tumores que albergan AR-F877L.

Figura 4. La mutación F877L confiere funcionalmente un cambio de antagonista a agonista. **A**, comparación de los modos de acoplamiento de MDV3100 en un estado inactivo de AR de tipo natural (WT) (izquierda) con un modelo especulativo de MDV3100 unido a un estado activado de AR mutante (derecha). **B**, gráficos de barras que muestran la actividad normalizada del indicador de AR después de la transfección de células 294T (parte superior) y VCaP (parte inferior) con diversos constructos de expresión de AR (AR^{WT}, AR^{T878A}, AR^{F877L}, AR^{F877L/T878A}) y el tratamiento posterior con vehículo (Veh), R1881 0,1 nM (R), MDV3100 10 µM (MDV), bicalutamida 10 µM (Bic), MDV3100 10 µM + R1881 0,1 nM (M/R) o bicalutamida 10 µM + R1881 0,1 nM (B / R) durante 24 h. Todos los datos se normalizan respecto a la expresión de luciferasa de Renilla (R_{LUC}). Los datos representan la media ± EEM; *n* = 3. **P* <0,001 (prueba de la *t* de Student). **C**, el análisis por qPCR de la expresión de *KLK3* en una línea de control (C1), clones poco resistentes (fuente roja) y muy resistentes (fuente verde) tras el tratamiento con vehículo (V), R1881 0,1 nM, R1881 0,1 nM + MDV3100 10 µM (MDV) y R1881 0,1 nM + bicalutamida 10 µM (Bic) en CSS al 10% durante 24 h. Se utilizó *TBP* para normalizar la expresión. Los datos representan la media ± EEM; *n* = 3. **P* <0,05, ***P* <0,01 (prueba de la *t* de Student).

Figura 5. Las células de PCa diseñadas para sobreexpresar AR-F877L/T878A son resistentes desde un punto de vista genético y fenotípico a MDV3100. **A**, análisis por qPCR de la expresión de *KLK3* (parte superior) y *NKX3-1* (parte inferior) en varias líneas modificadas (controles vectoriales (Vec); T878A; F877L/T878A, F877L; W742C/T878A, W741C). Todas las líneas se pretrataron con vehículo (-) o doxiciclina (+) durante 3 d antes del tratamiento con DMSO (izquierda) o MDV3100 10 µM (derecha) durante 24 horas en FCS al 10%. Se utilizó *TBP* para normalizar la expresión. Los datos representan la media ± EEM; *n* = 3. **P* <0,05, ***P* <0,01 (prueba de la *t* de Student). **B**, análisis por inmunoelectrotransferencia de la expresión exógena de AR (HA) en fracciones citoplasmáticas y nucleares aisladas de varias líneas modificadas tratadas con DMSO (D) o MDV3100 10 µM (M) en medios complementados con 10% de CSS. Todas las líneas se pretrataron con Dox durante 3 d antes del tratamiento con DMSO o MDV3100 durante 24 h. F877L, F877L/T878A; W742C, W742C/T878A. La β-tubulina (β-tub) y la histona H3 (H3) se unieron a una molécula detectable (*probed*) para validar la pureza de las fracciones citoplasmáticas y nucleares, respectivamente. **C**, ensayos de formación de colonias de varias líneas modificadas (Dox-/-) tratadas con DMSO, MDV3100 1 µM (MDV) o bicalutamida 1 µM (BIC) durante 3-4 semanas. Se muestra un experimento representativo de tres experimentos independientes. **D**, parte superior, ensayos de formación de colonias de células Myc-CaP modificadas para expresar AR-T878A (izquierda) o AR-F877L/T878A (derecha) (Dox-/-) tratadas con DMSO (pocillos de la izquierda) o MDV3100 10 µM (pocillos de la derecha, MDV) durante ~14 d. Parte inferior, cuantificación de los datos de formación de colonias por ImageJ. **E**, medidas de volumen tumoral de tumores de control (C1, rojo) y resistente, clon n.º 1 (n.º 1, verde) tratados con vehículo (Veh) o 30 mg/kg de MDV3100 (MDV). Las flechas rojas y verdes continuas indican el día en que se inició la administración diaria de MDV3100 en ratones control (C1) y clon n.º 1 (n.º 1), respectivamente. La flecha verde discontinua resalta dos días consecutivos de tratamiento con MDV3100 antes de un descanso farmacológico en 15 de 30 ratones inyectados con el clon n.º 1 (n.º 1, verde oscuro). *n* = 7-8 tumores para todos los grupos excepto n.º 1 veh (*n* = 2). Los datos representan la media ± EEM. **F**, gráficos de barras que muestran el porcentaje de ratones que desarrollan tumores palpables (los números sobre las barras representan el número de ratones que presentan tumores). **G**, análisis de qPCR de la expresión de *TMPS2* y *SLC45A3* en tumores de control (C1) y resistentes (n.º 1) tratados con vehículo (Veh) o MDV3100 (MDV). Se utilizó *TBP* para normalizar la expresión. Los datos representan la media ± EEM; *n* = 3 para todos los grupos excepto C1 tratado con vehículo, *n* = 2. **P* <0,05, ***P* <0,01 (prueba de la *t* de Student).

Figura 6. Actuar sobre CDK4/6 reduce la proliferación de líneas de células de cáncer de próstata resistentes a MDV3100. **A**, análisis por qPCR de las dianas de E2F1, *DHFR* y *TK1*, en líneas C1 y clon n.º 1 tras el tratamiento con DMSO (D), MDV3100 10 µM (M), LEE011 10 µM (L) o MDV3100 10 µM y LEE011 10 µM (M + L) durante 24 h. **B**, curvas de inhibición del crecimiento promedio para los tres controles (línea marrón) y siete clones resistentes (verde y rojo) tratados con PDO33299 (parte superior) y LEE011 (parte inferior). Los datos se presentan como porcentaje de crecimiento relativo a la condición de tratamiento en DMSO medido por el ensayo CellTiter-Glo. **C**, cuantificación relativa de datos de ensayos de formación de colonias de líneas AR-T878A y AR-F877L/T878A tratadas con DMSO, MDV3100 10 µM (MDV), bicalutamida 10 µM (Bic) o LEE011 10 µM (LEE) durante 28 d (cuantificado mediante ImageJ). **D**, análisis por qPCR de dianas de E2F1, *DHFR* y *TK1*, en línea 22Rv1 independiente de andrógenos tratada con DMSO, MDV3100 10 µM (MDV), LEE011 10 µM (LEE) o MDV3100 10 µM y LEE011 10 µM (MDV + LEE) durante 48 h. **E**, ensayos de formación de colonias de células 22Rv1 tratadas con diversos compuestos indicados (DMSO, bicalutamida (Bic), MDV3100 (MDV) o LEE011 (LEE)) durante 14 d.

Figura 7. Representación esquemática de las estrategias terapéuticas que se pueden aplicar para actuar sobre AR-F877L. Izquierda, MDV3100 (círculos marrones) suprime la expresión de E2F1 y genes diana canónicos de AR al unirse a AR-WT (óvalos rojos). Centro, AR-F877L (óvalos verdes) utiliza MDV3100 como agonista y, por lo tanto, mantiene la expresión de E2F1 y genes diana canónicos de AR. Derecha, actuar sobre CDK4/6 o AR con antiandrógenos estructuralmente distintos puede afectar a la proliferación mediante la supresión de E2F1 y los genes diana canónicos de AR, respectivamente. La longitud de la flecha gris representa el nivel relativo de actividad de la ruta. Los círculos rojos y azules representan el inhibidor de CDK4/6 y la bicalutamida, respectivamente. EBS, sitios de unión a E2F1; ARE, elementos sensibles a los andrógenos.

Figura 8. Los clones poco y muy resistentes muestran resistencia parcial a MDV3100. Ensayos de formación de colonias a largo plazo para el control 1 (C1, izquierda), clon n.º 1 muy resistente (centro) y clon n.º 14 poco resistente (derecha) tratados con diversas concentraciones de MDV3100 (indicado en fuente amarilla, µM).

Figura 9. Los clones muy resistentes no muestran modulación de la actividad de la ruta de AR cuando se tratan con MDV3100. **A**, se realizó un análisis de agrupamiento para controles (agregados) y líneas resistentes utilizando una firma génica inducida por andrógenos. Se utilizaron todos los conjuntos de sondas que coinciden con genes de la firma génica inducida por andrógenos. Todos los datos de expresión se presentan como un factor de cambio promedio en muestras tratadas con MDV3100 vs tratadas con DMSO. **B**, análisis de la ruta de enriquecimiento que muestra las alteraciones en la actividad de la ruta de AR en controles (izquierda), líneas poco (centro) y muy resistentes (derecha) cuando se tratan con MDV3100 10 μ M durante 24 h. La correlación entre una firma génica de AR en comparación con los genes con una mejor calificación tras el tratamiento con MDV3100 10 μ M durante 24 h en los controles (izquierda), líneas poco resistentes (centro) y muy resistentes (derecha). La línea verde representa el nivel de actividad de la ruta: una desviación más fuerte de la diagonal negra representa una mayor inhibición de la actividad de la ruta debida al tratamiento con MDV3100.

Figura 10. Análisis por inmunoelectrotransferencia de la expresión de AR en las fracciones citoplasmáticas y nucleares aisladas del control (C1) y el clon muy resistente (n.º 1) tratados con DMSO, R1881 0,1 nM o MDV3100 10 μ M (MDV) durante 24 h. La β -tubulina y la histona H3 se unieron a una molécula detectable para validar la pureza de las fracciones citoplasmática y nuclear, respectivamente. Ambos también actuaron de controles de carga.

Figura 11. Gráficos de trazas de la secuenciación Sanger de ADN genómico aislado de un clon muy resistente (clon n.º 1) y poco resistente (clon n.º 10). La punta de flecha indica la presencia de dos nucleótidos en el clon n.º 1.

Figura 12. Las mutaciones W742C y W742L en AR confieren un cambio de antagonista a agonista específico para la bicalutamida. **A**, análisis por inmunoelectrotransferencia que muestra los niveles de expresión de AR después de la transfección transitoria de varios constructos de AR en células HEK293T. **B**, gráficos de barras que muestran la actividad del indicador de AR después de la cotransfección sin AR (izquierda) o con AR mutante W742L (centro) o W742C (derecha). Las células se trataron con vehículo (Veh), R1881 0,1 nM, MDV3100 10 μ M (MDV), bicalutamida 10 μ M (Bic), MDV3100 10 μ M + R1881 0,1 nM (M/R) o Bic 10 μ M + R1881 0,1 nM (B/R). Todos los datos se normalizaron respecto a la expresión de luciferasa de Renilla (R_{LUC}). Los datos representan la media $\pm$ EEM; $n = 3$. $^{**}P < 0,01$ (prueba de la t de Student).

Figura 13. La mutación F877L, sola o junto con T878A, confiere un cambio de antagonista a agonista específico para MDV3100 en células PC3. Gráficos de barras que muestran la actividad del indicador de AR después de la cotransfección con AR WT (izquierda), T878A (2.º), F877L (3.º) o con AR mutantes F877L/T878A (derecha) en PC3. Las células se trataron con vehículo (Veh), R1881 0,1 nM, MDV3100 10 μ M (MDV), bicalutamida 10 μ M (Bic), MDV3100 10 μ M + R1881 0,1 nM (M/R) o Bic 10 μ M + R1881 0,1 nM (B/R). Todos los datos se normalizaron respecto a la expresión de luciferasa de Renilla (R_{LUC}). Los datos representan la media $\pm$ EEM; $n = 3$. $^{*}P < 0,05$ (prueba de la t de Student).

Figura 14. Las LNCaP diseñadas para expresar de manera inducible AR T878A (barras rojas), F877L/T878A (barras verdes) o W742C/T878A (barras azules) muestran una sobreexpresión moderada según lo evaluado por qPCR (parte superior) e inmunoelectrotransferencia (parte inferior). -/+, sin tratar o se ha tratado con Dox respectivamente. Se utilizaron *TBP* y β -actina como controles de carga para qPCR y análisis por inmunoelectrotransferencia, respectivamente. Los datos representan la media $\pm$ EEM.

Figura 15. AR mutante F877L/T878A puede rescatar de manera eficaz la señalización de AR en presencia de MDV3100. Análisis por qPCR de la expresión de *KLK3* en varias líneas modificadas (vector-barras beige; T878A-barras rojas; F877L/T878A-barras verdes; W742C/T878A-barras azules) después del tratamiento con DMSO (Veh), MDV3100 10 μ M (MDV), bicalutamida 10 μ M (Bic) o hidroxiflutamida 10 μ M (OH-F) en RPMI 1640 complementado con un 10% de FCS. -/+, sin tratar o se ha tratado con Dox respectivamente. Se utilizó *TBP* para normalizar la expresión. Los datos representan la media $\pm$ EEM; $n = 3$. $^{*}P < 0,05$, $^{**}P < 0,01$ (prueba de la t de Student).

Figura 16. AR mutante F877L/T878A utiliza MDV3100 como agonista en medios con deficiencia de andrógenos. **A**, análisis por qPCR de la expresión de *KLK3* y *NKX3-1* en varias líneas modificadas (vector-barras beige; T878A-barras rojas; F877L/T878A-barras verdes; W742C/T878A-barras azules) tratadas con DMSO (Veh), R1881 0,1 nM (R1881) o MDV3100 10 μ M (MDV) en CSS al 10%. -/+, sin tratar o se ha tratado con Dox respectivamente. Se utilizó *TBP* para normalizar la expresión. Los datos representan la media $\pm$ EEM; $n = 3$. $^{*}P < 0,05$, $^{**}P < 0,01$ (prueba de la t de Student). **B**, análisis por inmunoelectrotransferencia de los niveles de expresión exógena de AR (se utiliza HA como molécula de unión detectable) en fracciones citoplasmáticas y nucleares de líneas modificadas con T878A y F877L/T878A tratadas con DMSO (Veh), R1881 0,1 nM (R1881) o MDV3100 10 μ M (MDV) durante 24 h. La β -tubulina (proteína citosólica) y la histona H3 (proteína nuclear) se unieron a una molécula detectable para verificar la pureza de las fracciones. Las líneas modificadas se cultivaron en CSS al 10% en presencia de Dox durante 3-4 d antes del tratamiento.

Figura 17. La mutación F877L en AR promueve la translocación nuclear en presencia de MDV3100. **B**, análisis por inmunoelectrotransferencia de la expresión exógena de AR (HA) en fracciones citoplasmáticas y nucleares aisladas de varias líneas modificadas tratadas con DMSO (D) o MDV3100 10 μ M (M) en medios complementados con 10% de FCS. Todas las líneas se pretrataron con Dox durante 3 d antes del tratamiento con DMSO o MDV3100 durante 24 h. F877L, F877L/T878A; W742C, W742C/T878A. La β -tubulina (β -tub) se unió a una molécula detectable para validar la pureza de las fracciones citoplasmáticas y la histona H3 (H3) se unió a una molécula detectable para validar la pureza de las fracciones nucleares. **B**, relación nuclear:citoplasmática de expresión exógena de AR (AR etiquetada con HA) en T878A (barras rojas), F877L/T878A (barras verdes) y W742C/T878A (barras azules) que sobreexpresan líneas tratadas con DMSO o MDV3100 10 μ M (MDV) durante 24 h. Los datos de inmunoelectrotransferencia presentados en la Fig. 5B y el panel **A** se analizaron con ImageJ para determinar las relaciones nucleares:citoplasmáticas. Las células se trataron con doxiciclina durante 3 d antes del tratamiento con DMSO o MDV3100 en las condiciones de cultivo indicadas (10% de FCS o 10% de CSS).

Figura 18. Los AR mutantes F877L/T878A y W742C/T878A confieren resistencia fenotípica a MDV3100. **A**, curvas de inhibición del crecimiento generadas para líneas modificadas tratadas con concentraciones crecientes de MDV3100 hasta 10 μ M. Dox-, rojo; Dox +, verde. Los datos se presentan como porcentaje de crecimiento relativo a la condición de

tratamiento en DMSO medido por el ensayo CellTiter-Glo. **B**, imágenes de contraste de fase de células tratadas con MDV3100 de **A** después de 10 d de tratamiento. Barra de escala, 50 μ M.

Figura 19. La sobreexpresión de AR-F877L en células LNCaP es suficiente para impulsar la resistencia genética y fenotípica a MDV3100. **A**, análisis por qPCR que muestra la expresión relativa de genes diana de AR posteriores (*KLK3*, *NKX3-1*, *SLC45A3*, *TMPRSS2*) en AR-WT (barras rojas) y AR-F877L (barras verdes) que expresan células LNCaP en condiciones de tratamiento con DMSO y MDV3100. Las células se trataron con Dox (+) durante 2 días antes del tratamiento con DMSO o MDV3100 durante 24 h. Los datos representan la media $\pm$ EEM. * $P < 0,05$ (prueba de la *t* de Student). **B**, ensayos de formación de colonias que muestran el crecimiento sostenido de células LNCaP que expresan AR-F877L (Dox +) en diversas concentraciones de MDV3100 (se señala en fuente negra, μ M).

Figura 20. Las células VCaP que expresan de manera estable la mutación F877L en AR son parcialmente resistentes a MDV3100. Las células VCaP que expresan AR-T878A siguen siendo sensibles a MDV3100 (izquierda) mientras que la expresión de AR-F877L/T878A da como resultado un crecimiento parcial en condiciones de tratamiento con MDV3100 (derecha). Los datos representan la media $\pm$ EEM. * $P < 0,05$ (prueba de la *t* de Student).

Figura 21. El tratamiento con MDV3100 de clones que albergan la variante AR-F877L no logra promover el crecimiento celular en medios con deficiencia de andrógenos *in vitro*. Gráficos de líneas que representan el impacto de concentraciones crecientes de tratamiento con R1881 (rojo), MDV3100 (verde) y bicalutamida (azul) en el crecimiento celular en células cultivadas en RPMI 1640 complementado con un 10% de CSS. Las dosis máximas aplicadas fueron R1881 10 nM y 10 μ M para MDV3100 y bicalutamida. Los datos se presentan como factor de cambio en número de células respecto a la condición de tratamiento con DMSO (medido con el ensayo CellTiter-Glo). Las células se trataron durante 13 d antes del análisis.

Figura 22. Medidas de peso corporal para xenoinjertos del control 1 y el clon n.º 1. Se midieron los pesos corporales del xenoinjerto del control 1, **A**, y del clon n.º 1, **B**, una vez a la semana. Los datos se presentan como media $\pm$ DE.

Descripción detallada de la invención

La presente divulgación se refiere a enfermedades relacionadas con el receptor de andrógenos (AR). La presente divulgación se refiere a una mutación novedosa y relevante desde un punto de vista clínico en la posición F877 en el receptor de andrógenos, que confiere resistencia al fármaco MDV3100 y es útil para la estratificación de pacientes. El receptor de andrógenos y fragmentos y variantes de este que comprenden esta mutación [AR (F877)] también son útiles para idear nuevos tratamientos que actúen sobre este receptor mutante. Además, el AR con mutación doble en las posiciones W742 y T878 y los fragmentos y variantes de este que comprenden esta mutación doble [AR (W742/T878)] también son resistentes a MDV3100 y útiles para la estratificación de pacientes. Por lo tanto, esta divulgación resulta útil en el pronóstico, diagnóstico y tratamiento de enfermedades relacionadas con AR, tales como enfermedades de la próstata, tales como el cáncer de próstata (PCa), que incluye PCa resistente a la castración (CRPC) y cáncer de mama, así como otros trastornos tales como enfermedad de poliglutamato, alopecia, hiperplasia prostática benigna, hirsutismo, acné, atrofia espinal y muscular y enfermedad de Kennedy.

A pesar de que el cáncer de próstata es uno de los cánceres diagnosticados con mayor frecuencia en el mundo, los científicos padecen una limitación de conocimientos, recursos y métodos analíticos que obstaculizan 1) el diagnóstico fiable del cáncer de próstata, 2) la capacidad de distinguir una enfermedad benigna de una potencialmente letal, y 3) la capacidad de tratar con eficacia a pacientes que han sufrido recaídas en terapias de privación de andrógenos. Las terapias de privación de andrógenos, incluida la castración química y quirúrgica, son eficaces inicialmente en el tratamiento de PCa dependiente de andrógenos. Sin embargo, la mayoría de los tumores reaparecen como una forma mucho más agresiva e incurable de PCa que se conoce como PCa resistente a la castración (CRPC). La naturaleza maligna de CRPC ha impulsado una campaña agresiva para acelerar el desarrollo de terapias eficaces que pueden usarse como terapias de segunda línea para mejorar las tasas de supervivencia de pacientes con CRPC. Con este fin, se han desarrollado antagonistas que compiten con los andrógenos para unirse a AR, basándose en el conocimiento de que los CRPC continúan dependiendo de la señalización de AR para sobrevivir. El éxito aquí ha sido marginal debido a 1) la ausencia de potencia de los compuestos, y 2) la adaptación de CRPC al promover un cambio de antagonista a agonista de manera que el compuesto paradójicamente mejora la señalización de AR. Para sortear estas limitaciones, la FDA ha aprobado recientemente un antagonista más potente, MDV3100 (enzalutamida), para el tratamiento de hombres con CRPC metastásico previamente tratados con docetaxel. En algunos casos, MDV3100 puede usarse como monoterapia, incluso en el cáncer de próstata resistente a la castración. Aunque el compuesto ha demostrado una tremenda eficacia en ensayos clínicos, muchos pacientes que inicialmente respondieron han desarrollado resistencia desde entonces. Se carece de una comprensión mecanicista de la resistencia y este conocimiento *a priori* es crucial para diseñar estrategias de tratamiento alternativas. Con este fin, esta divulgación presenta la identificación y caracterización de una mutación novedosa en AR, la diana directa de MDV3100, que confiere resistencia genética y fenotípica a MDV3100.

Para dilucidar los mecanismos de resistencia, esta divulgación utiliza LNCaP, un modelo utilizado previamente para identificar una mutación W742C relevante desde un punto de vista clínico que confiere resistencia a la bicalutamida, para establecer un modelo de resistencia espontánea específico para MDV3100. Se identificaron dos clases amplias de clones resistentes; aquellos que muestran sensibilidad o resistencia a la modulación de la ruta de AR después del tratamiento con MDV3100. Es emocionante que el análisis de sec-ARN haya identificado una mutación novedosa F877L/T878A en AR que se correlacionó con la resistencia a la modulación de la ruta por MDV3100. Los ensayos de transactivación junto con el análisis de líneas modificadas genéticamente confirmaron que la mutación promovió un cambio de antagonista a agonista para MDV3100, que en última instancia se traduce en resistencia fenotípica. Curiosamente, esta divulgación ha observado que esta mutación es sumamente selectiva para MDV3100, ya que el tratamiento con bicalutamida, un

antiandrógeno más antiguo, sensibiliza a las células de nuevo. Es probable que estos hallazgos tengan un tremendo impacto clínico ya que 1) la mutación se puede usar como un biomarcador para predecir la respuesta al fármaco, y 2) los pacientes que presentan la mutación F877L/T878A se pueden tratar fácilmente con bicalutamida para lograr un beneficio clínico.

Inesperadamente, esta divulgación también ha observado que una mutación W742C/T878A identificada previamente (que mostró previamente que confer  resistencia a la bicalutamida) también puede conferir parcialmente resistencia fenotípica a MDV3100. Sin desear limitarse a ninguna teoría en particular, esta divulgación especula que es probable que sea un efecto indirecto ya que el AR con mutación patológica adquiere una función activa constitutiva. De todos modos, es probable que este hallazgo tenga un impacto traslacional ya que los pacientes que presentan esta mutación probablemente no se beneficiarán de las terapias antiandr gicas. Además, el trabajo de los autores destaca la importancia de cribar otras mutaciones bien caracterizadas en el cáncer de próstata para determinar su potencial para conferir resistencia a MDV3100; se ha mostrado que mutaciones como H875Y, V716M y L702H/T878A poseen un espectro ampliado de sensibilidad al ligando, y se ha mostrado previamente que la hidroxiflutamida funciona como un agonista para estos mutantes. Los hallazgos de la divulgación actual probablemente establecerán el escenario para el descubrimiento acelerado de mutaciones impulsoras para varios estados patológicos que en última instancia afectarán al desarrollo y la implementación de estrategias terapéuticas. Esta divulgación hace las siguientes contribuciones: 1) al unir la tecnología de sec-ARN de alto rendimiento con un modelo de resistencia espontánea, esta divulgación identificó una mutación novedosa en AR que confiere resistencia genética y fenotípica al MDV3100, y aun así conserva la sensibilidad a la bicalutamida. Esto ayudará en la estratificación de pacientes y al desarrollo de estrategias de tratamiento alternativas. 2) Las líneas espontáneas de los autores representan al menos dos modos independientes de resistencia, un recurso que será de gran valor para la comunidad de PCa para un mayor estudio de los mecanismos de resistencia. 3) Esta divulgación muestra que una característica conservada de las mutaciones resistentes en la cavidad de unión al ligando de AR es que confiere un cambio de antagonista a agonista, a diferencia de otras clases de compuestos. Las composiciones que comprenden un AR(877) también pueden usarse para generar anticuerpos contra este polipéptido, y pueden usarse para generar agentes terapéuticos novedosos que actúan sobre este polipéptido y son útiles para tratar enfermedades relacionadas con el receptor de andrógenos, que incluyen, entre otros, cáncer de próstata y de mama.

Actuar sobre CDK4/6 como una estrategia terapéutica para resolver la resistencia a MDV3100

Una vez establecido que AR-F877L puede promover la resistencia a MDV3100 en diversos contextos genéticos *in vitro* e *in vivo*, el siguiente objetivo de los autores fue desarrollar estrategias racionales para antagonizar el alelo mutante. Como alternativa al desarrollo de antiandrógenos novedosos que continúan actuando sobre la cavidad hipermutable de unión al ligando de AR [Balbas *et al.* 2013 *eLife* 2: e00499], el objetivo de los autores fue identificar estrategias terapéuticas que pueden ser más sostenibles en la clínica. Con este fin, los autores observaron un enriquecimiento significativo en los genes que pertenecen a los conjuntos de genes del «ciclo celular» y «activación de E2F1» además de la «activación de AR» en clones muy resistentes tratados con MDV3100, lo que sugiere que estos clones pueden potencialmente mantener la proliferación en condiciones de tratamiento con MDV3100 a través de la expresión continua de genes diana de E2F1. Esta es una hipótesis atractiva ya que se sabe que la señalización de andrógenos, un regulador crucial de la transición G1-S, promueve el ensamblaje activo de CDK4/ciclina D1 y, por lo tanto, la activación de la función de E2F1. Schiewer *et al.* 2012 *End. Relat. Cancer* 9: 1-12. De acuerdo con esta noción, los autores observaron que el tratamiento con MDV3100 suprimió la expresión de los genes diana de E2F1 *DHFR* y *TK1* en una línea de control, lo que confirma la señalización de AR como un regulador de la función de E2F1. Por el contrario, las células portadoras de F877L fueron capaces de mantener una mayor expresión de *DHFR* y *TK1* en condiciones de tratamiento con MDV3100 en relación con una línea de control (Fig. 6A). Basándose en estos datos, razonamos que la actividad de E2F1 puede servir como un efector posterior de la señalización de AR, y como tal, los reguladores de la función de E2F1 pueden servir como nodos terapéuticos cruciales cuando las terapias dirigidas a AR se vuelvan ineficaces. De acuerdo con esta hipótesis, los autores observaron que el crecimiento de clones muy resistentes (Fig. 14B) y líneas de LNCaP modificadas para expresar AR-F877L/T878A (Fig. 6C) eran tan sensibles a los inhibidores de CDK4/6 LEE011 [Rader *et al.* 2013 CDK4/CDK6 inhibition is potently active in a definable subset of human neuroblastomas Asociación Estadounidense para la Investigación del Cáncer; Filadelfia, PA.] y PD0332991, como la bicalutamida. Curiosamente, la respuesta a la inhibición de CDK4/6 no solo se limitó a las células portadoras de F877L ya que las células 22Rv1 independientes de andrógenos, una línea de PCa que expresaba AR WT y capaz de mantener la señalización de AR y la expresión de *DHFR* y *TK1* en condiciones de tratamiento con MDV3100 (Fig. 6D), también mostraron una fuerte sensibilidad a la inhibición de CDK4/6 (Fig. 6E). Estos datos sugieren de manera acumulativa que actuar sobre la función de CDK4/6 puede servir como una estrategia eficaz para el tratamiento de múltiples mecanismos de resistencia a MDV3100 y la probable independencia de andrógenos en general.

DEFINICIONES

Por conveniencia, a continuación se proporciona el significado de ciertos términos y frases utilizados en la memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones adjuntas. Si existe una discrepancia aparente entre el uso de un término en otras partes de esta memoria descriptiva y su definición proporcionada en esta sección, prevalecerá la definición en esta sección.

RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

«Receptor de andrógenos» o «AR» se refiere al gen o producto génico (por ejemplo, un polipéptido) también conocido como NR3C4 (subfamilia de receptores nucleares 3, grupo C, miembro 4) y también conocido por los símbolos AR; AIS; DHTR; HUMARA HYSP1; KD; NR3C4; SBMA; SMAX1; y TFM; e ID externas OMIM: 313700 MGI: 88064 HomoloGene:

28 IUPHAR: NR3C4 ChEMBL: 1871. Se muestran una secuencia polipeptídica y una de nucleótidos de un AR de ejemplo en las SEQ ID NO: 1 y 2, respectivamente. Se muestra una secuencia polipeptídica de AR(F877) de ejemplo en la SEQ ID NO: 54.

El receptor de andrógenos es un tipo de receptor nuclear [Lu *et al.* 2006 *Pharmacol. Rev.* 58: 782-97] que se activa mediante la unión de cualquiera de las hormonas androgénicas testosterona o dihidrotestosterona [Roy *et al.* *Vitam Horm.* 55: 309-52] en el citoplasma y a continuación se transloca al núcleo. El receptor de andrógenos presenta la relación más estrecha con el receptor de progesterona, y las progestinas en dosis más elevadas pueden bloquear el receptor de andrógenos. Bardin *et al.* 1983 *Pharm. Ther.* 23: 443-59; y Raudrant *et al.* 2003 *Drugs* 63: 463-92. La función principal del receptor de andrógenos es como un factor de transcripción de unión al ADN que regula la expresión génica [Mooradian *et al.* 1987 *Endocr. Apocalipsis* 8: 1-28]; sin embargo, el receptor de andrógenos también tiene otras funciones [Heinlein *et al.* 2002. *Mol. Endocrinol.* 16: 2181-7]. Los genes regulados por andrógenos son cruciales para el desarrollo y mantenimiento del fenotipo sexual masculino.

La unión de andrógenos al receptor de andrógenos induce un cambio conformacional en el receptor, lo que da como resultado una disociación de las proteínas de choque térmico, dimerización y transporte desde el citosol hasta el núcleo celular donde el dímero del receptor de andrógenos se une a secuencias de ADN específicas, denominadas elementos de respuesta a hormonas o elementos de respuesta a andrógenos (ARE, por sus siglas en inglés). Dependiendo de la interacción con otras proteínas nucleares, el AR controla la expresión génica, ya sea aumentando o disminuyendo la transcripción de genes específicos, tales como el factor insulínico de crecimiento I (IGF-1, por sus siglas en inglés).

Los receptores de andrógenos también pueden tener actividades citoplasmáticas, aunque con proteínas de transducción de señales en el citoplasma. La unión de andrógenos a los receptores de andrógenos citoplasmáticos puede provocar cambios rápidos en la función celular independientemente de la transcripción génica, por ejemplo, el transporte de iones, así como también la influencia indirecta de la transcripción génica, por ejemplo, mediante la mediación de otras rutas de transducción de señales, lo que influye en la actividad de otros factores de transcripción.

SECUENCIA Y MUTACIONES DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

A continuación, se muestra la secuencia de aminoácidos de un AR de ejemplo:

```
MEVQLGLGRVYPRPPSKTYRGAFQNLFQSVREVIQNPGPRHPEAASAAPPGASLLLLLQQQ
QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQETSPPRQQQQQQGGEDGSPQAHRRGPTGYLVLDDEEQQPSQPQ
SALECHPERGCVPEPGAAVAASKGLPQQLPAPPDEDDSAAPSTLSLLGPTFPGLSSCSAD
LKDILSEASTMQLLQQQQQEAUVSEGGSSSGRAREASGAPTSSKDNYLGGTSTISDNAKELC
KAVSVSMGLGVEALEHLSPEQLRGDCMYAPLLGVPPAVRPTPCAPLAECKGSLDDDSAG
KSTEDTAEYSPFKGGYTKGLEGESLGCSSGSAAGSSGTLELPSTLSLYKSGALDEAAAYQ
SRDYNNFPLALAGPPPPPPPPHPPHARIKLENPLDYGSAAWAAAAAQCRYGDLASLHGAGAA
GPGSGSPSAAASSSWHTLFTAEEGQLYGPGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGEAGAVAP
YGYTRPPQGLAQESDFTAPDVWYPGGMVSRVPYPSPPTCVKSEMGPWMDSYSGPYGDMRL
ETARDHVLPIIDYYFPPQKTCLICGDEASGCHYGALTCGCKVFFKRAAEGKQKYL CASRN
DCTIDKFRRKNPCSCRLRKCYEAGMTLGARKLKKLGNLKLQEEGEASSTTSPTTEETTQKL
TVSHIEGYECQPIFLNVLEAIEPGVVCAGHDNNQPDFAALLSSLNELGERQLVHVVKWA
KALPGFRNLHVDDQMAVIQYSWMLMVFMGWRSFTNVNSRMLYFAPDLVFNEYRMHKS
RMYSQVVRMRHLSQEFGLQITPQEFCLMKALLLFSIIIPVDGLKNQKFFDELRMNYIKELD
RIIACKRKNPTSCSRRFYQLTKLLDSVQPIARELHQFTFDLLIKSHMVSVDFFPEMMAEII
```

SVQVPKILSGKVKPIYFHTQ (SEQ ID NO: 1)

Están subrayados varios aminoácidos de importancia:

W 742, mutado a W742C/L en varios tumores resistentes a la bicalutamida.

H 875, mutado a H875Y en varios tumores de próstata.

F 877, que se muestra en la presente que está mutado, por ejemplo, a F877L. Los AR con una única mutación F877L y mutación doble F877L/T878A tuvieron una respuesta de transactivación sustancial a MDV3100, lo que sugiere un cambio de antagonista a agonista que es sumamente específico para MDV3100.

T 878, mutado a T878A en una serie de tumores en estadio tardío y resistentes a la flutamida.

Las mutaciones adicionales que se sabe que ocurren en AR incluyen V716 y otras descritas en la presente y en la técnica.

El trabajo actual identifica la mutación F877L, vecina a la mutación T878A.

Esta divulgación también estudió la mutación W742C/T878A y descubrió que la expresión ectópica de esta proteína confiere resistencia no específica a MDV3100.

Estas mutaciones son útiles en la estratificación de pacientes y el desarrollo de terapias novedosas, como se divulga en la presente.

A continuación, se muestra la secuencia de nucleótidos de un AR de ejemplo:

ATGTGAAGTGCAGTTAGGGCTGGGAAGGGTCTACCTCGGCCCGCGTCCAAGACCTACCGAGGAGCTTTCC
AGAATCTGTTCCAGAGCGTGCGCGAAGTGATCCAGAACCCGGGCCCCAGGCACCCAGAGGCCGCGAGCGC
AGCACCTCCCGGCGCCAGTTTGCTGCTGCTGTCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG
CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAAGAGACTAGCCCCAGGCAGCAGCAGCAGCAGCAGGGGTGAGG
ATGGTTCTCCCCAAGCCCATCGTAGAGGGCCCCACAGGCTACCTGGTCCCTGGATGAGGAACAGCAACCTTC
ACAGCCGCAGTCGGCCCTGGAGTGCCACCCGAGAGAGGTTGCGTCCCAGAGCCTGGAGCCGCCGTGGCC
GCCAGCAAGGGGCTGCCGCAGCAGCTGCCAGCACCTCCGGACGAGGATGACTCAGCTGCCCCATCCACGT
TGTCCTCTGCTGGGCCCCACTTTCCCCGGCTTAAGCAGCTGCTCCGCTGACCTTAAAGACATCCTGAGCGA
GGCCAGCACCATGCAACTCCTTCAGCAACAGCAGCAGGAAGCAGTATCCGAAGGCAGCAGCAGCGGGAGA
GCGAGGGAGGCCTCGGGGGCTCCCACTTCTCCAAAGGACAATTACTTAGGGGGCACTTCGACCATTTCTG
ACAACGCCAAGGAGTTGTGTAAGGCAGTGTCGGTGTCATGGGCCTGGGTGTGGAGGCGTTGGAGCATCT
GAGTCCAGGGGAACAGCTTCGGGGGGATTGCATGTACGCCCCACTTTTGGGAGTTCCACCCGCTGTGCGT
CCCCTCCTTGTGCCCCATTGGCCGAATGCAAAGGTTCTCTGCTAGACGACAGCGCAGGCAAGAGCACTG
AAGATACTGCTGAGTATTTCCCTTTCAAGGGAGGTTACACCAAAGGGCTAGAAGGCAGAGCCTAGGCTG
CTCTGGCAGCGCTGCAGCAGGGAGCTCCGGGACACTTGAAGTCCGCTCTACCTGTCTCTCTACAAGTCC
GGAGCACTGGACGAGGCAGCTGCGTACCAGAGTCGCGACTACTACAACCTTTCCACTGGCTCTGGCCGGAC
CGCCGCCCCCTCCGCCGCTCCCATCCCCACGCTCGCATCAAGCTGGAGAACCCGCTGGACTACGGCAG
CGCCTGGGCGGCTGCGGCGGCGCAGTGCCGCTATGGGGACCTGGCGAGCCTGCATGGCGCGGGGTGCAGCG
GGACCCGGTTCTGGGTCACCTCAGCCGCCGCTTCCTCATCTTGCACACTCTCTTACAGCCGAAGAAG
GCCAGTTGTATGGACCGTGTGGTGGTGGTGGGGGTGGTGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG
CGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGAGGCGGGAGCTGTAGCCCCCTACGGCTACACTCGGCCCCCTCAGGGGCTG
GCGGGGCCAGGAAAGCGACTTCACCGCACCTGATGTGTGGTACCCTGGCGGCATGGGTGAGCAGAGTGCCCT

ATCCACGATCCCACCTTGTGTCAAAGCGAAATGGGCCCTGGATGGATAGCTACTCCGGACCTTACGGGGA
CATGCGTTTGGAGACTGCCAGGGACCATGTTTTGCCCATTGACTATTACTTTCCACCCAGAAGACCTGC
CTGATCTGTGGAGATGAAGCTTCTGGGTGTCACTATGGAGCTCTCACATGTGGAAGCTGCAAGGTCTTCT
TCAAAGAGCCGCTGAAGGGAAACAGAAGTACCTGTGCGCCAGCAGAAATGATTGCACTATTGATAAATT
CCGAAGGAAAAAATTGTCCATCTTGTCTGCTTCGGAAATGTTATGAAGCAGGGATGACTCTGGGAGCCCGG
AAGCTGAAGAACTTGGTAATCTGAAACTACAGGAGGAAGGAGAGGCTTCCAGCACACCAGCCCCACTG
AGGAGACAACCCAGAAGCTGACAGTGTACACATTGAAGGCTATGAATGTCAGCCCATCTTTCTGAATGT
CCTGGAAGCCATTGAGCCAGGTGTAGTGTGTGCTGGACACGACAACAACCAGCCCGACTCCTTTGCAGCC
TTGCTCTCTAGCCTCAATGAACTGGGAGAGAGACAGCTTGTACACGTGGTCAAGTGGGCCAAGGCCTTGC
CTGGCTTCCGCAACTTACACGTGGACGACCAGATGGCTGTCAATTCAGTACTCCTGGATGGGGCTCATGGT
GTTTGGCCATGGGCTGGCGATCCTTCACCAATGTCAACTCCAGGATGCTCTACTTTCGCCCCCTGATCTGGTT
TTCAATGAGTACCGCATGCACAAGTCCCGGATGTACAGCCAGTGTGTCCGAATGAGGCACCTCTCTCAAG
AGTTTGGATGGCTCCAAATCACCCCCAGGAATTCCTGTGCATGAAAGCACTGCTACTCTTCAGCATTAT
TCCAGTGGATGGGCTGAAAAATCAAAAATTCTTTGATGAACTTCGAATGAACTACATCAAGGAACTCGAT
CGTATCATTGCATGCAAAAAGAAAAATCCACATCCTGCTCAAGACGCTTCTACCAGCTCACCAAGCTCC
TGGACTCCGTGCAGCCTATTGCGGAGAGAGCTGCATCAGTTTCACTTTTGGACCTGCTAATCAAGTCACACAT
GGTGAGCGTGGACTTTCCGGAAATGATGGCAGAGATCATCTCTGTGCAAGTGCCCAAGATCCTTTCTGGG
AAAGTCAAGCCCATCTATTTCCACACCCAGTGA (SEQ ID NO: 2)

5

Los codones correspondientes a los aminoácidos de importancia mencionados anteriormente (W742, H875, F877 y T 878) están subrayados.

De estos:

TTC. mutó a CTC en todos los clones resistentes de los autores

10 ACT, mutó a GCT en varios tumores en estadio tardío y resistentes a la flutamida

MUTACIONES DE AR

La presente divulgación se refiere a un receptor de andrógenos completo o fragmentos o variantes que comprenden una mutación en F877 y/o una mutación doble en W742 y T878, donde opcionalmente el AR o fragmento o variante puede comprender mutaciones adicionales.

15

Tal como se define en la presente, una «mutación» (por ejemplo, de AR) puede comprender una delección o sustitución de un aminoácido.

Tal como se define en la presente, un «fragmento» o «variante» de AR comprende un polipéptido derivado del AR o una forma acortada de este. Un AR «completo», como se describe en la presente, incluye un polipéptido que comprende una secuencia de AR completa, por ejemplo, que comprende la secuencia completa mostrada en la SEQ ID NO: 1 o 54. Un fragmento de AR incluye, sin carácter limitante, un AR que comprende menos de la secuencia completa (por ejemplo, menos de la que se muestra en la SEQ ID NO: 1 o 54), pero que retiene al menos una actividad mediada por AR o un mutante de AR [tal como AR(F877)]. Una variante es un fragmento o AR completo que se ha modificado. Dichas modificaciones incluyen, sin carácter limitante, una modificación postraduccional (PEGilación, glucosilación, metilación, etc.). Las modificaciones de AR o fragmentos también incluyen combinaciones de AR o un fragmento con un componente adicional, que puede estar unido de manera covalente o no covalente. Dichos otros componentes pueden incluir un compañero de fusión (tal como Fc, tal como FcLALA), que forma un polipéptido de fusión o una proteína de fusión.

Los fragmentos y variantes de AR pueden comprender diversas isoformas de AR y/o comprender uno o más de los dominios de AR. Se sabe que AR existe en dos isoformas: AR-A (87 kDa), que está truncada en el extremo N y carece de los primeros 187 aa (aminoácidos), como resultado de la proteólisis *in vitro*. La isoforma AR-B es de 100 kDa y completa. Véase: Wilson *et al.* 1994 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1234-8; y Gregory *et al.* 2001 2001. *J. Mol. Endocrinol.* 27: 309-19.

Los fragmentos también pueden incluir aquellos que «abarcan» la posición F877, tal como se describe en la presente.

Los diversos dominios de AR incluyen el dominio regulador N-terminal (que incluye la función de activación 1, AF-1; la función de activación 5, AF-5 y la superficie de dimerización), un dominio de unión a ADN (DBD, por sus siglas en inglés), una región de bisagra, un dominio de unión al ligando (LBD, por sus siglas en inglés) y un dominio C-terminal. Un AR(F877) y AR(W742/T878), por ejemplo, puede tener uno o más dominios, siempre que la secuencia de AR(F877) y AR(W742/T878) abarque las posiciones F877, o 742 y 878, respectivamente.

También cabe señalar que las mutaciones del receptor de andrógenos comprenden tanto delecciones como sustituciones de aminoácidos particulares. Por lo tanto, un AR(F877) es un AR completo o un fragmento de longitud completa o una variante que puede tener una delección en F877; por lo tanto, no hay un aminoácido en la posición que normalmente corresponde a F877 (por ejemplo, como se muestra en la SEQ ID NO: 54). Por lo tanto, el AR(F877) puede comprender un aminoácido en la posición 876 ligado directamente al aminoácido correspondiente a la posición 878, omitiendo F877. Los aminoácidos en las posiciones 876 y 878 pueden, en diversas realizaciones, estar mutados opcionalmente.

Los términos «AR(F877)» y «AR (W742/T878)», por lo tanto, se pretende que incluyan cualquier AR completo, fragmento, variante u otra forma de este que retiene al menos una actividad mediada por AR y que comprende, respectivamente, una mutación en F877 o una mutación doble tanto en W742 como en T878, que comprende opcionalmente mutaciones adicionales.

La divulgación también se refiere a composiciones que comprenden un «polipéptido», «resto polipeptídico», «proteína» de AR(F877) y AR(W742/T878) y similares. Los términos «polipéptido», «resto polipeptídico», «proteína» y similares se usan indistintamente en la presente para referirse a cualquier polímero de residuos aminoácidos de cualquier longitud.

El polímero puede ser lineal o no lineal (por ejemplo, ramificado), puede comprender aminoácidos modificados o análogos de aminoácidos, y puede estar interrumpido por restos químicos distintos de los aminoácidos. Los términos también abarcan un polímero de aminoácidos que ha sido modificado de manera natural o mediante intervención; por ejemplo, mediante la formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como la conjugación con un componente de marcado o bioactivo.

Por lo tanto, la presente descripción se refiere a AR o fragmentos o variantes de este que comprenden una mutación en F877 o una mutación doble en W742/T878, que comprenden opcionalmente otras mutaciones, que son útiles en la estratificación de pacientes y/o en la generación de agentes terapéuticos novedosos para su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el receptor de andrógenos.

ACTIVIDADES DE AR WT O MUTANTE

En varios aspectos, el fragmento y/o variante del AR o un AR mutante (como AR(F877) y/o AR (W742/T878) retiene al menos una actividad del polipéptido completo WT o mutante (por ejemplo, un polipéptido de las SEQ ID NOs: 1 o 54). Dichas actividades incluyen: sin carácter limitante, un andrógeno, testosterona y/o dihidrotestosterona; incapacidad para unirse a MDV3100; un cambio conformacional tras unirse a un ligando; disociación de proteínas de choque térmico; transporte desde el citosol hasta el núcleo celular; dimerización; capacidad de unirse al ADN; unión específica de la secuencia a una secuencia HRE (siglas en inglés de elemento de respuesta a hormonas) en el ADN; regulación de la transcripción génica; una función en la fosforilación de otros receptores; interacción con proteínas de transducción de señales en el citoplasma; función de activación 1 (AF-1, por sus siglas en inglés) para una actividad transcripcional total activada por el ligando; función de activación 2 (AF-2), responsable de la actividad inducida por el agonista; y/o interacción con AKT1, BAG1, Beta-catenina, BRCA1, C-jun, Calmodulina 1, Caveolin 1, CDK9, COX5B, proteína de unión a CREB, Ciclina D1, Cinasa dependiente de ciclinas 7, Proteína asociada a la muerte 6, Eliminada en cáncer colorrectal (*Deleted in Colorectal Cancer*), EFCAB6, receptor del factor de crecimiento epidérmico, FOXO1, GAPDH, Gelsolina, GNB2L1, GSK3B, HDAC1, HSP90AA1, HTATIP, MAGEA11, MED1, MYST2, NCOA1, NCOA2, NCOA3, NCOA4, NCOA6, NCOR2, NONO, PA2G4, PAK6, PATZ1, PIAS2, PRPF6, PTEN, RAD9A, RANBP9, RCHY1, proteína de retinoblastoma, RNF14, RNF4, SART3, SMAD3, receptor SPH (*Small heterodimer partner*), Src, SRY, STAT3, SVIL, receptor testicular 2, receptor testicular 4, TGFB111, TMF1, TRIM68, UBE2I, UXT y/o ZMIZ1, o que media en la inmunogenicidad específica [por ejemplo, un fragmento de AR(F877) puede ser cualquier fragmento que sea lo suficientemente largo como para imitar la inmunogenicidad o que pueda usarse para elevar o provocar anticuerpos que se unen al fragmento o secuencia de AR o AR(F877) correspondiente]. Por lo tanto, por ejemplo, un fragmento de AR(F877) es cualquier fragmento que retiene la actividad de ser capaz de provocar una respuesta inmunitaria específica a una secuencia de todo el AR(F877) o un

fragmento de este que abarca el AR(F877).

Al menos una de esas actividades de AR es retenida por un mutante, fragmento o variante de AR, tal como AR(F877) o AR(W742/T878), que se describen con más detalle a continuación.

5 AR(F877)

Tal como se detalla en la presente, la aparición de la mutación F877 en AR se correlacionó con la respuesta de AR atenuada al MDV3100 y la proliferación sostenida durante el tratamiento. Se conservó una mutación recurrente de F877L en el gen AR entre los cuatro clones muy resistentes (descritos en la presente) y no se observó en clones poco resistentes o líneas celulares de control. La mutación F877 permite que AR(F877L) use MDV3100 como agonista y, coherente con esto, las células portadoras de F877L requirieron la presencia de MDV3100 para el crecimiento *in vivo*.

El mecanismo por el cual MDV3100 inhibe la señalización de AR se ha atribuido en parte a su capacidad para obstaculizar la translocación nuclear de AR. Tran *et al.* 2009 *Science* 324: 787-90. La mutación F877 se ubica en el dominio de unión al ligando de AR. Para evaluar el potencial impacto de la mutación F877L en la respuesta a MDV3100, los autores modelaron computacionalmente la unión de MDV3100 a los receptores de tipo natural (WT) y mutantes. Los autores observaron que en los modos de acoplamiento del estado antagonista de AR WT, MDV3100 solo mostraba una interacción débil con AR(F877). Sin embargo, en presencia de la mutación F877L, el motivo de benzamida de MDV3100 puede extenderse al canal de acceso creado por el residuo de leucina más pequeño. Esto podría potencialmente evitar que el compuesto choque con la hélice-12 del dominio de unión al ligando de AR en el modo agonista. Por lo tanto, el modelado computacional sugirió que la mutación F877L en AR puede anular la actividad antagonista de MDV3100 y podría potencialmente permitir la actividad agonista.

Un «AR(F877)» o «AR-F877», como se define en la presente, es un polipéptido o similar que comprende el receptor de andrógenos o un fragmento o variante de este que comprende o abarca la posición 877, donde el aminoácido en la posición 877 es sustituido o eliminado o no es fenilalanina (F) (donde la posición de los aminoácidos está de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 54). Un «AR(F877L)» o «AR-F877L», como se define en la presente, es un polipéptido o similar que comprende el receptor de andrógenos o un fragmento o variante de este que comprende o abarca la posición 877, donde el aminoácido en la posición 877 es sustituido con Leucina (L) (donde la posición de los aminoácidos está de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 54).

Por lo tanto, un «AR(F877)» comprende la totalidad o un fragmento de la SEQ ID NO: 54, a continuación (que es idéntica a la SEQ ID NO: 1, excepto en que la F877 está indicada con una «X», lo que significa que cualquier aminoácido diferente de F puede utilizarse para sustituir esta posición, o que este aminoácido puede ser eliminado). Por lo tanto, en un AR(F877), la posición X puede estar eliminada o puede ser cualquier aminoácido diferente de F.

A continuación se muestra un ejemplo no limitante de una secuencia polipeptídica de AR(F877):

```
MEVQLGLGRVYPRPPSKTYRGAFQNLFSVREVIQNPGPRHPEAASAAPPGASLLLLLQQQ
QQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQETSPRQQQQQQQGEDGSPQAHRRGPTGYLVLDDEEQQPSQPQ
SALECHPERGCVPEPGAAVAASKGLPQQLPAPPDEDDSAAPSTLSLLGPTFPGLSSCSAD
LKDILSEASTMQLLQQQQQEAVSEGSSSGRAREASGAPTSSKDNYLGGTSTISDNAKEIC
KAVSVSMGLGVEALEHLSPEQLRGDCMYAPLLGVPPAVRPTPCAPLAECKGSLDDDSAG
KSTEDTAEYSPFKGGYTKGLEGESLGCSSGSAAGSSGTLELPSTLSLYKSGALDEAAAYQ
SRDYNNFPLALAGPPPPPPPPHAPHARIKLENPLDYGSAAWAAAAAQCXYGDLASLHGAGAA
GPGSGSPSAAASSSWHTLFTAEEGQLYGPCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGEAGAVAP
YGYTRPPQGLAQESDFTAPDVWYPGGMVSRVPYPSPTCVKSEMGPWMDSYSGPYGDMRL
ETARDHVLPIIDYFPPQKTCLICGDEASGCHYGALTGCKVFFKRAAEGKQKYL CASRN
DCTIDKFRKNCPSRLRKCYEAGMTLGARKLKLGNLKLQEEGEASSTTSPTTEETTQKL
TVSHIEGYECQPIFLNVLEAIEPGVVCAGHDNNQPDFAALLSSLNELGERQLVHVVKWA
KALPGFRNLHVDDQMAVIQYSWMGLMVFAMGWSFTNVNSRMLYFAPDLVFNEYRMHKS
MYSQCVRMRHLSQEFGLQITPQEFCLMKALLLSIIIPVDGLKNQKFFDEL RMNYIKELD
RIIACKRKNTSCSRRFYQLTKLLDSVQPIARELHQXTFDLLIKSHMVSVDFFPEMMAEII
SVQVPKILSGKVKPIYFHTQ (SEQ ID NO: 54)
```

Por lo tanto, los polipéptidos de AR(F877) de ejemplo o fragmentos o variantes de estos pueden comprender un subconjunto de la SEQ ID NO: 54, por ejemplo, ELHQXTFDLL (SEQ ID NO: 20), LHQXTF (SEQ ID NO: 21), HQXTFD (SEQ ID NO: 22), QXTFD (SEQ ID NO: 23), etc., donde X se elimina o es cualquier aminoácido diferente de F. Otros ejemplos no limitantes de polipéptidos de AR(F877) incluyen aquellos que comprenden, por ejemplo, cualquiera de las SEQ ID NOs: 3-53, como se muestra en la presente. En diversas realizaciones, el fragmento puede mediar en cualquier actividad de un AR.

El término «AR(F877)» también abarca explícitamente AR con una delección en la posición F877. Por lo tanto: «expansión» significa que el AR mutante comprende una secuencia tal que el aminoácido en la posición F877 está ausente o se ha eliminado. Por ejemplo, un AR mutante que comprende una secuencia que «abarca» F877 puede comprender una secuencia de aminoácidos que comprende, entre otros, los aminoácidos en las posiciones 876 y 878 pero no F877. En

otro ejemplo no limitante, el AR mutante que comprende una secuencia que «abarca» F877 puede comprender un hueco de 1, 2, 3 o 4 aminoácidos que incluye F877; por ejemplo, el AR mutante puede tener una secuencia que comprende los aminoácidos en las posiciones 876 y 879 (que carece de los que están entre ellos, incluidos 877 y F878), o que comprende los aminoácidos en las posiciones 875 y 878 (que carece de los intermedios, incluidos 876 y 877) . Por lo tanto, los polipéptidos de AR(F877) de ejemplo o fragmentos o variantes de estos pueden comprender, por ejemplo, ELHQ_T (SEQ ID NO: 24), LHQ_TF (SEQ ID NO: 25), HQ_TFD (SEQ ID NO: 26) o Q_TFDL (SEQ ID NO: 27), etc., donde «_» indica una delección del aminoácido en la posición F877.

El AR(F877) puede comprender mutaciones adicionales, tales como en la posición T878. Los AR(F877) específicos incluyen aquellos designados, por ejemplo, «F877L» («AR F877L») o «F877L/T878A» («AR F877L/T878A»), lo que indica que tienen una sustitución de F a L en la posición 877, o sino tanto una sustitución de F a L en la posición 877 como una sustitución de T a A en la posición 878.

Un polipéptido, fragmento o variante de AR(F877) puede, por lo tanto, comprender un subconjunto de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, donde el subconjunto comprende la posición 877, que se representa como «X» para indicar que en la posición 877 está cualquier aminoácido diferente de fenilalanina (F). Por lo tanto, un polipéptido, fragmento o variante de AR(F877) puede comprender, sin carácter limitante y entre otros, por ejemplo:

PIARELHQXT (SEQ ID NO: 3)
 IARELHQXTF (SEQ ID NO: 4)
 ARELHQXTFD (SEQ ID NO: 5)
 RELHQXTFDL (SEQ ID NO: 6)
 ELHQXTFDLL (SEQ ID NO: 7)
 LHQXTFDLLI (SEQ ID NO: 8)
 HQXTFDLLIK (SEQ ID NO: 9)
 QXTFDLLIKS (SEQ ID NO: 10)
 QXTFDLLIKSH (SEQ ID NO: 11)

Como alternativa, un polipéptido, fragmento o variante de AR(F877) puede comprender, por lo tanto, una secuencia que abarca la posición 877, donde se elimina el aminoácido en su posición, que se representa como «_» a continuación. Por lo tanto, un polipéptido, fragmento o variante de AR(F877) puede comprender, sin carácter limitante y entre otros, por ejemplo:

QPIARELHQ_T (SEQ ID NO: 28)
 PIARELHQ_TF (SEQ ID NO: 29)
 IARELHQ_TFD (SEQ ID NO: 30)
 ARELHQ_TFDL (SEQ ID NO: 31)
 RELHQ_TFDLL (SEQ ID NO: 32)
 ELHQ_TFDLLI (SEQ ID NO: 33)
 LHQ_TFDLLIK (SEQ ID NO: 34)
 HQ_TFDLLIKS (SEQ ID NO: 35)
 Q_TFDLLIKSH (SEQ ID NO: 36)

En algunas realizaciones, un polipéptido, fragmento o variante de AR(F877) puede comprender una mutación en una o más de otras posiciones, además de una mutación en F877.

Por lo tanto, en algunas realizaciones, el polipéptido, fragmento o variante de AR(F877) puede comprender una mutación tanto en F877 (indicado por la primera «X» en la secuencia «XX») como en T878 (indicado por la segunda «X» en la secuencia «XX»), a continuación. Por lo tanto, un polipéptido, fragmento o variante de AR(F877) puede comprender, sin carácter limitante y entre otros, por ejemplo:

QPIARELHQXX (SEQ ID NO: 37)
 PIARELHQXXF (SEQ ID NO: 38)
 IARELHQXXFD (SEQ ID NO: 39)
 ARELHQXXFDL (SEQ ID NO: 40)
 RELHQXXFDLL (SEQ ID NO: 41)
 ELHQXXFDLLI (SEQ ID NO: 42)
 LHQXXFDLLIK (SEQ ID NO: 43)
 HQXXFDLLIKS (SEQ ID NO: 44)
 QXXFDLLIKSH (SEQ ID NO: 45)

En algunas realizaciones, el polipéptido, fragmento o variante de AR(F877) puede comprender mutaciones en: H875 (indicada por la «X» en la secuencia «XQXX»); F877 (indicada por la segunda «X» en la secuencia «XQXX») y T878 (indicada por la tercera «X» en la secuencia «XQXX»), a continuación. Por lo tanto, un polipéptido, fragmento o variante de AR(F877) puede comprender, sin carácter limitante y entre otros, por ejemplo:

QPIARELXQXX (SEQ ID NO: 46)
 PIARELXQXXF (SEQ ID NO: 47)

IARELXQXXFD (SEQ ID NO: 48)
 ARELXQXXFDL (SEQ ID NO: 49)
 RELXQXXFDLL (SEQ ID NO: 50)
 ELXQXXFDLLI (SEQ ID NO: 51)
 5 LXQXXFDLLIK (SEQ ID NO: 52)
 XQXXFDLLIKS (SEQ ID NO: 53)

En diversas otras realizaciones, el polipéptido, fragmento o variante de AR(F877) puede comprender una sustitución o
 10 delección en F877 y una o más de otras mutaciones, modificaciones, etc. El polipéptido, fragmento o variante de AR(F877)
 puede comprender una variedad mixta de mutaciones de tipo delección y sustituciones.

OTRAS MUTACIONES DE AR

Se han descrito previamente otras mutaciones de AR.

Las mutaciones W742, por ejemplo, W742C, se producen en varios tumores resistentes a la bicalutamida. Hara *et al.*
 15 *Cancer Res.* 63: 149-153 (2003). Taplin *et al. J. Clin. Oncol.* 21: 2673-2678 (2003); Haapala *et al. Labor. Invest.* 81: 1647-
 1651 (2001). Esta divulgación muestra que esta mutación, combinada con una mutación en T878 también puede conferir
 parcialmente resistencia fenotípica a MDV3100. Sin desear limitarse a ninguna teoría en particular, esta divulgación
 especula que esto puede que se deba a un efecto indirecto ya que el AR con mutación doble adquiere una función activa
 constitutiva.

Se sabe que las mutaciones H875, tales como H875Y, se producen en varios tumores de próstata.

En la presente se muestra que las mutaciones F877, por ejemplo, F877L, provocan resistencia a MDV3100. Sin embargo,
 los pacientes que presentan la mutación F877L/T878A pueden tratarse fácilmente con tratamientos que carecen de
 MDV3100, tales como la bicalutamida, para lograr un beneficio clínico.

Sin embargo, cabe señalar que los mutantes únicos W742C/L son sensibles (al menos según lo determinado por los
 25 ensayos con indicadores); sin embargo, el AR W742C/T878A adquiere actividad constitutiva y muestra resistencia
 fenotípica.

Se sabe que las mutaciones T878, por ejemplo, T878A, se producen en varios tumores en estadio tardío y resistentes a
 la flutamida. Fenton *et al. Clin. Cancer Res.* 3: 1383-1388 (1997); Taplin *et al. Cancer Res.* 59: 2511-2515 (1999). Esta
 divulgación muestra que la mutación doble en W742 y T878 también provoca resistencia a MDV3100.

Las mutaciones AR adicionales incluyen, por ejemplo, aquellas en L702 (por ejemplo, L702H), V716 (por ejemplo, V716M),
 30 Q903 (por ejemplo, Q903R) y A722 (por ejemplo, A722T). Fenton *et al. Clin. Cancer Res.* 3: 1383-1388 (1997). Se sabe
 que algunos sitios de mutación tienen relevancia clínica. Por ejemplo, se ha mostrado que H875Y, V716M y L702H/T878A
 poseen un espectro ampliado de sensibilidad al ligando, y previamente se ha mostrado que la hidroxi-flutamida funciona
 como un agonista para estos mutantes. Fenton *et al. Clin. Cancer Res.* 3: 1383-1388 (1997); Hara *et al. Cancer Res.* 63:
 35 149-153 (2003); Veldscholte *et al. Biochem.* 31: 2393-2399 (1992); Zhao *et al. Nature Med.* 6: 703-706 (2000). Se sabe
 que los mutantes T878A, T878S y H875Y presentan mayores respuestas tanto al estradiol como a la progesterona en
 relación con AR WT. AR H875Y y T878S pueden activarse con nilutamida. Véase: Fenton *et al. Clin. Cancer Res.* 3: 1383-
 1388 (1997) y referencias citadas en él.

Los sitios que se sabe que son susceptibles de ser mutados a veces se denominan «puntos calientes».

En la estratificación de pacientes y el diseño de la pauta farmacológica, deben tenerse en cuenta las funciones conocidas,
 40 las sensibilidades farmacológicas y los cambios de antagonista a agonista de diversas mutaciones de AR conocidas.

Si bien, en algunos casos, solo se ha descrito una sustitución para una posición particular, esta divulgación contempla
 que cualquier aminoácido (o ninguno en absoluto en el caso de una delección) puede estar en el sitio de una mutación.
 Por lo tanto, la divulgación contempla que cualquier aminoácido diferente de F (o ninguno en absoluto) pueda estar en la
 45 posición F877 en AR(F877). Las sustituciones preferidas son aquellas que demuestran la capacidad (como la mostrada
 por F877L) de ser resistentes a MDV3100. De manera similar, cualesquiera aminoácidos pueden ser sustituidos (o la
 posición eliminada) en la mutación doble de W742/T878, especialmente si la mutación doble (como la de W742C/T878A)
 también confiere resistencia a MDV3100.

A continuación se presentan una descripción y discusión adicionales de la mutación AR(F877) y la mutación doble
 50 W742/T878. En estos textos, la divulgación analiza: si el ejemplo F877L de la mutación AR(F877) es preexistente o
 adquirido en respuesta a MDV3100; la mutación W742C/T878A confiere indirectamente resistencia a MDV-3100; el
 cambio de antagonista a agonista; y mecanismos alternativos de resistencia a MDV3100.

F877L: Mutación en puntos calientes en AR en respuesta al tratamiento con MDV3100

La aparición relativamente rápida de la mutación F877L durante la selección *in vitro* (Fig. 3A, B) inicialmente sugirió que
 esta mutación probablemente existía previamente en una frecuencia baja. Sin embargo, el hecho de que dos sustituciones
 de nucleótidos independientes dieran lugar a la mutación F877L durante la selección *in vivo* (Fig. 3D y E) implica que la
 mutación puede haberse adquirido durante el tratamiento. Dado que las células LNCaP poseen defectos en el mecanismo
 de reparación de errores del emparejamiento (MMR, por sus siglas en inglés), deficiencias que también se ha observado
 60 que existen en un subconjunto de PCa [Chen *et al. 2001 Cancer Res.* 61: 4112-21] es concebible que puedan adquirir
 más fácilmente esta mutación (con o sin tratamiento con MDV3100). Sin embargo, el hecho de que Balbas y colegas
 (2013) también informaran de la aparición espontánea de F877L tras el tratamiento prolongado de las células CWR22PC
 [Balbas *et al. 2013 eLife* 2: e00499], una línea que se cree que posee un mecanismo de MMR intacto, sugiere que F877L
 puede ser realmente una mutación de un punto caliente que puede poseer la capacidad de conferir resistencia en los
 65 tumores de próstata independientemente del estado de MMR.

La mutación W742C/T878A confiere indirectamente resistencia a MDV3100

Se señaló anteriormente que el AR (W742/T878) con mutación doble, además de AR(F877) confiere resistencia a MDV3100.

Aunque ha resultado algo inesperado, esta divulgación observó sistemáticamente que expresar el AR W742C/T878A, aunque con niveles de expresión mucho mayores que el alelo F877L/T878A, confiere resistencia fenotípica a MDV3100. Es probable que este fenómeno sea un efecto indirecto como consecuencia de que el AR W742C/T878A mutante adquiere características constitutivamente activas, en apoyo de un informe anterior. Hara, T., *et al. Cancer research* **63**, 149-153 (2003). Aunque el análisis de la expresión génica sugiere que esta mutación puede rescatar la actividad de la ruta de AR de manera más eficaz que el AR T878A mutante en presencia de MDV3100 (**Fig. 5a**), esto es probablemente independiente de MDV3100 ya que la expresión ectópica de este alelo puede potenciar significativamente la señalización de AR en las condiciones de referencia (**Fig. 15 y 16a** y datos no mostrados). En apoyo de esto, esta divulgación observa una mayor ubicación nuclear del AR W742C/T878A mutante en las condiciones de referencia en relación con el AR T878A en condiciones de deficiencia de andrógenos. Si bien la ubicación nuclear sigue siendo sensible a MDV3100, ya que el tratamiento reduce significativamente la ubicación, el nivel de la proteína W742C/T878A nuclear sigue siendo más elevado que el AR T878A después del tratamiento con MDV3100, lo que se traduce en un mayor grado de resistencia. Aunque es probable que el mecanismo de resistencia sea indirecto por las razones descritas anteriormente, sigue siendo una observación notable, ya que implicaría que es probable que MDV3100 u otros antiandrógenos sean completamente ineficaces y los tratamientos de «bloqueo de andrógenos combinado» que usan otras clases de antagonistas de AR o terapias combinadas con agentes que también actúan sobre otras rutas de señalización clave, puede que sean más eficaces en el tratamiento de tumores que albergan la mutación W742C/T878A.

El hallazgo inesperado de que el alelo W742C/T878A puede conferir resistencia parcial a MDV3100 sugiere que es necesario cribar las funciones de otras mutaciones muy documentadas en AR en muestras clínicas de cáncer de próstata. Taplin, M.E., *et al. The New England journal of medicine* **332**, 1393-1398 (1995); Marcelli, M., *et al. Cancer research* **60**, 944-949 (2000); y Culig, Z., *et al. Molecular endocrinology* **7**, 1541-1550 (1993). Se ha mostrado que varias mutaciones tales como H875Y, V716M y L702H/T878A poseen un espectro ampliado de sensibilidad al ligando, y previamente se ha mostrado que la hidroxiflutamida funciona como un agonista para estos mutantes. Fenton, M.A., *et al. Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* **3**, 1383-1388 (1997); Hara, T., *et al. Cancer research* **63**, 149-153 (2003); Veldscholte, J., *et al. Biochemistry* **31**, 2393-2399 (1992); y Zhao, X.Y., *et al. Nature medicine* **6**, 703-706 (2000). Por lo tanto, será importante desde un punto de vista clínico estudiar si alguna de las mutaciones de AR identificadas previamente también puede conferir resistencia a MDV3100 y, de ser así, combinar esas mutaciones con F877L para predecir la sensibilidad al fármaco en el entorno clínico.

Por lo tanto, un análisis de una muestra de paciente que se estudia para determinar la presencia o ausencia de una mutación en la posición 877 en AR (por ejemplo, AR(F877) también puede, opcionalmente, estudiarse para determinar la presencia o ausencia de la mutación doble en las posiciones 742 y 878 (por ejemplo, AR(W742/T878). La presencia o ausencia de estas mutaciones, como se describe en la presente, tiene implicaciones para la estratificación de pacientes y el diseño de pautas farmacológicas.

Cambio de antagonista a agonista y estrategias terapéuticas alternativas

Esta divulgación muestra que la mutación AR(F877) no solo permite la resistencia a MDV3100, sino que provoca un cambio de antagonista a agonista, en el que las células que expresan AR(F877) crecen mejor o crecen únicamente en presencia de MDV3100.

Un tema recurrente en la resistencia adquirida a los antiandrógenos es la aparición de mutaciones que en última instancia pueden utilizar el inhibidor de bajo peso molecular como agonista. T878A/S, W742C/L y (como se muestra en la presente) F877L (**Fig. 15**) promueven un cambio de antagonista a agonista para hidroxiflutamida, bicalutamida y MDV3100, respectivamente. Esto está en marcado contraste con la resistencia observada para otras clases de inhibidores, tales como los que actúan sobre BCR-ABL [Gorre, ME, *et al. Science* **293**, 876-880 (2001)], donde las mutaciones hacen que las dianas moleculares no respondan al agente terapéutico. El hecho de que este cambio sea una característica tan común para los antiandrógenos sugiere que 1) se deben desarrollar compuestos más potentes con mejores índices terapéuticos, o 2) se deben buscar estrategias terapéuticas alternativas. Para abordar el primer punto, Sawyers y Jung desarrollaron recientemente un antiandrógeno de última generación AFN-509, que se muestra más potente, tiene un índice terapéutico más elevado y una semivida más larga, todo lo cual debería traducirse en una menor resistencia. Clegg *et al. Cancer Res.* **72**: 1494-1503 (2012). Si los estudios futuros identifican mutaciones que confieren resistencia específicas para AFN-509 a pesar del elevado índice terapéutico, entonces probablemente deberían buscarse estrategias alternativas que actúen sobre AR, estrategias que puedan ser menos susceptibles a la resistencia por parte de mutaciones en AR. Una de esas estrategias puede incluir combinar dos antiandrógenos (en combinación o de manera secuencial) con la esperanza de que la probabilidad de mutaciones que confieran resistencia a ambos se reduzca enormemente. En segundo lugar, estrategias tales como el desarrollo de antagonistas peptídicos específicos para AR 1) que bloquean la función de activación 2 (AF2) [Gao, W. *Current pharmaceutical design* **16**, 1106-1113 (2010)], o 2) que actúan sobre el dominio N-terminal, de manera similar a EPI-001 que se muestra que inhibe la transcripción del gen indicador activado por el dominio N-terminal, pueden servir como opciones viables. Gao, W. *Current pharmaceutical design* **16**, 1106-1113 (2010); y Andersen, R. J., *et al. Cancer cell* **17**, 535-546 (2010). Como alternativa, en lugar de comprometer la función de los dominios individuales en AR, también se pueden considerar compuestos que desestabilizan/degradan AR.

Después de haber demostrado que MDV3100 puede actuar como un agonista de la ruta de AR en clones que albergan la mutación F877L, esta divulgación posteriormente cuestionó si este cambio a agonista puede mejorar el crecimiento

celular en condiciones de deficiencia de andrógenos. Curiosamente, aunque el cambio no logró impulsar la proliferación de los clones portadores de F877L *in vitro*, esta divulgación observó un notable crecimiento dependiente de MDV *in vivo*. Mientras que los tumores C1 (control 1) mostraron estasis inmediata después del tratamiento con MDV3100, el crecimiento de los tumores del clon n.º 1 [AR(F877)] fue realmente estimulado por MDV3100, ya que 11 de 15 ratones

tratados con MDV presentaron tumores en comparación con 2 de 15 en el grupo de vehículo. Además, los tumores del clon n.º 1 [AR(F877)] continuaron creciendo en presencia de MDV3100, de acuerdo con observaciones anteriores. En conjunto, estos datos sugieren que la mutación F877L probablemente media en la resistencia genética y fenotípica a MDV3100 al permitir que el AR mutante utilice el MDV3100 como agonista. En varios experimentos descritos en la presente, el vehículo es DMSO.

Además, los autores han mostrado aquí que la mutación F877L es suficiente para inducir resistencia genética y fenotípica a MDV3100 en células LNCaP modificadas genéticamente.

La función de otorgar resistencia de AR(F877) es ampliamente aplicable a varias líneas celulares de cáncer de próstata. Las líneas VCaP humana (que alberga la fusión TMPRSS2-ERG y amplificación de AR) y Myc-CaP murina (sobrexpresión de Myc) se transdujeron para expresar de manera estable el AR mutante. De acuerdo con el fenotipo de resistencia observado en las células LNCaP, ambas líneas también presentaron resistencia parcial a MDV3100.

Además, los autores mostraron que las células portadoras de AR(F877) son resistentes a MDV3100 en la configuración de castración *in vivo*. Los autores observaron una marcada dependencia de MDV3100 para el crecimiento *in vivo* cuando se implantaron células que portaban F877L en ratones machos castrados.

Los autores también mostraron que actuar sobre CDK4/6 es una estrategia terapéutica para superar la resistencia a MDV3100, usando los inhibidores de CDK4/6 LEE011 y PD033299.

Esta divulgación muestra que LEE011 y PD0332991 pueden usarse como agentes terapéuticos para enfermedades relacionadas con AR. Esto incluye enfermedades relacionadas con AR donde AR comprende una mutación F877. Además, PD0332991, LEE011 y otros inhibidores de CDK4/6 son útiles como agentes terapéuticos contra enfermedades relacionadas con AR donde AR es de tipo natural. Por ejemplo, como se muestra en la presente, una línea de PCa que expresa AR WT (de tipo natural) y capaz de mantener la señalización de AR y la expresión de DHFr y TK1 en condiciones de tratamiento con MDV3100 también mostró una fuerte sensibilidad a la inhibición de CDK4/6.

Mecanismos alternativos de resistencia a MDV3100

Se han señalado dos mecanismos de resistencia para MDV3100: la expresión de variantes de corte y empalme que dan lugar a la activación constitutiva de AR independiente del ligando [Li, Y., *et al. Cancer research* **73**, 483-489 (2013)] y la activación de la ruta de señalización de PI3K. Mulholland, D.J., *et al. Cancer cell* **19**, 792-804 (2011); y Carver, B.S., *et al. Cancer cell* **19**, 575-586 (2011). Sin embargo, en el trabajo de los autores, los clones poco resistentes (F877L nula) no expresaron isoformas de AR truncadas (datos no mostrados) y siguieron mostrando la actividad de PI3K de las condiciones de referencia (datos no mostrados), lo que sugiere que ninguno es un mecanismo de resistencia importante en estos clones. A favor, la expresión ectópica de la variante de V7, una isoforma relevante desde un punto de vista clínico de AR que está sumamente expresada en pacientes con CRPC, en las células LNCaP no pudo conferir resistencia fenotípica a MDV3100 a pesar de un fuerte rescate en la señalización de AR (datos no mostrados), lo que respalda un estudio anterior. Watson, P.A., *et al. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 16759-16765 (2010)]. Teniendo en cuenta los datos presentados en la presente, pero sin desear ceñirse a ninguna teoría en particular, esta divulgación es coherente con la idea de que el mecanismo de resistencia utilizado por los clones que carecen del alelo F877L es probable que impulse la resistencia general a los antiandrógenos (basándose en la falta de especificidad a MDV3100). Es posible que mutaciones exclusivas de estos clones, como una mutación en la tirosinasa BMX, una cinasa que previamente se mostró que impulsa el crecimiento resistente a la castración en el cáncer de próstata [Dai, B., *et al. Cancer research* **70**, 5587-5596 (2010)], potencialmente puedan servir como un motor de resistencia general. En la actualidad, están en curso estudios de seguimiento que exploran la posible función de mutaciones adicionales identificadas por el análisis de sec-ARN.

En resumen, esta divulgación establece firmemente el alelo F877L/T878A como un impulsor de la resistencia genética y fenotípica a MDV3100 que mantiene la sensibilidad a la bicalutamida. Las implicaciones clínicas son de largo alcance; 1) la mutación puede actuar como un biomarcador utilizado para predecir la sensibilidad al fármaco en pacientes, y 2) los pacientes que presentan esta mutación pueden ser tratados como alternativa con bicalutamida para lograr un beneficio clínico (Fig. 7).

Por lo tanto, la presente divulgación muestra que la mutación AR(F877) y la mutación doble AR(W742/T878) son ambas relevantes desde un punto de vista clínico, al conferir resistencia a MDV3100, y son útiles para la estratificación de pacientes y el diseño de pautas farmacológicas durante el tratamiento de diversas enfermedades relacionadas con AR, que se analizan con mayor detalle a continuación.

ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL RECEPTOR DE ANDRÓGENO

La sobreexpresión y/más mutación del receptor de andrógenos se ha señalado en varias enfermedades, como el cáncer, incluidos el cáncer de próstata y el cáncer de mama, así como en otros trastornos como la enfermedad de poliglutamato, alopecia (por ejemplo, alopecia androgénica), hiperplasia prostática benigna, hirsutismo, acné, atrofia espinal y muscular y enfermedad de Kennedy. Véase: Sawaya *et al. J. Cutaneous Med. Surg.* **3**: 9-15 (1998); Schmidt *et al. Gyn. Obstet. Invest.* **22**: 206-211 (1986); Giovannucci *et al. Prostate* **39**: 130-134 (1999); Amato *et al. Neurology* **43**: 4791 (1993); Ferlini *et al. Am. J. Med. Gen.* **55**: 105-111 (2005); Monks *et al., PNAS* **2** de noviembre de 2007; Hillmer *Am. J. H. Genet.* **77**: 140-148 (2005); documento WO 2012/065051 y documento US 2010/0022632 y referencias citadas en ellos.

A continuación, se describen con más detalle enfermedades relacionadas con AR tales como enfermedades de próstata y cáncer de mama.

ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS: ENFERMEDADES DE LA PRÓSTATA

Por «próstata» se entiende el órgano muscular y glandular que rodea la uretra de los hombres en la base de la vejiga. La próstata es un órgano no esencial. La próstata ayuda a producir y almacenar líquido seminal. En los hombres adultos, la próstata típica mide aproximadamente tres centímetros de largo y pesa aproximadamente veinte gramos. Está ubicada en la pelvis, debajo de la vejiga urinaria y frente al recto. La próstata rodea parte de la uretra, el tubo que transporta la orina desde la vejiga durante la micción y el semen durante la eyaculación. La próstata contiene muchas glándulas pequeñas que producen alrededor de un veinte por ciento del líquido que constituye el semen.

Por «enfermedades de la próstata» se entiende cualquier enfermedad que afecte a la próstata, como la hiperplasia prostática benigna (BPH, por sus siglas en inglés), la prostatitis y el cáncer de próstata (PCa), incluido PCa resistente a la castración (CRPC). Las enfermedades de la próstata a veces causan síntomas como micción frecuente, nocturia (aumento de la micción por la noche), dificultad para comenzar y mantener un flujo constante de orina, hematuria (sangre en la orina) y disuria (micción dolorosa). Muchos afectados por la enfermedad de la próstata no muestran síntomas.

Las enfermedades de la próstata incluyen la hiperplasia prostática benigna (BPH), aunque la función exacta del AR en la BPH sigue sin aclararse. Chatterjee *Mol. Cell. Biochem.* 253: 89-101 (2003); y Ho *et al. Nat. Rev. Urol.* 8: 29-41 (2011) y referencias citadas en él. La BPH es un aumento en el tamaño de la próstata y provoca obstrucción urinaria, lo que da como resultado incontinencia urinaria. Ocurre en casi un 80% de los hombres de 80 años de edad. La BPH a menudo se trata mediante cirugía con una resección transuretral de la próstata (TURP, por sus siglas en inglés). Este procedimiento es muy común: cada año se realizan 500 000 TURP en EE. UU. y la BPH es la segunda causa más común de cirugía en los hombres. Desafortunadamente, un efecto secundario de la TURP es la eliminación de los conductos eyaculadores y los haces nerviosos del pene, lo que resulta en impotencia en un 90% de los pacientes. Actualmente, la farmacoterapia para el tratamiento de la BPH tiene como objetivo relajar el músculo liso de la próstata (bloqueo alfa ₁) y disminuir el volumen de la próstata (supresión de andrógenos). Se han realizado ensayos clínicos para evaluar los bloqueadores alfa₁ selectivos, antiandrógenos e inhibidores de la 5-alfa-reductasa para el tratamiento de la BPH. La finasterida, un inhibidor de la 5-alfa-reductasa, ha mostrado una capacidad de provocar regresión de la glándula prostática hiperplásica en la mayoría de los pacientes. Mocellini *et. al.* (1993) *Prostate* 22:291; y Marberger (1998) *Urology* 51:677-86.

Otra enfermedad de la próstata es la prostatitis. La prostatitis es la inflamación de la próstata. El término «prostatitis» se refiere a la inflamación histológica del tejido de la glándula prostática. Como todas las formas de inflamación, puede asociarse con una respuesta adecuada del cuerpo a una infección, pero también ocurre en ausencia de infección.

Por «cáncer de próstata» o «PCa» y similares se entiende una forma de cáncer que se desarrolla en la próstata. El receptor de andrógenos está implicado en el cáncer de próstata. Por «cáncer» se entiende la presencia anómala de células que exhiben un crecimiento relativamente autónomo, de modo que exhiben un fenotipo de crecimiento aberrante caracterizado por una pérdida significativa del control de la proliferación celular. Un tipo de PCa es el PCa resistente a la castración (CRPC).

Una realización de la presente invención comprende métodos para tratar el cáncer de próstata.

La mayoría de los cánceres de próstata son de crecimiento lento, aunque algunos casos son agresivos. Las células cancerosas pueden dar lugar a metástasis desde la próstata a otras partes del cuerpo, tales como los huesos o los ganglios linfáticos. El cáncer de próstata puede causar dolor, dificultad para orinar, problemas durante las relaciones sexuales y/o disfunción eréctil.

La presencia del cáncer de próstata puede estar indicada por síntomas, examen físico, antígeno prostático específico (PSA) o biopsia.

Se han implicado muchos genes diferentes en el cáncer de próstata, incluidos el receptor de andrógenos, BRCA1 y BRCA2, HPC1, receptor de la vitamina D y TMPRSS2-ERG y TMPRSS2-ETV1/4. Los genes supresores de tumores implicados incluyen P53, PTEN y KAI1, E-cadherina y CD44.

El cáncer de próstata es un adenocarcinoma o cáncer glandular, que comienza cuando las células normales de la glándula prostática secretoras de semen mutan en células cancerosas. La región de la glándula prostática donde el adenocarcinoma es más común es la zona periférica. Inicialmente, pequeños grupos de células cancerosas permanecen confinadas en las glándulas prostáticas que de otro modo serían normales, una afección conocida como carcinoma *in situ* o neoplasia intraepitelial prostática (PIN, por sus siglas en inglés). Con el tiempo, estas células cancerosas comienzan a multiplicarse y extenderse al tejido prostático circundante (el estroma) y forman un tumor. En última instancia, el tumor puede crecer lo suficiente como para invadir órganos cercanos tales como las vesículas seminales o el recto, o las células tumorales pueden desarrollar la capacidad de viajar en el torrente sanguíneo y el sistema linfático. El cáncer de próstata se considera un tumor maligno porque es una masa de células que puede invadir otras partes del cuerpo. Esta invasión de los órganos se llama metástasis. El cáncer de próstata suele producir metástasis en los huesos, los ganglios linfáticos y puede invadir el recto, la vejiga y los uréteres inferiores.

La sobreexpresión y/o mutación del receptor de andrógenos está implicada en varias enfermedades diferentes, incluido el cáncer de mama.

ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS: CÁNCER DE MAMA

El receptor de andrógenos está expresado con frecuencia en tumores primarios de mama; la expresión se estima entre un 50% y un 90%, dependiendo del estudio y el subtipo de cáncer de mama. Véase: Birrell *et al. J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 52: 459-467 (1995); Moinfar *et al. Cancer* 98: 703-711 (2003); Buchanan *et al. Cancer Res.* 65: 8487-8496 (2005); Doane *et al. Oncogene* 25: 3994-4008 (2006); y Gonzalez-Angulo *et al. Clin. Cancer Res.* 15: 2472-2478 (2009). Sin

embargo, no está claro si el AR actúa como un supresor tumoral o un oncogén. Este papel multifuncional puede explicarse en parte por las numerosas rutas en las que se ha publicado que está implicado el AR, pero también desde un punto de vista metabólico, ya que los andrógenos están situados entre las rutas de síntesis de progesterona y estrógeno que pueden tener funciones opuestas. Iacopetta *et al.* *Drug Disc. Today: Disease Mech.* (2012).

Varios mecanismos de señalización contribuyen a la función del AR en el cáncer de mama. Se ha publicado que el AR ejerce sus efectos de tres maneras: (i) señalización genómica, donde el AR interactúa y controla directamente la expresión de genes codificados en el ADN; (ii) señalización no genómica, en la que el receptor nuclear señala a través de interacciones con otras proteínas, y existe una comunicación cruzada entre los dos mecanismos de señalización pero aún no se ha entendido completamente; y (iii) señalización a través de comunicación cruzada con factores de crecimiento y citocinas. Véase: Rahman *et al.* *Trends Endocrin. Metab.* 18: 371-378 (2007); e Iacopetta *et al.* *Drug Disc. Today: Disease Mech.* (2012).

El AR tiene un beneficio clínico potencial tanto en los tumores positivos como negativos para el receptor de estrógeno (ER, por sus siglas en inglés). En comparación con el ER, AR contiene dominios funcionales únicos con relevancia para su papel alterado en el cáncer de mama humano. La mayoría de los tumores positivos para ER expresan AR, y un porcentaje significativo de tumores negativos para ER podría beneficiarse de la actuación combinada sobre AR y el oncogén ErbB2/HER2. La señalización posterior al AR también podría afectar muchas rutas importantes desde un punto de vista clínico que también son dianas clínicas emergentes en el cáncer de mama. La expresión de AR también podría desempeñar una función durante la progresión del tumor a enfermedad metastásica. Para consultar una revisión, véase Iacopetta *et al.* 2012. *Drug Disc. Today: Disease Mech.*

En algunos estudios, el receptor de andrógenos se expresa en de un 60% a un 85% de los cánceres de mama, y en algunos casos está más expresado que el receptor de estrógeno (ER) o el receptor de progesterona (PR, por sus siglas en inglés). Además, los estudios epidemiológicos han observado que niveles elevados de andrógenos circulantes están asociados con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama, en particular entre las mujeres posmenopáusicas. Las funciones biológicas de los andrógenos en la mama no se comprenden completamente ya que no está claro si los efectos de los andrógenos en las células de la mama son predominantemente proliferativos o antiproliferativos. Recientemente, se ha explorado el efecto de los andrógenos en líneas celulares de cáncer de mama y la posible función de la ruta del receptor de andrógenos en el cáncer de mama. Los resultados sugieren un posible efecto antiproliferativo de la estimulación del receptor de andrógenos y la activación de la ruta en el cáncer de mama.

Recientemente ha habido interés en evaluar la expresión del receptor de andrógenos entre las categorías de cáncer de mama invasivo definidas a nivel molecular, particularmente entre los grupos triple negativo (o de tipo basal) y HER2 que se consideran que son negativos para receptores de hormonas. Sin embargo, se carece de estudios basados en poblaciones grandes que investiguen la expresión del receptor de andrógenos en relación con el fenotipo molecular o entre mujeres con carcinoma ductal *in situ*. Por lo tanto, un objetivo de esta divulgación es examinar la expresión del receptor de andrógenos en relación con el estadio del tumor, las características patológicas y el fenotipo molecular utilizando una población grande y bien caracterizada de mujeres con cáncer de mama. Véase Collins *et al.* 2011 *Mod. Pathol.* 24: 924-931 y referencias citadas en él.

Collins *et al.* 2011 *Mod. Pathol.* 24: 924-931 también observó que, en general, un 77% de los carcinomas de mama invasivos eran positivos para el receptor de andrógenos. Entre 2171 cánceres invasivos, un 64% fueron luminales A, un 15% luminales B, un 6% HER2 y un 11% de tipo basal. La frecuencia de la expresión del receptor de andrógenos varió significativamente entre los fenotipos moleculares ($p < 0,0001$). En particular, la expresión del receptor de andrógenos se observa habitualmente en los cánceres luminales A (91%) y B (68%), pero se detecta con menos frecuencia en los cánceres HER2 (59%). A pesar de estar definido por la ausencia de expresión del receptor de estrógeno y progesterona y de considerarse que no responde a hormonas, un 32% de los cánceres de tipo basal expresaron el receptor de andrógenos. Entre 246 casos de carcinoma ductal *in situ*, un 86% fueron positivos para el receptor de andrógenos, pero la frecuencia de la expresión del receptor de andrógenos difirió significativamente entre los fenotipos moleculares ($p = 0,001$) y las lesiones de grado nuclear alto fueron menos propensas a ser positivas para el receptor de andrógenos en comparación con las lesiones de grado menor.

Se ha propuesto MDV3100 como un posible tratamiento para al menos algunos tipos de cáncer de mama. Naderi *et al.* *Breast Cancer Res.* 13: R36 (2011). Por lo tanto, esta divulgación tiene implicaciones para el posible uso de este fármaco en el tratamiento de este tipo de enfermedad relacionada con AR, ya que los pacientes con cáncer de mama con muestras que expresan AR(F877) o la mutación doble de AR(W742/T878) es probable que sean resistentes a MDV3100.

Por lo tanto, la sobreexpresión y/más mutación del receptor de andrógenos se ha señalado en varias enfermedades, como el cáncer, incluidos el cáncer de próstata y el cáncer de mama, así como en otros trastornos como la enfermedad de poliglutamato, alopecia (por ejemplo, alopecia androgénica), hiperplasia prostática benigna, hirsutismo, acné, atrofia espinal y muscular y enfermedad de Kennedy.

Por lo tanto, la presente descripción se refiere a AR o fragmentos o variantes de este que comprenden una mutación en F877 o una mutación doble en W742/T878, que comprenden opcionalmente otras mutaciones, que son útiles en la estratificación de pacientes y/o en la generación de agentes terapéuticos novedosos para su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el receptor de andrógenos, tales como las enumeradas anteriormente. La utilidad de estas mutaciones en la estratificación y el tratamiento de pacientes se detallan a continuación.

TRATAMIENTOS PARA ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

La presente divulgación se refiere a mutaciones en el receptor de andrógenos, que son útiles para diagnosticar, pronosticar y tratar enfermedades relacionadas con AR. La presencia o ausencia de estas mutaciones puede usarse para decidir entre una variedad de diferentes tipos de tratamientos de las enfermedades.

Estos tratamientos son útiles para suprimir la proliferación de células y atenuar la enfermedad en un individuo. Los tratamientos se suministrarían en una cantidad eficaz o una cantidad terapéutica.

Tal como se usa en la presente, el «tratamiento» es una estrategia para obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados, que incluyen, sin carácter limitante, la supresión de la proliferación de células de la próstata. A efectos de esta invención, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, sin carácter limitante, alivio de los síntomas, disminución de la extensión de la enfermedad, estabilización (es decir, sin empeoramiento) del estado patológico, prevención de la propagación (es decir, metástasis) de la enfermedad, retraso o ralentización de la progresión de la enfermedad, mejora o atenuación del estado patológico, mejora en la calidad del disfrute de la vida y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o indetectable. «Tratamiento» también puede referirse a prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no recibe tratamiento. Los tratamientos pueden ser, por ejemplo, capaces de suprimir la proliferación de células o atenuar una enfermedad.

"Suprimir la proliferación de células" se refiere a que se inhibe la proliferación de células, por ejemplo, de la glándula prostática, células tumorales derivadas de la próstata, incluidos los tumores metastásicos, o cualesquiera células que expresen PSA; o del tejido mamario, particularmente las células de cáncer de mama.

«Atenuar» una enfermedad significa que la extensión y/o manifestaciones clínicas indeseables de un estado patológico se reducen y/o el curso temporal de la progresión se ralentiza o se alarga, en comparación con la no administración de conjugados de análogos de poliamina de la presente invención.

La presente divulgación también se refiere a tratamientos de un individuo, usando una cantidad eficaz o una cantidad terapéutica de un tratamiento.

Un «individuo» es un vertebrado, preferentemente un mamífero, más preferentemente un ser humano. Los mamíferos incluyen, sin carácter limitante, animales de granja, animales de deporte, roedores, primates y mascotas. Preferentemente, se sabe o se sospecha que el individuo está afectado por una enfermedad de la próstata, tal como BPH, prostatitis y/o cáncer de próstata.

Una «cantidad eficaz» o «cantidad terapéutica» es una cantidad suficiente para lograr resultados clínicos beneficiosos o deseados. Se puede administrar una cantidad eficaz en una o más administraciones. Para los fines de esta invención, una cantidad eficaz de un conjugado de análogos de poliamina es una cantidad que es suficiente para atenuar, mejorar, estabilizar, revertir, retrasar o ralentizar la progresión del estado patológico. Una cantidad terapéutica de un conjugado de análogos de poliamina de la presente invención es una cantidad suficiente para inhibir la proliferación de células de la próstata. Se considera que un conjugado de análogos de poliamina es un agente eficaz para tratar enfermedades de la próstata si es eficaz contra, por ejemplo, al menos un tipo de línea celular de cáncer de próstata, incluso si no es eficaz contra una línea celular de próstata diferente.

TRATAMIENTOS PARA ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS: VARIAS TERAPIAS Y TRATAMIENTOS

Se han utilizado diversos tratamientos diferentes para las enfermedades relacionadas con AR. La presente divulgación se refiere a mutaciones particulares en AR, que son útiles para estratificar a los pacientes y decidir entre los posibles tratamientos de la enfermedad.

Por ejemplo, si un paciente presenta AR(F877), un tratamiento que comprenda MDV3100 no sería útil, pero podría usarse un tratamiento que no comprenda MDV3100 (tal como bicalutamida, LEE011, un ácido nucleico terapéutico u otros tratamientos). Si un paciente presenta AR(W742/T878), un tratamiento que comprenda MDV3100 o bicalutamida no sería útil, pero se podría utilizar un tratamiento que no comprenda ninguno de estos componentes (tal como un inhibidor de CDK4/6 tal como LEE011 o PD0332991, un ácido nucleico terapéutico u otros tratamientos).

Se han utilizado una variedad de otros tratamientos para enfermedades relacionadas con AR que no comprenden MDV3100 y/o bicalutamida. Estos incluyen cirugía (por ejemplo, prostatectomía radical), diversas formas de radioterapia (por ejemplo, braquiterapia y radioterapia de haz externo), ultrasonido focalizado de alta intensidad (HIFU, por sus siglas en inglés), criocirugía y terapia hormonal y/o fármacos quimioterápicos. Las terapias adicionales para enfermedades relacionadas con AR incluyen, sin carácter limitante, terapias de privación de andrógenos, que incluyen castración química y quirúrgica, glicilciclina, pirimidinas de oxindol bencílico, derivados de tienopiridina, destiazolil-ritonavir, indolin-2-onas y azaindolin-2-onas, derivados de isoflavona, derivados de nitrilo, inhibidores de stat5, inhibidores de la bomba de protones, ciclopropildicarboxamidas y análogos, análogos de 3-desoxi-2-metilen-19-nor-vitamina-D y terapias de ácidos nucleicos. US 2012/0329761; US 2012/0329771; US 2012/329774; US 2012/0329841; US 2012/0321639; US 2012/0322820; US 2012/0322834; USPN 8 338 422; USPN 8 338 624; USPN 8 338 454; WO 2012/174095. Se conocen terapias adicionales en la técnica para tratar enfermedades relacionadas con el receptor de andrógenos (AR), tales como enfermedades de la próstata, tales como cáncer de próstata (PCa), incluidos PCa resistente a la castración (CRPC) y cáncer de mama, así como otros trastornos relacionados con AR, tales como la enfermedad de poliglutamato, alopecia, hiperplasia prostática benigna, hirsutismo, acné, atrofia espinal y muscular y enfermedad de Kennedy.

A continuación se describen con más detalle los tratamientos con MDV3100, bicalutamida, un inhibidor de CDK4/6 tal como LEE011 o PD0332991 y ácidos nucleicos terapéuticos.

TRATAMIENTOS PARA ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS: MDV3100

«MDV3100», «MDV-3100», «Enzalutamida», «XTANDI®» (nombre comercial), «cápsulas de XTANDI®» y similares se refieren a un inhibidor del receptor de andrógenos, comercializado por Astellas Pharma US, Inc., Northbrook, IL, y Medivation Inc., San Francisco, CA, cuyo nombre químico es 4-{3-[4-ciano-3-(trifluorometil)fenil]-5,5-dimetil-4-oxo-2-sulfanilidenoimidazolidin-1-il}-2-fluoro-N-metilbenzamida. El principio activo de XTANDI® es enzalutamida; los ingredientes inactivos son: polioxiglicéridos de caprilcaproílo, hidroxianisol butilado, hidroxitolueno butilado, gelatina,

solución de sorbitol-sorbitán, glicerina, agua purificada, dióxido de titanio, óxido de hierro negro. MDV3100 es un potente antiandrógeno y carece de actividad agonista. Tran *et al. Science* 324: 787-790 (2009). MDV3100 está indicado para el tratamiento de pacientes con cáncer de próstata metastásico resistente a la castración que hayan recibido previamente docetaxel. Para consultar referencias, véase: Scher *et al. N. Engl. J. Med.* 2012; 367:1187-1197; y Patentes de EE. UU. N.ºs 7 709 517 y 8 183 274.

MDV3100 ha sido elegido por Astellas Pharma y Medivation Inc. para el desarrollo clínico basándose en la actividad en modelos de cáncer de próstata con sobreexpresión del receptor de andrógenos. La enzalutamida es distinta de los agentes antiandrógenos disponibles en la actualidad ya que inhibe la translocación nuclear del receptor de andrógenos, la unión al ADN y el reclutamiento de coactivadores. También tiene una mayor afinidad por el receptor, induce la reducción del tumor en los modelos de xenoinjerto (en los que los agentes convencionales solo retrasan el crecimiento) y no tiene efectos agonistas conocidos. En estudios preclínicos, MDV3100 actúa dentro de las células del cáncer de próstata para inducir la muerte celular, disminuir la proliferación y disminuir el volumen del tumor. El MDV3100 inhibe de manera competitiva la unión de andrógenos a los receptores de andrógenos, inhibe la translocación nuclear del receptor de andrógenos, inhibe la interacción del receptor de andrógenos con el ADN e induce la muerte celular, disminuye la proliferación de células del cáncer de próstata y disminuye el volumen del tumor.

Existen varias contraindicaciones, advertencias y precauciones para MDV3100. MDV3100 puede provocar daño fetal cuando se administra a una mujer embarazada según su mecanismo de acción. MDV3100 no está indicado para uso en mujeres. MDV3100 está contraindicado en mujeres que están o pueden quedarse embarazadas.

En el ensayo clínico aleatorio, se produjeron convulsiones en un 0,9% de los pacientes con XTANDI. Ningún paciente en el grupo de placebo experimentó convulsiones. Los pacientes que experimentaron una convulsión fueron eliminados permanentemente del tratamiento. Todas las convulsiones se solucionaron. Los pacientes con antecedentes de convulsiones, que tomaban medicamentos que se sabe que disminuyen el umbral de las convulsiones o con otros factores de riesgo de convulsiones fueron excluidos del ensayo clínico. Debido al riesgo de convulsiones asociado con el uso de XTANDI, se debe advertir a los pacientes sobre el riesgo de participar en cualquier actividad en la que la pérdida repentina de la conciencia pueda causar daños graves a sí mismos o a otros.

Las reacciones adversas al fármaco más comunes ($\geq 5\%$) notificadas en pacientes que recibieron XTANDI en el ensayo clínico aleatorio fueron astenia/fatiga, dolor de espalda, diarrea, artralgia, sofocos, edema periférico, dolor musculoesquelético, dolor de cabeza, infección de las vías respiratorias superiores, debilidad muscular, mareos, insomnio, infección de las vías respiratorias inferiores, compresión de la médula espinal y síndrome de la cola de caballo, hematuria, parestesia, ansiedad e hipertensión.

Interacciones farmacológicas de MDV3100. MDV3100 es un inductor potente de CYP3A4 y un inductor moderado de CYP2C9 y CYP2C19 en seres humanos. La administración de inhibidores potentes de CYP2C8 puede aumentar la exposición plasmática a MDV3100. Si es posible, se debe evitar la administración conjunta de MDV3100 con inhibidores potentes de CYP2C8. Si no se puede evitar la administración conjunta de MDV3100, se ha de reducir la dosis de MDV3100. La administración conjunta de MDV3100 con inductores potentes o moderados de CYP3A4 y CYP2C8 puede alterar la exposición plasmática de MDV3100 y debe evitarse si es posible. Se han de evitar los sustratos de CYP3A4, CYP2C9 y CYP2C19 con un índice terapéutico estrecho, ya que MDV3100 puede disminuir las exposiciones plasmáticas de estos medicamentos. Si MDV3100 se administra conjuntamente con warfarina (sustrato de CYP2C9), se ha de realizar una monitorización adicional de INR.

La dosis y la programación recomendadas para enzalutamida es de 160 mg por vía oral una vez al día.

Si bien MDV3100 ha sido aprobado para su uso en pacientes con enfermedades de la próstata, MDV3100 también se ha postulado como un tratamiento potencial para al menos algunos tipos de cáncer de mama. Naderi *et al. Breast Cancer Res.* 13: R36 (2011).

Aunque MDV3100 ha demostrado una tremenda eficacia en ensayos clínicos, muchos de los que inicialmente respondieron favorablemente desde entonces han desarrollado resistencia a este antiandrógeno de segunda generación. Kim *et al. Curr. Treat. Opt. Oncol.* 13: 189-200 (2012). Esta divulgación muestra la generación de un modelo de resistencia espontánea en células de LNCaP después de un tratamiento prolongado con MDV3100 *in vitro*. El examen de estas líneas reveló una mutación F877L/T878A muy recurrente en la cavidad de unión al ligando de AR que posibilita un cambio de antagonista a agonista sumamente específico para MDV3100. Esta mutación novedosa impulsa la resistencia genética y fenotípica específicamente a MDV3100, sin dejar de ser sensible a la influencia citostática de la bicalutamida.

Por lo tanto, esta divulgación muestra que una mutación en F877 o una mutación doble en W742/T878 en AR provoca resistencia a MDV3100. La mutación F877 en realidad puede provocar un cambio de antagonista a agonista para MDV3100. Por lo tanto, las células que muestran una mutación AR(F877) no pueden tratarse con MDV3100, pero siguen siendo susceptibles a otros tratamientos que no comprenden MDV3100, como la bicalutamida.

OTROS TRATAMIENTOS PARA ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS: BICALUTAMIDA

«Bicalutamida» y sus nombres comerciales «CASODEX», «SANDOZ BICALUTAMIDE», «COSUDEX», «CALUTIDE», «KALUMID» y similares se refieren al antiandrógeno no esteroideo con el nombre químico *N*-[4-ciano-3-(trifluorometil)fenil]-3-[(4-fluorofenil)sulfonil]-2-hidroxi-2-metilpropanamida. Véase: Furr. *Eur. Urol.* 29 Supl 2: 83-95(1996); Furr. *Urology* 47 (Supl 1A): 13-25; discusión 29-32 (1996); Schellhammer *et al. Urology* 50 (3): 330-6 (1997); Waller *et al. J. Mol. Endocrinol.* 24 (3): 339-51 (2000); Müderis *et al. Gynecol. Endocrinol.* 16 (1): 63-6 (2002); Schellhammer. *Expert Opin Pharmacother* 3 (9): 1313-28 (2002); Fradet *et al. Expert Rev Anticancer Ther* 4 (1): 37-48 (2004); Chen *et al. Mol. Interv.* 5 (3): 173-88 (2005); Klotz *Urol. Clin. North Am.* 33 (2): 161-6, v-vi (2006); *Journal of cancer research and clinical oncology* 132 Supl 1: S7-16 (2006); y Levine *et al. Cancer* 110 (11): 2448-56 (2007).

La bicalutamida pertenece a un grupo de medicamentos conocidos como *antiandrógenos no esteroideos*. Otro antiandrógeno no esteroideo es la *flutamida*. Los antiandrógenos no esteroideos, como la bicalutamida, bloquean el efecto de la hormona masculina testosterona en el cuerpo.

La bicalutamida se usa combinada con otro tratamiento que reduce la cantidad de testosterona en el cuerpo (ya sea con medicamentos llamados análogos de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH, por sus siglas en inglés) o con cirugía para extirpar los testículos) para el tratamiento del cáncer de próstata en estadio tardío (*metastásico*). La bicalutamida pertenece a un grupo de medicamentos conocidos como *antiandrógenos no esteroideos*.

Otro antiandrógeno no esteroideo es la *flutamida*. Los antiandrógenos no esteroideos, como la bicalutamida, bloquean el efecto de la hormona masculina testosterona en el cuerpo.

La bicalutamida se usa combinada con otro tratamiento que reduce la cantidad de testosterona en el cuerpo (ya sea con medicamentos llamados análogos de la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH, por sus siglas en inglés) o con cirugía para extirpar los testículos) para el tratamiento del cáncer de próstata en estadio tardío (*metastásico*).

Si bien tiene un efecto inhibitorio sobre AR en el cáncer de próstata sensible a las hormonas, no puede suprimir AR cuando el cáncer se vuelve refractario a las hormonas. Se atribuye a dos debilidades de los antiandrógenos actuales la incapacidad de prevenir la progresión del cáncer de próstata desde el estadio sensible a las hormonas hasta la enfermedad refractaria a las hormonas y de tratar con eficacia el cáncer de próstata refractario a las hormonas. Una es su débil actividad antagonista y la otra es su fuerte actividad agonista cuando AR se sobreexpresa en el cáncer de próstata refractario a las hormonas. Por lo tanto, se necesitan mejores inhibidores de AR con actividades antagonistas más potentes y actividades agonistas mínimas para retrasar la progresión de la enfermedad y tratar el cáncer de próstata refractario a hormonas letal.

Los antiandrógenos no esteroideos, como la bicalutamida, se han preferido sobre los compuestos esteroideos para el cáncer de próstata porque son más selectivos y tienen menos efectos secundarios. Esta clase de compuestos se ha descrito en muchas patentes, tales como la Pat. de EE. UU. N.º 4 097 578, Pat. de EE. UU. N.º 5 411 981, Pat. de EE. UU. N.º 5 705 654, Solicitudes Internacionales PCT WO 97/00071 y WO 00/17163, y la Solicitud de Patente Publicada de EE. UU. N.º 2004/0009969, todas las cuales se incorporan a la presente por referencia.

La bicalutamida se ha utilizado en contextos clínicos durante muchos años como monoterapia o combinada con la castración para bloquear la acción de los andrógenos. Sin embargo, en el contexto de CRPC, la bicalutamida experimenta un cambio de antagonista a agonista, y paradójicamente mejora la actividad de señalización de AR. Culig. *et al. Brit. J. Cancer* 81: 242-251 (1999).

Se sabe que la mutación doble W742/T878 en AR vuelve a las células resistentes a la bicalutamida. Esta divulgación también muestra que esta mutación doble vuelve a las células resistentes a MDV3100.

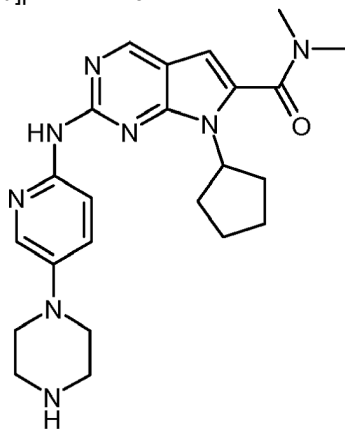
Esta divulgación también muestra que la mutación F877 en AR vuelve a las células resistentes a MDV3100, pero no a la bicalutamida. Por lo tanto, la bicalutamida se puede usar como un agente terapéutico contra las células con la mutación AR(F877).

Además de la bicalutamida, existen otras terapias para enfermedades relacionadas con el receptor de andrógenos que no comprenden MDV3100 y se describen a continuación.

OTROS TRATAMIENTOS PARA ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS: LEE011

LEE011 (también denominado Lee 011, Lee011, LEE-011 y LEE 011) (Novartis y Astex Pharmaceuticals) es un fármaco oral nuevo diseñado para inhibir la actividad de CDK4/6. Véase: PCT/US2007/069595; WO 2010/020675; y WO2011/130232.

El nombre químico de LEE011 es dimetilamida del ácido 7-ciclopentil-2-(5-piperazin-1-ilpiridin-2-ilamino)-7H-pirrol[2,3-d]pirimidino-6-carboxílico. La estructura de LEE011 es la siguiente:



LEE011 induce la desfosforilación completa de Rb y la parada en G1 de las células cancerosas. CDK4/6 participa en el proceso que permite que tanto las células normales como las cancerosas se dividan y multipliquen. Las células cancerosas a menudo se dividen y multiplican mediante anomalías que aumentan la actividad de CDK4. Por lo tanto, existe la esperanza de que el bloqueo de la actividad de CDK4 pueda ralentizar el crecimiento de algunos cánceres, incluidos los cánceres de mama y de próstata.

Esta divulgación muestra que la mutación F877 en AR vuelve a las células resistentes a MDV3100. Se sabe que la mutación doble W742/T878 vuelve a las células resistentes a la bicalutamida y se muestra en la presente que vuelve a las células resistentes a MDV3100. Sin embargo, tal como se muestra en la presente, las células con la mutación F877 o la mutación doble W742/T878 en AR siguen siendo sensibles al agente citostático no relacionado LEE011.

Además, LEE011, PD0332991 y otros inhibidores de CDK4/6 son útiles como agentes terapéuticos contra enfermedades relacionadas con AR donde AR es de tipo natural. Por ejemplo, como se muestra en la presente, una línea de PCa que expresa AR WT (de tipo natural) y capaz de mantener la señalización de AR y la expresión de DHFr y TK1 en condiciones de tratamiento con MDV3100 también mostró una fuerte sensibilidad a la inhibición de CDK4/6.

LEE011 también se puede usar como parte de una terapia combinada con una o más terapias y/o tratamientos en métodos de tratamiento de enfermedades relacionadas con AR.

OTROS TRATAMIENTOS PARA ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS: PD0332991

El inhibidor de CDK4/6 PD-0332991 [o PD0332991 o PD033299] es un potente agente citostático que se encuentra en ensayos clínicos de fase II para múltiples neoplasias malignas, incluido el cáncer de mama. Finn *et al.* 2009 *Breast Cancer Res.* 11: R77; Thangavel *et al.* 2011 *End. Relat. Cancer* 18: 333-45; Dean *et al.* 2010 *Oncogene* 29: 4018-32; y Dean *et al.* 2012 *Cell Cycle* 11: 2756-2761.

Esta divulgación muestra que PD0332991 puede usarse como un agente terapéutico para enfermedades relacionadas con AR. Esto incluye enfermedades relacionadas con AR donde AR comprende una mutación F877. Además, PD0332991, LEE011 y otros inhibidores de CDK4/6 son útiles como agentes terapéuticos contra enfermedades relacionadas con AR donde AR es de tipo natural. Por ejemplo, como se muestra en la presente, una línea de PCa que expresa AR WT (de tipo natural) y capaz de mantener la señalización de AR y la expresión de DHFr y TK1 en condiciones de tratamiento con MDV3100 también mostró una fuerte sensibilidad a la inhibición de CDK4/6.

OTROS TRATAMIENTOS PARA ENFERMEDADES RELACIONADAS CON EL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS: ÁCIDOS NUCLEICOS TERAPÉUTICOS Y DERIVADOS

Varios grupos han mostrado ácidos nucleicos terapéuticos útiles para tratar enfermedades relacionadas con el receptor de andrógenos. Estos incluyen ácidos nucleicos antisentido, morfolinos, ARNip, etc.

El documento WO97/1 1 170 publica un método para tratar a un paciente a quien se le ha diagnosticado que padece

hiperplasia prostática benigna o un cáncer de próstata que comprende administrar un oligonucleótido antisentido que se hibrida selectivamente con el ARNm del receptor de andrógenos. Se divulgan tres secuencias de oligonucleótidos antisentido de entre 27-29 nucleótidos. Los documentos US 6 733 776 y EP 0 692 972 publican un método para tratar la alopecia androgénica mediante la aplicación de liposomas que comprenden un ácido nucleico antisentido que se hibrida con un gen del receptor de andrógenos. No se proporcionan moléculas antisentido con secuencias específicas y que actúan sobre el receptor de andrógenos. El documento US 2005/0164970 publica un método para tratar el cáncer de próstata utilizando complejos de ARNip que actúan sobre el ARNm del receptor de andrógenos. El documento WO 2005/027833 publica un método para tratar el cáncer de próstata que comprende administrar un oligonucleótido morfolino con una longitud de entre 12 y 40 subunidades de morfolino al paciente. El documento WO 2001/083740 publica un compuesto antisentido que tiene una cadena principal de morfolinos sin carga de entre 18 y 20 unidades contiguas que actúa sobre el receptor de andrógenos humano. Los compuestos antisentido morfolino actúan mediante la unión a la diana de ácido nucleico para bloquear el acceso al ARNm por parte de otras moléculas, tales como las moléculas involucradas en el corte y empalme de ARNm o el inicio de la traducción. El documento US 7 067 256 publica una ribozima que aparentemente media en la inactivación del receptor de andrógenos. Se proporciona una molécula de ARN de 19 nucleótidos antisentido para una región correspondiente del ARNm del receptor de andrógenos. El documento WO 2012/065051 describe ARNip para el receptor de andrógenos.

Esta divulgación muestra que las células con una mutación F877 o una mutación doble W742/877 en AR son resistentes a MDV3100. Sin embargo, sin desear ceñirse a ninguna teoría en particular, esta divulgación postula que los agentes terapéuticos que no comprenden MDV3100, tales como los ácidos nucleicos terapéuticos (por ejemplo, ARNip) pueden ser eficaces contra estas células, siempre que el agente terapéutico pueda suministrarse a las células en cantidades suficientes.

Además, los autores muestran en la presente que actuar sobre CDK4/6 es una estrategia terapéutica para superar la resistencia a MDV3100, usando los inhibidores de CDK4/6 LEE011 y PD033299.

Dado que los autores demuestran además que la variante F877L retiene la sensibilidad a la bicalutamida, la terapia combinada con antiandrógenos distintos desde un punto de vista estructural en paralelo o en serie junto con la privación de andrógenos puede proporcionar una estrategia terapéutica atractiva para combatir los mecanismos de resistencia a AR en el contexto clínico.

Además, actuar sobre CDK4/6 con un inhibidor de CDK4/6 es una estrategia terapéutica válida para una enfermedad relacionada con el receptor de andrógenos, independientemente de si el AR es WT o de si tiene una mutación tal como F877.

POLINUCLEÓTIDO AR(F877)

En otro aspecto, la presente divulgación proporciona un polinucleótido o un polinucleótido antisentido que comprende al menos 15 nucleótidos consecutivos (incluidos 0, 1, 2 o 3 emparejamientos erróneos) que tienen la secuencia de y/o son capaces de hibridarse de manera detectable con una secuencia que codifica al menos 5 aminoácidos contiguos de la SEQ ID NO: 54, que incluye la posición 877, donde el aminoácido en la posición 877 es un aminoácido diferente de

fenilalanina (F), donde la hibridación se realiza en condiciones que incluyen un lavado en 0,1 x SSC y un 0,1% de SDS a 50 °C durante 15 minutos. Un polinucleótido de este tipo puede ser útil para detectar la presencia de un polinucleótido AR(F877) dentro de una célula o tejido o paciente, o para producir un ácido nucleico terapéutico para AR(F877). En varios aspectos, el ácido nucleico terapéutico es ARN, ADN, ARNip (ARN interferente pequeño o corto, con o sin diversas modificaciones y/o caperuzas finales), híbrido de ARN-ADN, quimera de ADN-ARN (que es similar a un ARNip excepto en que una porción del ARNbc es reemplazada por ADNbc), LNA (siglas en inglés de ácido nucleico bloqueado), TNA (siglas en inglés de ácido nucleico de treosa), GNA (siglas en inglés de ácido nucleico glicólico), morfolino, oligonucleótido antisentido, ARNhc, ARNisip (ARN segmentado internamente pequeño), ARNia (ARN interferente asimétrico), o una combinación de cualquiera de los anteriores (por ejemplo, donde los componentes del ácido nucleico comprenden uno o más de los anteriores, tales como un ARN con algunos nucleótidos sustituidos con ARN, GNA, LNA, morfolino, etc.), y similares. En diversas realizaciones, el polinucleótido y/o polinucleótido antisentido son monocatenarios o bicatenarios, y/o modificados, por ejemplo, por 2'-OMe, 2'-F y/o 2'-MOE, y/o por modificación y/o reemplazo de los fosfatos (por ejemplo, por fosfato metilado, arsénico, selenio, etc.). También se proporcionan vectores de expresión que comprenden cualquiera de los polinucleótidos anteriores, y células hospedadoras transformadas o transfectadas con tales vectores de expresión. En resumen, por lo tanto, la presente divulgación se refiere a mutaciones particulares en AR que son útiles para diagnosticar, pronosticar y tratar (por ejemplo, diseñar un curso de tratamiento) para pacientes con enfermedades relacionadas con AR.

A continuación, se describen con más detalle métodos para detectar la mutación de AR particular y estratificar pacientes.

MÉTODOS PARA ESTRATIFICAR PACIENTES Y MÉTODOS PARA DETECTAR AR(F877) Y ESTRATIFICAR PACIENTES

Dentro de otros aspectos, la presente divulgación proporciona métodos para detectar la presencia o ausencia de una mutación en la posición F877 en AR en una muestra (por ejemplo, una muestra de células o tejidos) en o de un paciente (por ejemplo, un paciente afectado, que padece o que exhibe al menos un signo o síntoma clínico de, en riesgo o propenso a desarrollar o del que se sospecha que tiene una enfermedad relacionada con AR). La mutación en F877 en AR es relevante desde un punto de vista clínico, ya que los pacientes que presentan un AR mutante de este tipo no deben tratarse con MDV3100, sino que deben tratarse con un tratamiento que no comprenda MDV3100 (por ejemplo, bicalutamida o un inhibidor de CDK4/6 tal como LEE011 o PD0332991).

Cabe señalar que las células dentro de una muestra pueden ser heterogéneas; algunas pueden expresar AR(F877), mientras que otras pueden expresar AR WT (de tipo natural) y/u otro AR mutante. En varios aspectos descritos en la presente, la presente divulgación se refiere a métodos para detectar una mutación en la posición F877 en AR de una muestra que puede comprender una mezcla de AR(F877), AR WT y/u otros AR mutantes. En algunos aspectos, el método puede determinar las relaciones de la mezcla de AR(F877), AR WT y/u otros AR mutantes. En algunas muestras, el AR(F877) puede estar en una minoría de células que expresan AR.

En diversos aspectos, la presente divulgación proporciona un método para detectar una mutación en la posición F877 en un polinucleótido o polipéptido de AR en una muestra (por ejemplo, de un paciente), comprendiendo el método los pasos de: (a) obtener una muestra (por ejemplo, una muestra biológica, muestra de tejidos, muestra de células, etc.) que comprende AR del paciente; y (b) determinar la secuencia del polinucleótido o polipéptido de AR o una porción de este para determinar si el AR comprende una mutación en la posición F877 (donde la posición de los aminoácidos está de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 54). En varios aspectos, la muestra todavía está dentro y/o es parte del paciente. En varios aspectos, el paciente padece, sufre o exhibe al menos un signo o síntoma clínico de, y/o está en riesgo o es propenso a desarrollar o se sospecha que tiene una enfermedad relacionada con AR. El método opcionalmente se refiere al diagnóstico, pronóstico y/o tratamiento de un paciente y opcionalmente comprende además el paso adicional de: (c) administrar o recomendar la administración de una composición terapéutica que comprende MDV3100 si un AR no comprende una mutación en F877; o administrar o recomendar la administración de una composición terapéutica que no comprende MDV3100 si un AR comprende una mutación en F877. En diversos aspectos, la composición terapéutica que no comprende MDV3100 es bicalutamida o un inhibidor de CDK4/6 tal como LEE011 o PD0332991, o un ácido nucleico terapéutico. En varios aspectos, si se determina que la muestra comprende una mezcla de células que expresan AR(F877), AR WT y/u otros AR mutantes, pueden ser necesarios varios pasos para atacar los diferentes tipos de células dentro de la mezcla.

Además, las proporciones de células presentadoras de AR WT y varios mutantes pueden cambiar según las subpoblaciones de células son eliminadas o posiblemente activadas por terapias, y surgen clones resistentes. Por lo tanto, los pasos (a), (b) y (c) pueden repetirse.

Por ejemplo, los métodos para determinar si el aminoácido en la posición 877 en AR es fenilalanina y estratificar a los pacientes se pueden realizar después de 1 o más ciclos de terapia. Un tumor u otro tejido enfermo puede ser heterogéneo, y comprender múltiples tipos de AR [por ejemplo, AR WT y/o AR(F877) y/u otros mutantes]. Las relaciones de estas subpoblaciones de células pueden cambiar conforme algunas células son destruidas o activadas por un agente terapéutico. Los experimentos divulgados en la presente muestran que la exposición prolongada de células LNCaP a MDV3100 produjo poblaciones de clones resistentes a MDV3100. Otros estudios han mostrado resistencia que aparece frente a MDV3100 u otros tratamientos de la enfermedad, o un enriquecimiento de células mutantes resistentes. Cabe señalar que puede no estar claro si la resistencia es preexistente (por ejemplo, en una subpoblación menor de células) o si se adquiere en respuesta al tratamiento. Después de uno o más ciclos de terapia, por lo tanto, los pasos (a) y (b) pueden repetirse para determinar las características de las células restantes, y el paso (c) puede modificarse para seleccionar un agente terapéutico apropiado para atacar las células restantes.

En varios aspectos, el método para determinar si el aminoácido en la posición 877 en AR es fenilalanina (F) incluye, sin

carácter limitante y entre otros, el uso de secuenciación de ácidos nucleicos (por ejemplo, los métodos de secuenciación de ADN, sec-ARN, secuenciación de proteínas, secuenciación del transcriptoma completo u otros métodos conocidos en la técnica), o uso de un anticuerpo o ácido nucleico específico para AR(F877).

En varios aspectos, la secuenciación de ácidos nucleicos se refiere a la secuenciación de un ácido nucleico que puede codificar el AR o una porción de este que comprende o abarca la posición F877, o que es complementario a un ácido nucleico que codifica el AR o la porción de este.

En varios aspectos, el método para determinar si el aminoácido en la posición 877 en AR es fenilalanina (F) incluye, sin carácter limitante y entre otros, el uso de un anticuerpo o fragmento o variante de este específico para AR(F877) [por ejemplo, que se une a o reconoce AR(F877) pero no AR WT]. En diversos aspectos, la presente divulgación proporciona un método para detectar AR(F877) en una muestra (por ejemplo, de un paciente), comprendiendo el método los pasos de: (a) poner en contacto una muestra con un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de este como se ha descrito anteriormente, en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir la formación de un complejo de anticuerpo/AR(F877); y (b) detectar el nivel de complejo de anticuerpo/AR(F877).

En varios aspectos, el método para determinar si el aminoácido en la posición 877 en AR es fenilalanina (F) incluye, sin carácter limitante y entre otros, el uso de un ácido nucleico específico para AR(F877) [por ejemplo, que se une a o reconoce AR(F877) pero no AR WT].

Dentro de otros aspectos, la presente divulgación proporciona un método para detectar la expresión de AR(F877) en una muestra, que comprende: (a) poner en contacto una muestra con un ácido nucleico o fragmento o variante de este específico para AR(F877) en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir la hibridación del ácido nucleico con un ácido nucleico en la muestra; y (b) detectar el nivel de hibridación.

La cantidad de polinucleótido antisentido o polinucleótido de AR(F877) en la muestra que se hibrida con el polinucleótido o polinucleótido antisentido puede determinarse, por ejemplo, usando secuenciación, reacción en cadena de la polimerasa o un ensayo de hibridación.

También se proporcionan métodos para modular una respuesta proliferativa en una célula, que comprende el paso de poner en contacto una célula con un agente que modula la actividad de AR(F877).

Dentro de otros aspectos, se proporcionan métodos para modular la diferenciación de una célula, que comprenden el paso de poner en contacto una célula con un agente que modula la actividad de AR(F877).

La presente divulgación proporciona además métodos para modular la supervivencia celular, que comprenden el paso de poner en contacto una célula con un agente que modula la actividad de AR(F877).

Por lo tanto, en varios aspectos, la presente divulgación se refiere a varios métodos para detectar AR(F877) y estratificar pacientes que expresan o no este polipéptido.

En varios aspectos, el método para determinar si el aminoácido en la posición 877 en AR es fenilalanina (F) incluye, sin carácter limitante y entre otros, el uso de secuenciación de ácidos nucleicos (por ejemplo, los métodos de secuenciación de ADN, sec-ARN, secuenciación de proteínas, secuenciación del transcriptoma completo u otros métodos conocidos en la técnica), o uso de un anticuerpo o ácido nucleico específico para AR(F877). Para consultar varias referencias relacionadas con la secuenciación, véase: Morin *et al. Nature* 476: 298-303 (2011); Kridel *et al. Blood* 119: 1963-1971 (2012); Ren *et al. Cell Res.* 22: 806-821 (2012) y referencias citadas en él.

En resumen, hay diversos métodos disponibles para determinar si la muestra de un paciente comprende un AR con una mutación particular. Estas diversas mutaciones son útiles para la estratificación de pacientes y para el diseño de pautas de tratamiento.

La mutación de AR en F877 relevante desde un punto de vista clínico y novedosa también es útil porque los polipéptidos de AR que comprenden esta mutación, los anticuerpos contra estos polipéptidos y los polinucleótidos que los codifican pueden usarse para generar o realizar cribados para detectar nuevos agentes terapéuticos.

USO DE AR(F877) PARA GENERAR Y REALIZAR CRIBADOS PARA DETECTAR NUEVOS AGENTES TERAPÉUTICOS

La mutación en la posición F877 permite que AR sea resistente a MDV3100 e incluso provoca un cambio de antagonista a agonista para este fármaco. Por lo tanto, se necesitan terapias novedosas que interactúen con AR(F877) y sean útiles para tratar pacientes con enfermedades relacionadas con AR que tienen una mutación en AR de este tipo.

La presente divulgación proporciona además, dentro de otros aspectos, métodos para cribar una molécula (por ejemplo, un potencial agente terapéutico) en función de su capacidad de interactuar con AR(F877), que comprende los pasos de: (a) poner en contacto una molécula candidata con un polipéptido de AR(F877) en condiciones y durante un tiempo suficiente para permitir que la molécula candidata y el polipéptido interactúen; y (b) detectar la presencia o ausencia de unión de la molécula candidata al polipéptido y/o la capacidad de interferir con o disminuir al menos una actividad del polipéptido. El paso de detección puede, por ejemplo, comprender el uso de un AR(F877) y un indicador de AR, por ejemplo, un polinucleótido que comprende una ARE [secuencia de ADN a la que se unen WT o AT(F877)], un promotor y un gen indicador (por ejemplo, luciferasa). El paso de detección puede comprender, por ejemplo, determinar si la molécula candidata interfiere con o disminuye la capacidad del AR(F877) para dirigir la expresión del indicador de AR. El paso de detección puede comprender, por ejemplo, un paso de purificación por afinidad, un cribado de doble híbrido en levaduras o un cribado de una colección de presentación en fagos.

En algunos aspectos, los métodos de cribado de nuevos agentes terapéuticos implican el uso de un polipéptido de AR(F877) o fragmento o variante de este que comprende o abarca el aminoácido en la posición 876. Este polipéptido se puede producir de cualquier manera conocida en la técnica, incluida la expresión a partir de un polinucleótido que codifica el polipéptido.

La presente divulgación abarca métodos para producir un polipéptido de AR(F877).

La presente divulgación proporciona además, dentro de otros aspectos, métodos para producir un polipéptido de AR(F877), que comprende los pasos de: (a) cultivar una célula hospedadora como se ha descrito anteriormente en condiciones que permitan la expresión del polipéptido de AR(F877); y (b) aislar el polipéptido de AR(F877) a partir del cultivo de células hospedadoras.

5 Se pueden idear fácilmente muchos métodos para usar un AR(F877) mutante en el cribado para detectar fármacos que sensibilicen este AR mutante.

Dos métodos que ha aplicado esta divulgación incluyen 1) transactivación y 2) análisis de la expresión génica para determinar si los compuestos que actúan sobre la ruta de AR pueden usarse como inhibidores de la función AR mutante. Ambos métodos se describen claramente en la sección de métodos. Un método se detalla en el Ejemplo 7.

10 En resumen, para los ensayos de transactivación, el indicador de AR, un plásmido de control y los plásmidos WT o AR(F877) mutante se cotransfectan antes del tratamiento con disolvente de control (tal como DMSO), agonista o antagonista de interés. El indicador de AR comprende, por ejemplo, una ARE (siglas en inglés de secuencia de elementos de respuesta a andrógenos a la que se une AR), un promotor y un gen indicador como la luciferasa. Después del tratamiento, se cuantifica un producto del gen indicador (por ejemplo, bioluminiscencia). Se espera que AR WT active el
15 indicador de AR en presencia de un agonista (por ejemplo, R1881) y que la señal se suprima lo suficiente en presencia de un antagonista, tal como MDV3100. Sin embargo, para AR(F877), se espera que haya una activación suficiente de la actividad indicadora de AR en presencia de agonista y antagonista tal como MDV3100. Un antagonista novedoso ideal bloqueará lo suficiente la función de A(F877), de manera similar a la bicalutamida.

Además de los ensayos de transactivación, también se puede monitorizar el análisis de la expresión génica de genes de AR canónicos, tales como *KLK3*, *TMPRSS2*, *NKX3-1* y *SLC45A3*. Este experimento es similar al experimento descrito en otra parte de la presente, excepto en que MDV3100 puede ser sustituido por un (varios) compuesto(s) novedoso(s). Se espera que mientras que MDV3100 puede usarse como un agonista para rescatar la señalización, un compuesto
20 novedoso puede ser eficaz para mantener la supresión de la actividad de señalización en las células portadoras de AR-F877L.

Por lo tanto, el AR(F877) se ha utilizado y se puede utilizar para realizar cribados para detectar fármacos y agentes terapéuticos novedosos que afecten a este AR mutante.

ANTICUERPOS CONTRA AR(F877)

Se puede desarrollar un anticuerpo que se una específicamente a AR(F877) pero que no se una a AR que carece de una mutación en F877 (por lo tanto, un AR, fragmento o variante que tenga una fenilalanina en la posición 877).

El término «anticuerpo» se refiere a una proteína que incluye al menos un dominio variable de inmunoglobulina o una secuencia de un dominio variable de inmunoglobulina. Por ejemplo, un anticuerpo puede incluir una región variable de la cadena pesada (H) (abreviada en la presente como VH), y una región variable de la cadena ligera (L) (abreviada en la presente como VL). En otro ejemplo, un anticuerpo incluye dos regiones variables de la cadena pesada (H) y dos regiones variables de la cadena ligera (L). El término «anticuerpo» abarca fragmentos de anticuerpos de unión al antígeno (por ejemplo, anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab y sFab, F(ab')₂, fragmentos Fd, fragmentos Fv, scFv y fragmentos de anticuerpos de dominio (dAb) (de Wildt *et al.*, *Eur J. Immunol.* 1996; 26 (3): 629-39)) así como también anticuerpos íntegros. Un anticuerpo puede tener las características estructurales de IgA, IgG, IgE, IgD, IgM (así como también los subtipos de estos). Los anticuerpos pueden ser de cualquier fuente, pero se prefieren de primates (primates humanos y
40 no humanos) y primateizados.

Las regiones VH y VL se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas «regiones determinantes de la complementariedad» («CDR»), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas «regiones de armazón» (FR, por sus siglas en inglés). La extensión de las regiones de armazón y las CDR se ha definido de forma precisa (véase, Kabat, E. A., *et al.* (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU., publicación NIH N.º 91-3242, y Chotia, C. *et al.* (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917, véase también www.hgmp.mrc.ac.uk). En la presente se usan las definiciones de Kabat. Cada VH y VL se compone típicamente de tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxi en el orden siguiente: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

La cadena VH o VL del anticuerpo puede incluir además la totalidad o parte de una región constante de la cadena pesada o ligera, para formar de esta manera una cadena de inmunoglobulina pesada o ligera, respectivamente. En una realización, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas pesadas de inmunoglobulina y dos cadenas ligeras de inmunoglobulina, donde las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina están interconectadas, por ejemplo, por enlaces disulfuro. En las IgG, la región constante de la cadena pesada incluye tres dominios de inmunoglobulina, CH1, CH2 y CH3. La región constante de la cadena ligera incluye un dominio CL. La región variable de las cadenas pesada y ligera contiene un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos normalmente median en la unión del anticuerpo a los tejidos o factores del hospedador, que incluyen diversas células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico. Las cadenas ligeras de la inmunoglobulina pueden ser de los tipos kappa o lambda. En una realización, el anticuerpo está glucosilado. Un anticuerpo puede ser funcional para la citotoxicidad dependiente de anticuerpos y/o citotoxicidad mediada por el complemento.

Una o más regiones de un anticuerpo pueden ser humanas o efectivamente humanas. Por ejemplo, una o más de las regiones variables pueden ser humanas o efectivamente humanas. Por ejemplo, una o más de las CDR pueden ser humanas, por ejemplo, CDR1 de HC, CDR2 de HC, CDR3 de HC, CDR1 de LC, CDR2 de LC y CDR3 de LC. Cada una de las CDR de la cadena ligera puede ser humana. CDR3 de HC puede ser humana. Una o más de las regiones de armazón pueden ser humanas, por ejemplo, FR1, FR2, FR3 y FR4 de HC o LC. Por ejemplo, la región Fc puede ser humana. En una realización, todas las regiones de armazón son humanas, por ejemplo, derivadas de una célula somática

humana, por ejemplo, una célula hematopoyética que produce inmunoglobulinas o una célula no hematopoyética. En una realización, las secuencias humanas son secuencias de la línea germinal, por ejemplo, codificadas por un ácido nucleico de la línea germinal. En una realización, los residuos de armazón (FR) de un Fab seleccionado se pueden convertir al tipo de aminoácido del residuo correspondiente en el gen de la línea germinal de primates más similar, especialmente el gen de la línea germinal humana. Una o más de las regiones constantes pueden ser humanas o efectivamente humanas. Por ejemplo, al menos un 70, 75, 80, 85, 90, 92, 95, 98 o 100% de un dominio variable de inmunoglobulina, la región constante, los dominios constantes (CH1, CH2, CH3, CL1), o la totalidad del anticuerpo puede ser humano o efectivamente humano. La totalidad o parte de un anticuerpo puede estar codificada por un gen de inmunoglobulina o un segmento de este. Los genes ejemplares de inmunoglobulina humana incluyen los genes de la región constante kappa, lambda, alfa (IgA1 e IgA2), gamma (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4), delta, épsilon y mu, así como también los muchos genes de la región variable de inmunoglobulina. Las «cadenas ligeras» de inmunoglobulina completas (aproximadamente 25 kDa o aproximadamente 214 aminoácidos) están codificadas por un gen de la región variable en el extremo NH2 (aproximadamente 110 aminoácidos) y un gen de la región constante kappa o lambda en el extremo COOH. Las «cadenas pesadas» de inmunoglobulina completas (aproximadamente 50 kDa o aproximadamente 446 aminoácidos), están codificadas de manera similar por un gen de la región variable (aproximadamente 116 aminoácidos) y uno de los otros genes de la región constante mencionados anteriormente, por ejemplo, gamma (que codifica aproximadamente 330 aminoácidos). La longitud de la HC humana varía considerablemente porque la CDR3 de HC varía de aproximadamente 3 residuos aminoacídicos a más de 35 residuos aminoacídicos. Por lo tanto, utilizando AR(F877) se pueden diseñar anticuerpos, moléculas de bajo peso molecular, ARNip que actúan específicamente sobre AR(F877).

POLINUCLEÓTIDO AR(F877)

La presente divulgación también se refiere a polinucleótidos de AR(F877). Estos polinucleótidos pueden usarse para codificar (por ejemplo, expresar) un polipéptido de AR(877) o incorporarse a un ácido nucleico terapéutico [por ejemplo, un ARNip o similar a AR(F877)].

Por lo tanto, en diversos aspectos, la presente divulgación se refiere a un polinucleótido que codifica un AR(F877) o fragmento o variante de este. A continuación, la divulgación presenta con más detalle datos experimentales relacionados con esta mutación.

RECEPTOR DE ANDRÓGENOS CON LA MUTACIÓN F877

Un objeto de esta divulgación es proporcionar herramientas y métodos para diagnosticar, pronosticar y tratar enfermedades de la próstata tales como el cáncer de próstata (PCa), incluido PCa resistente a la castración (CRPC). Esta y otras objeciones de la divulgación son proporcionadas por una o más de las realizaciones descritas a continuación.

En diversos aspectos, la presente divulgación se refiere a AR(F877), que es un polipéptido o similar que comprende el receptor de andrógenos o un fragmento de este que comprende la posición 877, donde el aminoácido en la posición 877 es un aminoácido diferente de fenilalanina (F). En algunos aspectos, el aminoácido en la posición 877 es leucina (L). En diversos aspectos, el polipéptido AR(F877) tiene opcionalmente mutaciones en otras posiciones, de modo que el aminoácido en la posición 878 no es treonina (T), el aminoácido en 875 no es histidina (H), el aminoácido en la posición 716 no es valina (V), y/o el aminoácido en la posición 742 no es triptófano (W). En aspectos adicionales, la presente divulgación se refiere a AR(W742/T878), que es un polipéptido o similar que comprende el receptor de andrógenos o un fragmento de este que comprende las posiciones 742 y 878, donde el aminoácido en la posición 742 no es triptófano (W) y el aminoácido en la posición 878 no es treonina (T).

En diversos aspectos, la presente divulgación proporciona un método para detectar la expresión de AR(W742/T878) en un paciente, comprendiendo el método el paso de: determinar si los aminoácidos en las posiciones 742 y 878 de un receptor de andrógenos o fragmento de estos en el paciente son, respectivamente, triptófano (W) y treonina (T). En varios aspectos, el método comprende además los pasos de recomendar la administración y/o administrar al paciente: (a) bicalutamida o MDV3100 si los aminoácidos en las posiciones 742 y 878 son, respectivamente, triptófano (W) y treonina (T); o (b) un tratamiento para la enfermedad de la próstata que no sea bicalutamida o MDV3100 si los aminoácidos en las posiciones 742 y 878 no son, respectivamente, triptófano (W) y treonina (T).

Esta divulgación utiliza el modelo LNCaP, un modelo utilizado previamente para identificar una mutación W742C relevante desde el punto de vista clínico que confiere resistencia a la bicalutamida [Hara *et al. Cancer Res.* 63: 149-153 (2003)], para identificar y confirmar funcionalmente el papel de la mutación F877L/T878A en AR como un cambio de antagonista a agonista para MDV3100. A través del análisis de la expresión génica y fenotípico, esta divulgación muestra que el cambio a agonista conferido por el AR mutante F877L/T878A es sumamente selectivo para MDV3100, ya que se mantiene la sensibilidad a la bicalutamida. Esto implicaría que los pacientes que presentan esta mutación, ya sea preexistente o adquirida en respuesta a la terapia, mostrarán una progresión clínica rápida de la enfermedad durante el tratamiento con MDV3100, pero pueden responder favorablemente a la bicalutamida o potencialmente a otras clases de antiandrógenos (Fig. 7). El cribado de pacientes para identificar esta mutación, ya sea antes de la terapia o después del inicio de la resistencia, ayudará a predecir la sensibilidad farmacológica y guiará estrategias alternativas de la gestión clínica.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1. MATERIALES Y MÉTODOS

MÉTODOS

Cultivo celular

Las células LNCaP-FGC y PC3 se mantuvieron en medio RPMI 1640 con un 10% de FCS (Hyclone) o un 10% de CSS (Omega, n.º cat fb-04) tal como se indica. Las células 22Rv1 se mantuvieron en medio RPMI 1640 con un 10% de FCS. Las células VCaP se mantuvieron en medio DMEM con un 10% de FCS o un 10% de CSS. Las células Myc-CaP se mantuvieron en medio DMEM con un 10% de FCS. Las células 293FT se mantuvieron en DMEM complementado con un 10% de FCS y 1xNEAA. Todas las líneas, excepto las células Myc-CaP, se obtuvieron de la Colección de Cultivos Tipo Estadounidense y las células se analizaron y autenticaron mediante la obtención de huellas del polimorfismo de un único nucleótido. El Dr. Charles Sawyers proporcionó amablemente las células Myc-CaP y no se analizaron ni autenticaron posteriormente.

Generación de clones espontáneos de LNCaP resistentes a MDV3100 *in vitro*

Se sembraron 2 millones de células LNCaP en cuatro placas de cultivo tisular de 150 cm² en medio RPMI 1640 sin rojo fenol complementado con un 10% de FCS. Al día siguiente, se añadieron DMSO y etanol (control 1, C1), DMSO y R1881 1,0 nM (control 2, C2), MDV 1 µM + R1881 1,0 nM (control 3, C3), y MDV3100 1µM a las placas 1 a 4 respectivamente. Las células se volvieron a sembrar en placas de 150 cm² complementadas con los tratamientos apropiados una vez a la semana. El medio y el compuesto se reemplazaron para la placa 4 una vez a la semana. Una vez que surgieron los clones resistentes, se aspiró el medio de la placa 4. Se usaron discos de clonación estériles de 3 mm empapados con tripsina (Scienceware, n.º de cat 17-2.X) para superponer los clones resistentes y después de una incubación de 1-2 minutos, los discos de clonación se transfirieron a placas de 24 pocillos con medio RPMI 1640 sin rojo fenol complementado con un 10% de FCS y MDV3100. Las células de las placas de control 1-3 se mantuvieron hasta que los clones resistentes se crioconservaron para mantener un tiempo de cultivo constante para las líneas de control y experimentales.

Generación de líneas transducidas estables

Los ADNc con codones optimizados que codifican AR WT o mutante se sintetizaron (DNA2.0) y se subclonaron en pLKO-TREX-HA-Neo (Invitrogen). Los lentivirus se produjeron mediante la transfección de células 293FT con constructos VSVG:deltaR8.9:ADNc en una relación de 1:2,5:1,25. El virus se recolectó 2-3 días después de la transfección, se filtró y se usó para infectar cultivos de células LNCaP, MyC-CaP y VCaP en presencia de 8 µg mL⁻¹ polibreno. Las células infectadas se mantuvieron en neomicina durante 3 semanas. En todos los casos, se agruparon al menos 1000 clones independientes para generar líneas celulares estables para evitar variaciones clonales. Se generaron líneas celulares estables infectadas con vectores de control en paralelo para su uso como controles experimentales.

Micromatriz

Se sembraron 3x10⁵ células en placas de 6 pocillos 2-3 d antes del tratamiento con DMSO o MDV3100 10 µM durante 24 h. El ARN total se aisló de las células usando el kit Qiagen RNeasy. La integridad y la pureza del ARN se evaluaron con el sistema RNA 6000 Nano LabChip en un Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). La generación de ADNc marcado y la hibridación con la matriz Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix Inc.) se realizó utilizando protocolos estándar tal como se ha descrito anteriormente (8).

Análisis de la expresión

Los conjuntos de sondas de los conjuntos de datos de expresión génica de Affymetrix se normalizaron usando MAS5 con una diana media recortada de 150, y se sometieron a una transformación log2. A continuación, los conjuntos de sondas se filtraron para su inclusión solo si su valor máximo en diferentes muestras fue de al menos 5. Se realizaron mínimos cuadrados ordinarios utilizando las variables indicadoras 0-1 como las covariables; se usó un indicador para representar las condiciones de referencia (muestra no tratada) de cada clon, y tres variables indicadoras representaron el tratamiento con MDV3100 para cada una de las clases de muestras (clones de control, poco resistentes y muy resistentes). Esta regresión se usó para generar valores de p nominales y coeficientes de regresión (es decir, factores de cambio). Se consideró que los conjuntos de sondas individuales tuvieron una expresión diferencial significativa si su factor de cambio fue $\geq 1,5$, con un valor de p nominal $\leq 0,05$.

Análisis del enriquecimiento de conjunto de genes

La correlación entre una firma génica de AR (30) se comparó con los genes con una mejor calificación tras el tratamiento con MDV-3100. La línea azul representa la posición expresada del conjunto de sondas y se califica según el factor de cambio promedio; solo se incluyen aquellos conjuntos de sondas expresados en un nivel MAS5-150 de al menos 32 en al menos 1 muestra. Las líneas rojas indican dónde aparecen los conjuntos de sondas con los que se cartografiaban los genes en las firmas génicas de AR en el conjunto de datos de los autores; líneas grises para conjuntos de sondas que no pasan la significancia nominal, y la línea roja más alta representa conjuntos de sondas con un factor de cambio de al menos 1,5 y un valor de p nominal inferior a 0,05. La curva negra muestra la suma acumulativa de los conjuntos de sondas en la firma génica de AR, y la línea de puntos representa la suma acumulativa hipotética para una lista aleatoria de genes que no están enriquecidos.

Puntuaciones de enriquecimiento de la ruta

Para la firma candidato (30), se utilizó una prueba exacta de fisher de dos colas para determinar si los conjuntos de sondas que representan los genes en esas firmas estaban subrepresentados o sobrerepresentados en el conjunto de los conjuntos de sondas que presentaron un aumento o un descenso regulado de al menos 1,5 veces en comparación con los conjuntos de sondas expresados pero sin expresión diferencial, con un valor de p nominal de 0,05 o inferior. Para una estrategia sin sesgo, las rutas derivadas de los términos GO y redes de factores de transcripción se analizaron para

determinar la sobrerepresentación mediante una prueba exacta de Fisher interpolada de una cola, utilizando genes que variaron 1,5 veces o más con un valor de p nominal de 0,05 o menos en comparación con todos los genes representados en la matriz; a continuación, se aplicó la corrección de Benjamini-Hochberg (BH) a esos valores de p (8).

5 Secuenciación de Sanger

Se aisló ADN genómico de varios clones resistentes a MDV 1 μ M y líneas de control apropiadas utilizando el kit Blood and Tissue DNAeasy (Qiagen, n.º cat 69581) según las instrucciones del fabricante. Se utilizaron cebadores para amplificar el exón 8 (el sitio de la mutación F877L) (Directo: 5'-ATTGCGAGAGAGCTGCATCA-3' (SEQ ID NO: 55); Inverso: 5'-TTCTCGTCACTATTGGCCTC-3' (SEQ ID NO: 56)) y el ADNc amplificado fue secuenciado por Genewiz utilizando los mismos cebadores. Se analizaron los archivos traza (*trace file*) para confirmar la presencia de la mutación F877L.

PCR cuantitativa en tiempo real

Para clones espontáneos: Se sembraron 200k células en placas de 6 pocillos en RPMI 1640 complementado con un 10% de FCS durante 2 d antes del tratamiento con diversos compuestos durante 24 h. Como alternativa, para los experimentos que implican deficiencia de andrógenos, se sembraron 200k células y se cultivaron en placas de 6 pocillos en RPMI 1640 sin fenol complementado con un 10% de FCS durante 2 d. Se aspiró el medio y se reemplazó con RPMI 1640 sin fenol complementado con un 10% de CSS durante 3-4 d antes del tratamiento con diversos compuestos durante 24 h. Se aplicaron protocolos similares para las líneas modificadas genéticamente excepto en que las células se pretrataron con Dox durante al menos 2 d antes del tratamiento con diversos compuestos para permitir una expresión del transgén suficiente. El ARN total se extrajo usando el minikit RNeasy plus (Qiagen, n.º cat 74136) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se usaron 1-2 μ g de ARN total para la síntesis de ADNc usando un kit de transcripción inversa de ADNc de alta capacidad (Applied Biosystems, n.º cat 4368813). El ADNc de cada muestra se diluyó 15-20 veces y se realizó un ensayo en tiempo real por triplicado usando cebadores específicos para genes y FastStart Universal Probe Master Mix (Rox) (Roche Applied Science) en una máquina de PCR serie 7900HT ABI. Los niveles de expresión se normalizaron respecto a la expresión de *TBP*. Todos los análisis se realizaron usando el software SDS2.3. Se usaron los siguientes cebadores específicos para genes (Invitrogen): *AR* (Hs00171172_m1), *KLK3* (Hs02576345_m1), *NKX3-1* (Hs00171834_m1), *TMPRSS2* (Hs01120965_m1), *SLC45A3* (Hs00263832_m1), *TBP* (Hs00427620_m1), *DHFR* (Hs00758822_s1) y *TK1* (Hs01062125_m1).

30 Ensayos de tumorigénesis *in vivo*

Se inyectaron por vía subcutánea 10 millones de células LNCaP (C1, clon n.º 1) mezcladas 1:1 con matrigel en el costado de ratones nu/nu macho de 7-8 semanas castrados. Los ratones portadores de tumores (volumen tumoral = 150-300 mm³) fueron tratados con vehículo o 30 mg/kg de MDV3100 al día. Los tumores se midieron usando calibradores y los volúmenes tumorales se calcularon usando longitud x anchura ²/2. Los datos se expresan como media $\pm$ EEM. Todos los experimentos con animales se realizaron en conformidad con las directrices de los protocolos y regulaciones del Comité de Uso y Cuidado de Animales de Investigación Biomédica de Novartis.

40 Análisis estadístico

Los resultados se presentaron como media $\pm$ EEM (error estándar de la media). Se realizó una prueba de la t de Student independiente de dos colas sin asumir igualdad de la varianza para analizar los niveles de expresión génica y puntos finales de los ensayos de luciferasa *in vitro*. Para el análisis del enriquecimiento del conjunto de genes, los valores de p mostrados se basan en una prueba exacta de Fisher de dos colas que compara conjuntos de sondas en la firma génica que pasa significancia respecto a aquellos que no, frente a la significancia/no significancia de todos los otros conjuntos de sondas. Para los experimentos en animales, se realizó una prueba exacta de Fisher de dos colas para determinar la significancia en el porcentaje de ratones que desarrollaron tumores palpables en cada grupo.

Número de acceso

Los datos de micromatrices de expresión génica utilizados para analizar la expresión génica diferencial tras el tratamiento con MDV3100 frente a DMSO en líneas espontáneas y modificadas se han depositado en NCBI Gene Expression Omnibus con el acceso GSE44924 y GSE44927, respectivamente.

Se enumeran procedimientos experimentales adicionales en los **Métodos complementarios**.

55 MÉTODOS COMPLEMENTARIOS

Análisis de sec-ARN

La alineación de sec-ARN consistió en preprocesamiento fastq, generación de archivos fasta conjuntos de genoma/transcriptoma contra los que alinear, y alineación con bowtie2 y una versión modificada de tophat1.3; véase más adelante para más detalles.

60 **Preprocesamiento FASTQ:** Las lecturas emparejadas se preprocesaron para recortar bases de baja calidad en el extremo 3', así como también las secuencias de adaptador. En primer lugar, se eliminaron las bases de baja calidad del extremo 3' utilizando el algoritmo BWA (es decir, la lectura se recorta para maximizar la suma de las calificaciones de calidad en la escala Phred menos 20 * longitud de lectura resultante). Los pares de lectura donde cualquier lectura fue inferior a una longitud de 50 pb después del recorte de calidad se eliminaron. A continuación, se comprobó la complementariedad de los pares de lectura. La complementariedad que dio como resultado una protuberancia en 3' que coincidió con una de las

secuencias de adaptador Illumina se sometió a recorte de la protuberancia. Si la complementariedad indicó un tamaño de inserción de fragmentos inferior a 67 pb, el par de lectura se eliminó.

Generación de archivos conjuntos de genoma/transcriptoma: Con el fin de alinear de manera competitiva lecturas contra el genoma (procedente de contaminación de ADN, transcripción aleatoria o pre-ARNm) y transcriptoma, se crearon numerosos archivos FASTA combinados. Además, las secuencias que representan phiX, ARNr, las secuencias «señuelo» derivadas de 1000 genomas y secuencias de ácido nucleico viral (TaxID 10239) de la SeqRef (1) se incluyeron en los archivos FASTA combinados. El genoma utilizado fue NCBI GRCh37.5; sin embargo, todos los polimorfismos de un único nucleótido en la referencia se permutaron al alelo alternativo si este alelo era más común en al menos un 75% de las poblaciones anotadas de acuerdo con dbSNP137. Se crearon las secuencias del transcriptoma usando UCSC knownGene. Se crearon tres archivos FASTA de transcriptoma para adjuntar a las secuencias anteriores:

(1) Dado que la longitud de lectura más larga utilizada fue de 101 nucleótidos, se incluyeron 100 pares de bases flanqueando cada unión anotada, donde el flanco siguió a otras uniones para exones con una longitud de menos de 100 pb. Se utilizó esta versión en el primer paso de Tophat, que realiza alineaciones de un solo extremo.

(2) Típicamente, el percentil 99 de los tamaños de los fragmentos tuvo una longitud de menos de 500 pares de bases. Por lo tanto, también se creó una versión que siguió a los 500 pares de bases flanqueando cada unión anotada, donde el flanco siguió a otras uniones anotadas para el transcrito en cuestión. Las uniones solapantes se combinaron para minimizar el archivo de alineación FASTA de destino; por ejemplo, un gen con una sola isoforma donde cada exón tuvo una longitud <500 pb tendría un solo registro FASTA que contenía la secuencia de todo el ADNc. Un gen con 2 isoformas, donde una incluye un exón con un corte y empalme alternativo, contendría 2 registros FASTA; uno con todo el ADNc que contiene el exón con corte y empalme alternativo, y uno con una longitud de 1000 nucleótidos que contiene los 500 pb que flanquean la unión que eliminó dicho exón en el corte y empalme. Se utilizó esta versión para la alineación de extremos emparejados utilizando Bowtie 2.

(3) Para aquellas muestras con tamaños de fragmentos más largos, igual que en (2) pero con flancos de 1000 pb en lugar de flancos de 500 pb.

Los nombres de las secuencias para cada unión indicaron la(s) posición(posiciones) de los nucleótidos incluidos en el genoma de referencia, para permitir un fácil cartografiado de vuelta a las coordenadas genómicas. Cada una de estas 3 versiones se concatenó con el genoma de referencia + otras secuencias enumeradas anteriormente, y se indexó utilizando Bowtie 2.0.0-beta7 así como también bowtie 0.12.8.

Alineación de archivos FASTQ: Los archivos FASTQ se alinearon en primer lugar utilizando bowtie2.0.0-beta7 (2), utilizando los siguientes parámetros:

```
bowtie2 -D 18 -R 0 -L 28 -N 1 -i L,0,.32 --mp 40,30
--score-min C,-132,0 --gbar 3 --rdg 80,2 --rfg 80,5 -k 10
-x GRCh37c_knownGene_pe500.juncs
-1 read1.fastq.trimmed.txt -1 read2.fastq.trimmed.txt
--no-mixed -X 1000 -p 4 -reorder
```

así como también rg-id y diversos parámetros rg para identificar la muestra, donde el archivo GRCh37c_knownGene_pe500.juncs se refiere a (2) en el archivo conjunto de genoma/transcriptoma anterior.

Las lecturas que no se cartografiaron, se cartografiaron 10 veces independientes (el máximo permitido) o tuvieron un emparejamiento erróneo en los 2 primeros o últimos pb, se consideraron no alineadas y se redirigieron a un archivo FASTQ para un recartografiado utilizando Tophat. Todas las otras lecturas tuvieron sus archivos BAM editados para utilizar las coordenadas genómicas y tuvieron un cartografiado redundante provocado por el archivo combinado de genoma/transcriptoma eliminado.

Las lecturas no alineadas por la alineación Bowtie2 inicial se alinearon con una versión modificada de la versión de Tophat 1.3 (3). Las modificaciones permiten principalmente el archivo de genoma/transcriptoma fasta híbrido indicado ((1) de la parte anterior) como entrada y conversión de las lecturas cartografiadas de transcriptoma a su ubicación genómica dentro de Tophat. El proceso del árbol de decisión para elegir la mejor alineación emparejada de las posibles alineaciones individuales también se modificó en un proceso iterativo, para optimizar la reducción del número de emparejamientos erróneos de pares de bases. Las modificaciones poco importantes incluyeron la modificación en la segmentación de las lecturas completas y la cantidad de secuencia flanqueante utilizada para cartografiar segmentos. Se utilizó Tophat utilizando los siguientes argumentos de ejemplo, junto con los parámetros de grupo de lectura apropiados:

```
tophat --num-threads=4 -r -34 --mate-std-dev 126 --bwt-idx-prefix=GRCh37c
--with-transcriptome-prefix=GRCh37c_knownGene_se.juncs
-G knownGene.refFlat.gtf --library-type fr-unstranded
--segment-length=25 --max-insertion-length 10 --max-deletion-length 10
-F 0.05 -a 12 --microexon-search --no-coverage-search --bowtie-e 45
--segment-mismatches 2 --max-multihits 25
bowtie2_unaligned.1.fq.gz bowtie2_unaligned.2.fq.gz
```

donde los parámetros de tamaño de inserción (-r y --mate-std-dev) se estiman empíricamente desde el cartografiado bowtie2 inicial hasta el genoma/transcriptoma conjunto. El cartografiado inicial de bowtie de extremo único dentro del tophat modificado se obtiene de la siguiente manera:

```
bowtie -q -e 45 --nomaqround --sam --sam-nohead -p 4 -k 25 -m 25
GRCh37c_knownGene_se.juncs - < zcat left_kept_reads.fq.gz
```

El bam resultado de tophat (accepted_hits.bam) se combinó con el resultado de la alineación de bowtie2 original para crear un único archivo de alineación. Solo los pares de lectura que tuvieron una alineación óptima única con el

genoma/transcriptoma humano se mantuvieron posteriormente en el archivo de alineación de resultado final (es decir, las lecturas de cartografiado múltiple, las lecturas de ARNr y las lecturas virales se excluyeron de los análisis posteriores).

Descubrimiento de mutaciones asociadas con la resistencia de Sec-ARN

Los archivos bam alineados se marcaron para lecturas duplicadas utilizando la herramienta MarkDuplicates disponible de Picard. A continuación, se utilizó GATK v1.5 (4) para la recalibración de la calidad de las bases, utilizando dbSNP137 como sitios conocidos y opciones y covariables estándar. Las variantes se obtuvieron utilizando el UnifiedGenotyper de GATK v1.5, y se anotaron para métricas de calidad estándar, presencia en dbSNP137, el proyecto de secuenciación de exomas NHLBI (ESP6500, Exome Variant Server, NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA. y COSMIC v58 (5), así como también la función que utiliza SnpEFF (6) y la base de datos de transcripción ensemble GRCh37.68 disponible de SnpEFF.

Las mutaciones que fueron constantes en todas las muestras se separaron por filtración a continuación. Los resultados de calificación de probabilidad posterior de UnifiedGenotyper se sumaron en todas las muestras, para cada genotipo (referencia homocigótica, heterocigótica y alternativa homocigótica) para cada variante; el mínimo de las tres calificaciones sumadas representa una medida de la discordancia en la escala phred por variante; aquellas variantes con una discordancia menor a 100 se excluyeron de un análisis posterior, al igual que las variantes que se produjeron en ciclos de homocigosidad, mostraron evidencia (>10%) del alelo alternado en muestras denominadas referencia homocigótica, o tuvieron en promedio menos de un 20% de las lecturas de un alelo alternativo en las muestras denominadas heterocigóticas o alternativa homocigótica. También se eliminaron las variantes si no dieron como resultado un cambio predicho en la secuencia codificante de la proteína.

Análisis de inmunotransferencia

Lisados de células enteras: Las células se lisaron en tampón TPER (Thermo Scientific, n.º cat 78510) que contenía proteasa Halt y mezcla inhibidora de fosfatasa (Thermo Scientific, n.º cat 78440) y posteriormente se hirvieron durante 5 minutos. Se cargaron aproximadamente 20 µg de proteína por carril y se resolvió mediante electroforesis en poliacrilamida con SDS. La proteína se transfirió a membranas de nitrocelulosa, se bloquearon con leche con bajo contenido de grasa al 5% y como molécula de detección se utilizaron anticuerpos contra AR N-20 (dilución 1:1000, Santa Cruz, n.º cat Sc-816), histona H3 (dilución 1:2000, señalización celular, n.º cat 9715s), β-tubulina (dilución 1:1000, Abcam, n.º cat ab6046), HA-HRP (1:500, Roche, n.º cat 12 013 819 001), β-actina (dilución 1:3000, Sigma, n.º cat A-2228) y p-AKT (dilución 1:1000, Cell Signaling, n.º cat 4060). Las membranas se incubaron con anticuerpo secundario anti-ratón (dilución 1:4000, Millipore n.º cat 12-348) o anticuerpo secundario anti-conejo (dilución 1:4000, Pierce, n.º cat 31430) conjugados con peroxidasa de rábano picante (HRP) durante 1 h y las señales se desarrollaron utilizando el método ECL (GE Healthcare).

Fraccionamiento de proteínas nucleares y citoplasmáticas: Para los clones resistentes espontáneos, se sembraron 1 millón de células C1 y del clon n.º 1 en medio RPMI 1640 complementado con un 10% de FCS en matraces T75 y se dejaron crecer durante 2 d antes del tratamiento con DMSO, R1881 0,1 nM o MDV3100 10 µM durante 24 h. Para las líneas modificadas genéticamente, se sembraron 1 millón de líneas derivadas de LNCaP en medio RPMI 1640 complementado con un 10% de FCS y 100 ng mL⁻¹ de Dox (Sigma, 44577-1G) en matraces T75 y se dejaron durante 2 días antes del tratamiento con DMSO, R1881 0,1 nM o MDV3100 10 µM durante 24 h. Como alternativa, el medio se aspiró y se reemplazó con medio RPMI 1640 sin rojo fenol que contenía un 10% de CSS y 100 ng mL⁻¹ de Dox. Después de cuatro días de crecimiento en un 10% de CSS, se añadió DMSO o MDV3100 10 µM a los matraces y dejó durante toda la noche. Al día siguiente, las células se recolectaron con tripsina, se centrifugaron a 500 xg durante 5 minutos, se lavaron con PBS, se transfirieron a tubos de microcentrifuga de 1,5 mL y se sedimentaron mediante centrifugación a 500 xg durante 2-3 minutos. La extracción de proteínas citoplasmáticas y nucleares se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Thermo Scientific, n.º cat 78833). Resumiendo, el sedimento se resuspendió en 500 µL de tampón Cer I enfriado con hielo y se incubó en hielo durante 10 min. Después de la incubación, se añadieron 27,5 µL de tampón Cer II enfriado con hielo, se agitó en un vórtex y se incubó durante 1 min en hielo. La mezcla lisado/Cer I/II se agitó en vórtex de nuevo, se centrifugó a 14000 x g durante 5 min y el extracto citoplasmático (sobrenadante) se transfirió a tubos preenfriados. El sedimento insoluble, que contenía los núcleos, se resuspendió en 250 µL de tampón NER enfriado con hielo, se agitó en vórtex y se colocó en hielo. La muestra se agitó en vórtex durante 15 s cada 10 min durante 40 min en total. Después de la incubación, las muestras se centrifugaron a 14000 x g durante 10 min. El sobrenadante, que contenía el extracto nuclear, se transfirió a tubos preenfriados. Estas muestras se procesaron para el análisis de inmunotransferencia como se ha descrito anteriormente.

Mutagénesis QuikChange

La región que codifica AR amplificada por PCR se insertó en el vector pcDNA3.1. Se crearon plásmidos de expresión de mutantes individuales T878A, W742C, W742L, F877L y mutante doble F877L/T878A con los siguientes conjuntos de cebadores (5'-GAGAGCTGCATCAGTTTCGCTTTTGACCTGCTAATC-3' (SEQ ID NO: 58) y 5'-GATTAGCAGGTCAAAAGCGAACTGATGCAGCTCTC-3' (SEQ ID NO: 59), 5'-CATTCACTACTCCTGCATGGGGCTCATGGTG-3' (SEQ ID NO: 60) y 5'-CACCATGAGCCCCATGCAGGAGTACTGAATG-3' (SEQ ID NO: 61), 5'-GTCATTCACTACTCCTGATGGGGCTCATGG-3' (SEQ ID NO: 62) y 5'-CCATGAGCCCCATCAGGGAGTACTGAATGAC-3' (SEQ ID NO: 63), 5'-GAGAGCTGCATCAGCTCACTTTTGACCTG-3' (SEQ ID NO: 64) y 5'-CAGGTCAAAAGTGAGCTGATGCAGCTCTC-3' (SEQ ID NO: 65), 5'-GAGAGCTGCATCAGCTCGCTTTTGACCTG-3' (SEQ ID NO: 66) y 5'-CAGGTCAAAAGCGAGCTGATGCAGCTCTC-3'.

(SEQ ID NO: 67) mediante mutagénesis dirigida al sitio utilizando el kit de mutagénesis dirigida al sitio QuikChange XL (Agilent, n.º cat 200517-5).

Ensayos indicadores con luciferasa

- 5 Los ensayos indicadores se realizaron de la siguiente manera: se sembraron 3×10^5 células HEK293T en placas de 6 pocillos en DMEM complementado con un 10% de FCS y 1x NEAA 24 h antes de la transfección. Como alternativa, se sembraron 1×10^6 células VCaP o 3×10^5 células PC3 en placas de 6 pocillos en medio apropiado complementado con un 10% de CSS 24 h antes de la transfección. El día siguiente, 400 ng del plásmido indicador de luciérnaga de AR (4xARE-luciferasa), 100 ng del plásmido de control (plásmido que expresa luciferasa de *Renilla* constitutiva) y 200 ng de plásmidos
- 10 pcDNA que sobreexpresan AR descritos anteriormente se utilizaron en una cotransfección utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen, n.º cat 11668027). El medio se reemplazó 6 h después de la transfección con medio fresco que contenía DMSO, R1881 0,1 nM, MDV3100 10 μ M, bicalutamida 10 μ M, MDV3100 10 μ M + R1881 0,1 nM y bicalutamida 10 μ M + R1881 0,1 nM. Las células se recolectaron ~16 h después del tratamiento y se sometieron a ensayo para determinar la actividad luciferasa utilizando el luminómetro de placas Glomax 96 (Promega). La actividad de la luciérnaga se normalizó
- 15 respecto a *Renilla* utilizando el reactivo de ensayo de luciferasa dual (Promega, E1910). Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces.

Ensayos de crecimiento celular

Células LNCaP

- 20 *Ensayos en placas de microvaloración a corto plazo:* Se sembraron 1000 células (líneas resistentes espontáneas o modificadas) en medio complementado con un 10% de FCS. Para los clones resistentes espontáneos, se añadieron concentraciones crecientes de los compuestos en el día de la siembra, mientras que para las líneas modificadas, se añadieron los compuestos después de 2 d de tratamiento con doxiciclina. En todos los casos, los ensayos de crecimiento se realizaron utilizando el reactivo del ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega, n.º cat G7573) 7
- 25 d después del tratamiento con el compuesto.

- Ensayos de formación de colonias a largo plazo:* Se sembraron 5000-7500 células (líneas resistentes espontáneas o modificadas) en placas de 6 pocillos en medio complementado con un 10% de FCS. Para los clones con resistencia espontánea, se añadió MDV3100 a las placas el día de la siembra y se reemplazó el medio/compuesto cada semana. Para las líneas modificadas, se añadió doxiciclina el día de la siembra y se añadieron varias concentraciones de los
- 30 compuestos (MDV3100/bicalutamida) después de 2 d. Al igual que con las líneas resistentes espontáneas, el medio/dox/compuesto se reemplazó una vez a la semana. Las colonias viables se tiñeron después de cultivos de 3-4 semanas. Después de la aspiración del medio, se añadió cristal violeta al 0,5% a los pocillos y se dejó durante toda la noche. A la mañana siguiente, se retiró la solución de cristal violeta y los pocillos se lavaron con cuidado con ddH₂O para eliminar la solución de tinción residual. Las placas se secaron al aire durante toda la noche antes de la obtención de
- 35 imágenes.

Células VCaP

- Se sembraron 500 000 células/pocillo de células VCaP, que expresaban AR-T878A o -F877L/T878A, en placas de 6 pocillos en DMEM complementado con un 10% de FCS. Se utilizó doxiciclina para inducir la expresión de los plásmidos
- 40 de AR durante 2 d antes de la adición de DMSO o MDV3100 10 μ M. Los ensayos de crecimiento se realizaron utilizando el reactivo del ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo (Promega, n.º cat G7573) 8 d después del tratamiento con el compuesto. Se compararon los datos con el día 0 (el día en el que se administró el compuesto).

Células Myc-CaP

- 45 Se sembraron 100 células/pocillo de células Myc-CaP, portadoras de AR-T878A o -F877L/T878A, en placas de 6 pocillos en DMEM complementado con un 10% de FCS. Se añadieron 0,2 μ g/mL de doxiciclina al medio para inducir la expresión de AR. El medio se cambió cada 3 días hasta que se formaron colonias (~2 semanas). Se utilizó cristal violeta al 0,1% para teñir las colonias.

Células 22RV1

- 50 Se sembraron 5000 células/pocillo de células 22Rv1 en placas de 6 pocillos en DMEM complementado con un 10% de FCS. Las células se trataron con diversos compuestos durante 14 días antes de la tinción con cristal violeta al 0,1%.

Generación de xenoinjertos espontáneos de LNCaP resistentes a MDV3100

- 55 Se implantaron por vía subcutánea 10×10^6 células LNCaP en los costados de ratones castrados macho. Una vez que los tumores alcanzaron 200-300 mm³, se inició el tratamiento con vehículo o 30 mg/kg de MDV3100. Después de 3-4 meses de tratamiento diario, varios tumores adquirieron de manera espontánea la capacidad de crecer en presencia de MDV3100. Cuando estos tumores alcanzaron ~1000-1500 mm³, se sacrificaron los ratones y se recogieron los tumores. Los fragmentos tumorales de dos tumores resistentes a MDV3100 (un fragmento del ratón 1 y tres fragmentos del ratón
- 60 2) se reimplantaron posteriormente en receptores secundarios, y se inició de nuevo el tratamiento con MDV3100 (R1-R4). Además, se implantó un único fragmento tumoral de los ratones 1 y 2 en los receptores secundarios para ser tratados con vehículo (C1-C2). Se recogió ARN de todos los tumores una vez que alcanzaron 1000-1500 mm³ y se realizó la secuenciación del transcriptoma completo tal como se ha descrito anteriormente.

65 REFERENCIAS

1. Pruitt KD, Tatusova T, Brown GR, Maglott DR. NCBI Reference Sequences (RefSeq): current status, new features and genome annotation policy. *Nucleic acids research*. 2012;40 (número de la base de datos): D130-5; publicación electrónica 29/11/2011.
2. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature methods*. 2012;9(4):357-9; publicación electrónica 06/03/2012.
3. Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*. 2009;25(9):1105-11; publicación electrónica 18/03/2009.
4. DePristo MA, Banks E, Poplin R, Garimella KV, Maguire JR, Hartl C, *et al*. A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data. *Nature genetics*. 2011;43(5):491-8; publicación electrónica 12/04/2011.
5. Forbes SA, Bindal N, Bamford S, Cole C, Kok CY, Beare D, *et al*. COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. *Nucleic acids research*. 2011;39 (número de la base de datos): D945-50; publicación electrónica 19/10/2010.
6. Cingolani P, Platts A, Wang le L, Coon M, Nguyen T, Wang L, *et al*. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly*. 2012;6(2):80-92; publicación electrónica 26/06/2012.

EJEMPLO 2. Desarrollo y caracterización de un modelo de resistencia espontánea a MDV3100

Para dilucidar el(los) mecanismo(s) endógeno(s) de resistencia a MDV3100, esta divulgación describe un modelo de resistencia espontánea en células LNCaP (**Fig. 1b**). Aunque el cultivo a corto plazo con MDV3100 (<1,5 meses) induce estasis en toda la población (**Fig. 1a**, FCS + MDV respecto a FCS), el cultivo a largo plazo con MDV3100 1 µM permite que algunas células escapen, lo que da como resultado la aparición de clones resistentes (**Fig. 1b**). Los clones resistentes que mostraron propiedades de crecimiento similares a las poblaciones de control (C1-C3, **Fig. 1b**) se seleccionan para una caracterización adicional. Los ensayos a corto plazo basados en CTG (**Fig. 1c**) y de formación de colonias a largo plazo confirmaron el fenotipo de resistencia parcial. La caracterización adicional reveló que cuatro de los siete clones resistentes (clones n.º 1, 15, 19, 24 muy resistentes, curvas y fuente color verde) mostraron una resistencia significativamente mayor a MDV3100, siendo la CI_{50} conjunta >10 µM en comparación con <10 µM para los tres clones restantes (clones n.º 9, 10 y 14 poco resistentes, curvas y fuente color rojo) y 0,2 µM para los controles (**Fig. 1c**). Por el contrario, los clones poco resistentes mostraron una mayor resistencia a la bicalutamida (CI_{50} >10 µM frente a 5 µM para los muy resistentes y 1 µM para los controles) (**Fig. 1c**), y ambos conjuntos de clones mostraron una sensibilidad similar a un agente citostático no relacionado Lee011 como las poblaciones de control (**Fig. 6b**). En conjunto estos datos sugieren que los clones resistentes aislados muestran preferentemente resistencia a los antiandrógenos, con el(los) mecanismo(s) de resistencia en clones muy resistentes afinados para promover específicamente la resistencia a MDV3100.

Para dilucidar el(los) mecanismo(s) de resistencia, primero se analizaron los niveles de expresión de AR; se ha mostrado previamente que la sobreexpresión de AR promueve la resistencia a los niveles en castración de andrógenos y bicalutamida antiandrogénica. Chen *et al*. *Nature Med*. 10: 33-39 (2004); y Kawata *et al*. *Prostate* 70: 745-754 (2010). Inesperadamente, esta divulgación no pudo observar un cambio significativo en la expresión de AR en el ARN (datos no mostrados) y el nivel de proteína (**Fig. 1d**). Además, el análisis global de la actividad de la ruta de AR mostró pocos cambios en las condiciones de referencia (**Fig. 1e**), con la excepción de unos pocos genes diana posteriores, lo que sugiere de forma acumulativa la falta de modulación significativa de la ruta AR en las condiciones de referencia.

EJEMPLO 3. Los clones muy resistentes son resistentes a la modulación de la ruta de AR por parte de MDV3100

Para explorar más a fondo los mecanismos moleculares que impulsan la resistencia, esta divulgación realizó un análisis en matriz en tres controles y siete clones resistentes tratados con DMSO o MDV3100 durante 24 h. Como se esperaba, esta divulgación detectó que muchos genes (~101) se expresan de manera única y diferencial en los tres controles cuando se tratan con MDV3100, genes enriquecidos de manera abrumadora para funciones relacionadas con el ciclo celular y la reparación del daño del ADN, lo que confirma su sensibilidad a la influencia citostática de MDV3100. Esta divulgación también descubrió ~191 genes que solo mostraron una expresión diferencial significativa en el control y clones poco resistentes, de los cuales los genes con una disminución regulada están enriquecidos para el ciclo celular/daño en el ADN e inesperadamente, la ruta de señalización nuclear del receptor de andrógenos ($P = 2.01 \times 10^{-2}$). Este hallazgo proporcionó una visión inicial de la regulación diferencial de la ruta de andrógenos por parte de MDV3100, donde los clones muy resistentes aparentemente muestran resistencia a la modulación. Como confirmación, tanto el análisis de agrupamiento (**Fig. 6a**) como GSEA (**Fig. 2b** y **Fig. 9b**) validaron la actividad reducida de la ruta de AR en las líneas de control y poco resistentes tras el tratamiento con MDV3100, observándose cambios insignificantes en los clones muy resistentes. Esto se valida mediante el análisis por qPCR, que también confirmó los efectos atenuados de MDV3100 en la expresión de los genes diana de AR *KLK3*, *NKX3-1* y *SLC45A3* específicamente en clones muy resistentes (**Fig. 2c**).

Para evaluar si la respuesta de la ruta diferencial a MDV3100 refleja los cambios en la ubicación de AR en los diversos clones, esta divulgación aisló fracciones de proteínas citoplasmáticas y nucleares de una línea de control (C1) y muy resistente (clon n.º 1) tratada con DMSO o MDV3100. La ubicación de la AR nuclear está significativamente afectada en la línea de control tratada con MDV3100, mientras que la ubicación de AR no está significativamente alterada en el clon muy resistente, lo que proporciona una explicación de la actividad sostenida de la ruta de AR en líneas muy resistentes. En conjunto, el análisis de los diversos clones revela una clara distinción entre dos grupos: uno que es más sensible desde un punto de vista fenotípico y que muestra un deterioro significativo de la actividad de la ruta de AR después del tratamiento con MDV3100, y el segundo que es más resistente desde un punto de vista fenotípico y genotípico a MDV3100.

EJEMPLO 4. El análisis de sec-ARN descubre una mutación sumamente recurrente en AR que se correlaciona con la resistencia

Aunque está claro que la actividad de la ruta de AR es resistente a la modulación por parte de MDV3100 en clones muy resistentes, no está claro 1) cómo esta ruta permanece activa en presencia de MDV3100 y 2) si la actividad sostenida de la ruta de AR es responsable del fenotipo de resistencia observado en los clones muy resistentes. Dado que el análisis en matriz no logró identificar genes/rutas relevantes que puedan explicar racionalmente la actividad sostenida de la ruta de AR, esta divulgación, sin desear ceñirse a ninguna teoría en particular, razonó que tal vez una(varias) mutación(es) en los componentes de la ruta de AR pueden desensibilizar los clones muy resistentes a MDV3100. Para explorar esta posibilidad, esta divulgación realizó un análisis de sec-ARN en las líneas descritas anteriormente e incluyó varias líneas que se volvieron resistentes de manera espontánea al cultivo a largo plazo en MDV3100 10 μ M; estos clones, como los clones poco resistentes, continuaron mostrando modulación de la ruta de AR en respuesta a MDV3100. Curiosamente, esta divulgación descubrió varias mutaciones recurrentes que son compartidas por la mayoría de los clones resistentes que son indetectables en las poblaciones de control y viceversa. Estos datos implican la presencia de al menos dos poblaciones en los LNCaP parentales, una fracción principal que es muy sensible desde un punto de vista fenotípico a MDV3100 y una subpoblación menor que probablemente divergió hace muchas generaciones, acumuló muchas mutaciones novedosas y es más resistente desde un punto de vista fenotípico a MDV3100. El análisis de agrupamiento no supervisado basado en los perfiles mutacionales de cada uno de los clones dio como resultado dos grupos: uno que contenía las tres líneas de control y el clon muy resistente n.º 19, y el segundo que agrupa todos los clones restantes. El hecho de que la mayoría de los clones se agrupen juntos hace que la identificación de la(s) mutación (mutaciones) impulsora(s) sea difícil sin un conocimiento *a priori*; sin embargo, el conocimiento de los autores de la modulación atenuada de la ruta de AR en clones muy resistentes les permitió centrar su búsqueda en las mutaciones únicas para estos clones. Es emocionante que esta divulgación haya identificado una única mutación recurrente compartida por los cuatro, una mutación en AR, la diana directa de MDV3100. La mutación F877L novedosa se encuentra en el dominio de unión al ligando de AR, es heterocigota (**Fig. 11**) y está próxima a una mutación homocigótica T878A preexistente en células LNCaP, una mutación que se sabe que confiere resistencia a la flutamida (Fenton *et al.* 1997; y Hara *et al.* 2003). La frecuencia alélica del mutante respecto al tipo natural es de aproximadamente un 40% con la excepción del clon n.º 15, que presenta la frecuencia más baja de un 20%. La secuenciación de Sanger confirma la presencia de la mutación F877L en el ADN genómico (**Fig. 11**).

EJEMPLO 5. Modelado computacional y validación experimental de un cambio de antagonista a agonista

Para estudiar funcionalmente las hipótesis generadas por la modelización computacional, esta divulgación evaluó las respuestas transcripcionales a un agonista y los antiandrógenos bicalutamida y MDV3100 de AR de tipo natural; mutantes únicos T878A, W742C, W742L y F877L; y mutante doble F877L/T878A en ensayos de transactivación. En apoyo de los datos de la modelización, esta divulgación observa que solo los AR mutante único F877L y mutante doble F877L/T878A tuvieron una respuesta de transactivación sustancial a MDV3100, comparable a R1881 0,1 nM, lo que sugiere un cambio de antagonista a agonista que es sumamente específico para MDV3100. Sin embargo, estos datos están en marcado contraste con la falta de modulación de la ruta observada en clones muy resistentes en respuesta a MDV3100 (**Fig. 2b-c**). Estos resultados aparentemente contradictorios pueden deberse en parte a las condiciones experimentales, mientras que los experimentos de transactivación analizaron la influencia de alelos individuales en una línea que no expresa AR, los clones muy resistentes albergan la mutación F877L de manera heterocigótica. Para estudiar si también se observa un cambio de antagonista a agonista para MDV3100 en clones muy resistentes, esta divulgación evalúa las respuestas transcripcionales en medios desprovistos de andrógenos endógenos, lo que minimiza la actividad de la ruta de AR en condiciones de referencia y reduce la respuesta de AR endógeno a MDV3100. Al igual que en las observaciones realizadas a partir de los ensayos con indicadores, el tratamiento con MDV3100 solo o combinado con agonista mejoró significativamente la expresión de *KLK3* en clones muy resistentes. Estos datos en conjunto implican claramente que la mutación F877L/T878A permite que el AR mutante utilice MDV3100 como agonista, un cambio específico para MDV3100 ya que se mantiene la sensibilidad a la bicalutamida.

EJEMPLO 6. AR mutante F877L/T878A confiere resistencia fenotípica a MDV3100 en LNCaP modificadas genéticamente

Aunque los alelos F877L y F877L/T878A pueden reactivar de manera potente la ruta de AR en presencia de MDV3100, todavía no está claro si este rescate de la actividad de la ruta se traduce lo suficientemente en resistencia fenotípica, particularmente en los clones muy resistentes que albergan varias de otras mutaciones. Para abordar de manera suficiente esta pregunta, esta divulgación modifica células LNCaP para que expresen de manera inducible los AR mutantes T878A, F877L/T878A y W742C/T878A. El nivel de expresión de AR F877L/T878A es significativamente más bajo que el de los AR mutantes T878A y W41C/T878A, según lo evaluado por qPCR y análisis de inmunoelectrotransferencia. En apoyo de informes anteriores, la expresión de todos los alelos mutantes portadores de T878A y el alelo W742C/T878A promovieron un cambio de antagonista a agonista específico para hidroxiflutamida (Fenton *et al.* 1997; y Hara *et al.* 2003); y bicalutamida (Hara *et al.* 2003), respectivamente (**Fig. 15**). En contraste, a pesar de la débil expresión del alelo F877L/T878A, se observa un rescate significativo de la actividad de la ruta de AR específicamente en presencia de MDV3100, lo que confirma el cambio de antagonista a agonista (**Fig. 5a y Fig. 15**). Además, la expresión ectópica de los alelos T878A y W742C/T878A solo rescató débilmente la señalización de AR en presencia de MDV3100, lo que confirma una vez más la especificidad y la potencia de la mutación novedosa F877L (**Fig. 51 y Fig. 15**). Congruente con los datos de expresión génica, la ubicación nuclear de AR está significativamente afectada en la línea que expresa T878A mientras

que la ubicación de AR no se ve afectada en la línea F877L/T878A tras el tratamiento con MDV3100, lo que confirma la actividad sostenida de AR en la línea F877L (**Fig. 5b**).

El potencial completo del AR mutante F877L/T878A para utilizar MDV3100 como agonista se logra cuando se realiza un experimento similar en condiciones de deficiencia de andrógenos. Mientras que la expresión de los alelos T878A y W742C/T878A rescata mínimamente la actividad de la ruta, la expresión del alelo F877L/T878A potencia la expresión de *KLK3* y *NKX3-1* 3-4 veces en condiciones de tratamiento con MDV (**Fig. 16a**). Curiosamente, AR W742C/T878A muestra funciones activas constitutivas, que impulsan la expresión de *KLK3* y *NKX3-1* en condiciones de referencia (**Fig. 16**). Los cambios en los niveles de expresión observados anteriormente reflejan fielmente los cambios en la ubicación de AR, con AR F877L/T878A cada vez más localizado en el núcleo después del tratamiento con MDV3100 (**Figs. 16b y 5b**). Una vez más, AR W742C/T878A mostró actividad constitutiva ya que se observa una ubicación nuclear potenciada en las condiciones de referencia (**Fig. 5b**).

Habiendo establecido firmemente que el alelo mutante F877L/T878A puede utilizar MDV3100 como agonista, esta divulgación estudia a continuación si la expresión ectópica de AR F877L/T878A puede conferir resistencia fenotípica. Mientras que la expresión del alelo T878A no logró rescatar el crecimiento, la expresión del alelo F877L/T878A rescató significativamente el crecimiento en condiciones con MDV3100 (**Fig. 5c y Fig. 18a, b**). De acuerdo con observaciones anteriores (**Fig. 15**), la línea de sobreexpresión de F877L/T878A siguió siendo sensible a la bicalutamida (**Fig. 5c**). Curiosamente, la expresión ectópica de W742C/T878A también rescató significativamente el crecimiento en condiciones de tratamiento con MDV3100 y bicalutamida, donde la resistencia a MDV3100 es probable que sea indirecta, debido en parte a su actividad constitutiva (**Figs. 5b, 16**).

EJEMPLO 7. Uso de AR(F877) mutante para cribar fármacos que sensibilizan el AR mutante:

Dos métodos que ha aplicado esta divulgación incluyen 1) transactivación y 2) análisis de la expresión génica para determinar si los compuestos que actúan sobre la ruta de AR pueden usarse como inhibidores de la función AR mutante. Ambos métodos se describen claramente en la sección de métodos.

En resumen, para los ensayos de transactivación, el indicador de AR, un plásmido de control y plásmidos con AR WT o mutante se cotransfectarán 4 horas antes del tratamiento con DMSO, agonista o antagonista de interés. El indicador de AR comprende una ARE (secuencia de elementos de respuesta a andrógenos a la que se une AR), un promotor y un gen indicador, en este caso, luciferasa. 16 h después del tratamiento, se cuantificará la bioluminiscencia. Esta divulgación espera que AR WT active el indicador de AR en presencia de R1881 (agonista) y la señal debería suprimirse lo suficiente en presencia de MDV3100 u otros antagonistas. Sin embargo, para AR F877L, esta divulgación espera que haya una activación suficiente de la actividad del indicador de AR en presencia de agonista y MDV3100. La esperanza de los autores será que el antagonista novedoso bloquee lo suficiente la función de AR F877L, de manera similar a la bicalutamida.

Además de los ensayos de transactivación, también se puede monitorizar el análisis de la expresión génica de genes de AR canónicos, tales como *KLK3*, *TMPRSS2*, *NKX3-1* y *SLC45A3*. Este experimento es similar al experimento descrito en la **Fig. 5b** excepto en que MDV3100 puede ser sustituido por un (varios) compuesto(s) novedoso(s). Esta divulgación espera que mientras MDV3100 puede utilizarse como un agonista para rescatar la señalización, un compuesto novedoso puede ser eficaz para mantener la supresión de la actividad de señalización en las células portadoras de AR-F877L.

EJEMPLO 8. La mutación F877L es suficiente para inducir resistencia genética y fenotípica a MDV3100 en LNCaP modificadas genéticamente

Dado que los clones muy resistentes albergan varias variantes de la secuencia además de la mutación F877L, los autores quisieron estudiar formalmente si la variante AR-F877L es suficiente para promover un fenotipo de crecimiento resistente a MDV3100. Con este fin, las células LNCaP se modificaron para expresar induciblemente los AR mutantes T878A, F877L/T878A y W742C/T878A. En apoyo de informes anteriores, la expresión de todos los alelos mutantes portadores de T878A y el alelo W742C/T878A promovieron un cambio de antagonista a agonista específico para hidroxiflutamida (Tan *et al.* 1997 *Mol. Endocrin.* 11:450-9; Fenton *et al.* 1997 *Clin. Cancer Res.* 3: 1383-8; y Veldscholte *et al.* 1990 *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 173: 534-40) y bicalutamida (Hara *et al.* 2003 *Cancer Res.* 63: 149-53), respectivamente, en función de la regulación del gen diana de AR *KLK3* (PSA).

A pesar de la expresión ligeramente inferior de AR-F877L/T878A, se observó un rescate significativo de la actividad de la ruta de AR en condiciones de cultivo con un 10% de FCS y se observó un efecto agonista significativo en condiciones de cultivo con un 10% de CSS. La influencia de AR-F877L/T878A en la actividad de la ruta reflejó estrechamente los cambios en la ubicación de AR ya que AR-F877L/T878A mostró un influjo nuclear mayor (MDV3100 frente a DMSO) respecto a la línea T878A, tanto en condiciones de cultivo con un 10% de FCS como con un 10% de CSS. Sorprendentemente, los autores también observaron un rescate significativo de la actividad de la ruta en la línea W742C/T878A, probablemente debido a la función activa constitutiva conferida por la mutación doble como se ha publicado anteriormente (Hara *et al.* 2003 *Cancer Res.* 63: 149-53). Una vez establecido que AR-F877L/T878A puede utilizar MDV3100 como un agonista, los autores estudiaron a continuación si la expresión ectópica de AR-F877L/T878A era suficiente para conferir resistencia fenotípica. Aunque solo se observó un rescate modesto en el crecimiento en un ensayo de proliferación a corto plazo, se observó un rescate robusto en un ensayo de formación de colonias a largo plazo en respuesta a MDV3100, pero no a la bicalutamida. Especialmente, la línea W742C/T878A también mostró un crecimiento significativo en presencia de MDV3100, coherente con el rescate de la actividad de la ruta observada anteriormente.

Para evaluar si la mutación T878A es necesaria para el fenotipo de resistencia, se modificaron las células LNCaP para expresar de forma estable el mutante único AR-F877L.

De acuerdo con los datos de transactivación, ARF877L confirió resistencia genética y fenotípica a MDV3100, lo que sugiere que F877L, solo o junto con T878A, es igualmente capaz de conferir un cambio a agonista.

EJEMPLO 9. La función de otorgar resistencia de AR-F877L es ampliamente aplicable a varias líneas de cáncer de próstata

Dado que la mutación F877L en AR puede promover la resistencia a MDV3100 en las células LNCaP con pérdida de PTEN, a continuación los autores cuestionaron si esta mutación es suficiente para conferir ampliamente resistencia en líneas de PCa de diversos acervos genéticos. Con este fin, las líneas VCaP humana (que alberga la fusión TMPRSS2-ERG y amplificación de AR) y Myc-CaP murina (sobrexpresión de Myc) se transdujeron para expresar de manera estable el AR mutante.

De acuerdo con el fenotipo de resistencia observado en las células LNCaP, ambas líneas también presentaron resistencia parcial a MDV3100, lo que sugiere que la mutación F877L en AR tiene el potencial de conferir resistencia a MDV3100 en diversos contextos genéticos.

Tomados en conjunto, los datos de los autores implican un papel directo para AR-F877L, AR-F877L/T878A y variantes de AR con actividad potencialmente constitutiva, tales como W742C/T878A, como impulsores de resistencia a MDV3100. Aunque las variantes con actividad constitutiva pueden promover promiscuamente la resistencia a varias clases de antiandrógenos, los autores muestran que la mutación F877L en AR promueve selectivamente la resistencia a MDV3100.

EJEMPLO 10. Las células portadoras de AR-F877L son resistentes a MDV3100 en entornos de castración *in vivo*

Habiendo demostrado que la mutación F877L en AR confiere un cambio a agonista para MDV3100 que puede promover la resistencia, a continuación, los autores se preguntaron si las células portadoras de F877L se vuelven dependientes de este cambio para el crecimiento celular en condiciones de privación de andrógenos, una dependencia que se ha observado en la clínica para otros antiandrógenos tales como la flutamida (Suzuki *et al.* 1996 *Prostate* 29: 153-8). Curiosamente, aunque el cambio no impulsó la proliferación de clones portadores de F877L *in vitro*, los autores observaron una marcada dependencia de MDV3100 para el crecimiento *in vivo* cuando las células portadoras de F877L se implantaron en ratones machos castrados. Aunque los tumores de control (C1) mostraron estasis inmediata después del tratamiento con MDV3100, los tumores resistentes (clon n.º 1) no pudieron crecer hasta que MDV3100 los estimuló. Específicamente, después de un período prolongado de estasis, 10 de 15 ratones tratados con MDV3100 desarrollaron tumores de crecimiento rápido en comparación con 2 de 15 en el grupo de vehículo (P = 0,0078, prueba de la t exacta de Fisher, de dos colas), mientras que las tasas de captación del tumor en las células de control (C1) fueron indistinguibles (9 de 15 frente a 10 de 15). Además, los tumores resistentes continuaron creciendo en presencia de MDV3100, de acuerdo con observaciones *in vitro* anteriores, lo que sugiere de forma acumulativa que las células portadoras de AR-F877L requieren MDV3100 para crecer *in vivo*. No se observó pérdida significativa de peso corporal durante el período de tratamiento en los cuatro grupos. El análisis molecular del punto final confirmó un cambio a agonista de MDV3100 asociado con la mutación F877L *in vivo* ya que los tumores resistentes tratados con MDV3100 mostraron una actividad de la ruta de AR un poco más elevada, como lo muestra la expresión del gen diana de AR, respecto a tumores resistentes tratados con vehículo, y una actividad significativamente mayor respecto a los tumores de control tratados con vehículo. Estos datos destacan de forma acumulativa la dependencia de las células portadoras de F877L de MDV3100 para el crecimiento *in vivo* en condiciones de privación de andrógenos.

EJEMPLO 11. Actuar sobre CDK4/6 como una estrategia terapéutica para resolver la resistencia a MDV3100

Una vez establecido que AR-F877L puede promover la resistencia a MDV3100 en diversos contextos genéticos *in vitro* e *in vivo*, el siguiente objetivo de los autores fue desarrollar estrategias racionales para antagonizar el alelo mutante. Como alternativa al desarrollo de antiandrógenos novedosos que continúan actuando sobre la cavidad hipermutable de unión al ligando de AR (Balbas *et al.* 2013 *eLife* 2: e00499), el objetivo de los autores fue identificar estrategias terapéuticas que pueden ser más sostenibles en la clínica. Con este fin, los autores observaron un enriquecimiento significativo en los genes que pertenecen a los conjuntos de genes del «ciclo celular» y «activación de E2F1» además de la «activación de AR» en clones muy resistentes tratados con MDV3100, lo que sugiere que estos clones pueden potencialmente mantener la proliferación en condiciones de tratamiento con MDV3100 a través de la expresión continua de genes diana de E2F1. Esta es una hipótesis atractiva ya que se sabe que la señalización de andrógenos, un regulador crucial de la transición G1-S, promueve el ensamblaje activo de CDK4/ciclina D1 y, por lo tanto, la activación de la función de E2F1 (Schiewer *et al. End. Relat. Cancer* 19: 1-12). De acuerdo con esta noción, los autores observaron que el tratamiento con MDV3100 suprimió la expresión de los genes diana de E2F1 DHFR y TK1 en una línea de control, lo que confirma la señalización de AR como un regulador de la función de E2F1. Por el contrario, las células portadoras de F877L fueron capaces de mantener una mayor expresión de DHFR y TK1 en condiciones de tratamiento con MDV3100 en relación con una línea de control (Fig. 6A). Basándose en estos datos, razonamos que la actividad de E2F1 puede servir como un efector posterior de la señalización de AR, y como tal, los reguladores de la función de E2F1 pueden servir como nodos terapéuticos cruciales cuando las terapias dirigidas a AR se vuelvan ineficaces. De acuerdo con esta hipótesis, los autores observaron que el crecimiento de clones muy resistentes (Fig. 6B) y las líneas LNCaP modificadas para expresar AR-F877L/T878A (Fig. 6C) fueron tan sensibles a los inhibidores de CDK4/6 LEE011 y PD033299 como la bicalutamida. Curiosamente, la respuesta a la inhibición de CDK4/6 no solo se limitó a las células portadoras de F877L ya que las células 22Rv1 independientes de andrógenos, una línea de PCa que expresaba AR WT y capaz de mantener la señalización de AR y la expresión de DHFR y TK1 en condiciones de tratamiento con MDV3100 (Fig. 6D), también mostraron una fuerte sensibilidad a la inhibición de CDK4/6 (Fig. 6E). Estos datos sugieren de manera acumulativa que

actuar sobre la función de CDK4/6 puede servir como una estrategia eficaz para el tratamiento de múltiples mecanismos de resistencia a MDV3100 y la probable independencia de andrógenos en general.

A menos que se definan de otro modo, los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que el que entiende generalmente un especialista familiarizado con el campo al que pertenece la divulgación.

- 5 A menos que se indique de otro modo, todos los métodos, pasos, técnicas y manipulaciones que no se describen específicamente en detalle se pueden llevar a cabo y se han llevado a cabo de una manera conocida de por sí, como quedará claro para el experto. Se hace referencia de nuevo, por ejemplo, a los manuales estándar y a la técnica anterior general mencionados en la presente, y a las referencias adicionales citadas en ellos.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> NOVARTIS AG

<120> MUTACIÓN NOVEDOSA DEL RECEPTOR DE ANDRÓGENOS

<130> PAT055531-WO-PCT

<140> PCT/US2014/017977

<141> 24-02-2014

<150> 61/878,669

<151> 2013-09-17

<150> 61/768,860

<151> 2013-02-25

<160> 70

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 920

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 798 899 T3

Leu Pro Gln Gln Leu Pro Ala Pro Pro Asp Glu Asp Asp Ser Ala Ala
 145 150 155 160
 Pro Ser Thr Leu Ser Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro Gly Leu Ser Ser
 165 170 175
 Cys Ser Ala Asp Leu Lys Asp Ile Leu Ser Glu Ala Ser Thr Met Gln
 180 185 190
 Leu Leu Gln Gln Gln Gln Gln Glu Ala Val Ser Glu Gly Ser Ser Ser
 195 200 205
 Gly Arg Ala Arg Glu Ala Ser Gly Ala Pro Thr Ser Ser Lys Asp Asn
 210 215 220
 Tyr Leu Gly Gly Thr Ser Thr Ile Ser Asp Asn Ala Lys Glu Leu Cys
 225 230 235 240
 Lys Ala Val Ser Val Ser Met Gly Leu Gly Val Glu Ala Leu Glu His
 245 250 255
 Leu Ser Pro Gly Glu Gln Leu Arg Gly Asp Cys Met Tyr Ala Pro Leu
 260 265 270
 Leu Gly Val Pro Pro Ala Val Arg Pro Thr Pro Cys Ala Pro Leu Ala
 275 280 285
 Glu Cys Lys Gly Ser Leu Leu Asp Asp Ser Ala Gly Lys Ser Thr Glu
 290 295 300
 Asp Thr Ala Glu Tyr Ser Pro Phe Lys Gly Gly Tyr Thr Lys Gly Leu
 305 310 315 320
 Glu Gly Glu Ser Leu Gly Cys Ser Gly Ser Ala Ala Ala Gly Ser Ser
 325 330 335
 Gly Thr Leu Glu Leu Pro Ser Thr Leu Ser Leu Tyr Lys Ser Gly Ala
 340 345 350
 Leu Asp Glu Ala Ala Ala Tyr Gln Ser Arg Asp Tyr Tyr Asn Phe Pro
 355 360 365
 Leu Ala Leu Ala Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Pro His
 370 375 380
 Ala Arg Ile Lys Leu Glu Asn Pro Leu Asp Tyr Gly Ser Ala Trp Ala
 385 390 395 400

ES 2 798 899 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 798 899 T3

Thr	Gln	Lys	Leu	Thr	Val	Ser	His	Ile	Glu	Gly	Tyr	Glu	Cys	Gln	Pro	
			660					665					670			
Ile	Phe	Leu	Asn	Val	Leu	Glu	Ala	Ile	Glu	Pro	Gly	Val	Val	Cys	Ala	
		675					680					685				
Gly	His	Asp	Asn	Asn	Gln	Pro	Asp	Ser	Phe	Ala	Ala	Leu	Leu	Ser	Ser	
		690				695					700					
Leu	Asn	Glu	Leu	Gly	Glu	Arg	Gln	Leu	Val	His	Val	Val	Lys	Trp	Ala	
705					710					715					720	
Lys	Ala	Leu	Pro	Gly	Phe	Arg	Asn	Leu	His	Val	Asp	Asp	Gln	Met	Ala	
				725					730					735		
Val	Ile	Gln	Tyr	Ser	Trp	Met	Gly	Leu	Met	Val	Phe	Ala	Met	Gly	Trp	
			740					745					750			
Arg	Ser	Phe	Thr	Asn	Val	Asn	Ser	Arg	Met	Leu	Tyr	Phe	Ala	Pro	Asp	
		755					760					765				
Leu	Val	Phe	Asn	Glu	Tyr	Arg	Met	His	Lys	Ser	Arg	Met	Tyr	Ser	Gln	
		770				775					780					
Cys	Val	Arg	Met	Arg	His	Leu	Ser	Gln	Glu	Phe	Gly	Trp	Leu	Gln	Ile	
785					790					795					800	
Thr	Pro	Gln	Glu	Phe	Leu	Cys	Met	Lys	Ala	Leu	Leu	Leu	Phe	Ser	Ile	
				805					810					815		
Ile	Pro	Val	Asp	Gly	Leu	Lys	Asn	Gln	Lys	Phe	Phe	Asp	Glu	Leu	Arg	
			820					825					830			
Met	Asn	Tyr	Ile	Lys	Glu	Leu	Asp	Arg	Ile	Ile	Ala	Cys	Lys	Arg	Lys	
		835					840					845				
Asn	Pro	Thr	Ser	Cys	Ser	Arg	Arg	Phe	Tyr	Gln	Leu	Thr	Lys	Leu	Leu	
		850				855					860					
Asp	Ser	Val	Gln	Pro	Ile	Ala	Arg	Glu	Leu	His	Gln	Phe	Thr	Phe	Asp	
865					870					875					880	
Leu	Leu	Ile	Lys	Ser	His	Met	Val	Ser	Val	Asp	Phe	Pro	Glu	Met	Met	
				885					890					895		
Ala	Glu	Ile	Ile	Ser	Val	Gln	Val	Pro	Lys	Ile	Leu	Ser	Gly	Lys	Val	
			900					905					910			
Lys	Pro	Ile	Tyr	Phe	His	Thr	Gln									
		915					920									

$\langle 210 \rangle$	2
$\langle 211 \rangle$	2763

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

atggaagtgc agttagggct ggggaagggtc taccctcggc cgccgtccaa gacctaccga	60
ggagctttcc agaatctgtt ccagagcgtg cgcgaagtga tccagaacctc gggccccagg	120
caccagagg ccgcgagcgc agcacctccc ggcgccagtt tgctgctgct gcagcagcag	180
cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcaa	240
gagactagcc ccaggcagca gcagcagcag cagggtgagg atggttctcc ccaagcccat	300
cgtagaggcc ccacaggcta cctggtcctg gatgaggaac agcaaccttc acagccgcag	360
tcggccctgg agtgccacct cgagagaggt tgcgtcccag agcctggagc cgccgtggcc	420
gccagcaagg ggctgccgca gcagctgcca gcacctccgg acgaggatga ctcagctgcc	480
ccatccacgt tgtccctgct gggccccact ttccccggct taagcagctg ctccgctgac	540
cttaaagaca tcctgagcga ggccagcacc atgcaactcc ttcagcaaca gcagcaggaa	600
gcagtatccg aaggcagcag cagcgggaga gcgagggagg cctcgggggc tcccacttcc	660
tccaaggaca attacttagg gggcacttcg accatttctg acaacgcaa ggagttgtgt	720
aaggcagtgt cgggtgtccat gggcctgggt gtggaggcgt tggagcatct gagtccaggg	780
gaacagcttc ggggggattg catgtacgcc ccacttttgg gagttccacc cgctgtgcgt	840
cccactcctt gtgccccatt ggccgaatgc aaaggttctc tgctagacga cagcgcaggc	900
aagagcactg aagatactgc tgagtattcc cttttcaagg gaggttacac caaagggcta	960
gaaggcgaga gcctaggctg ctctggcagc gctgcagcag ggagctccgg gacacttgaa	1020
ctgccgtcta ccctgtctct ctacaagtcc ggagcactgg acgaggcagc tgcgtaccag	1080
agtcgcgact actacaactt tccactggct ctggccggac cgccgcccc tccgccgcct	1140
ccccatcccc acgctcgcat caagctggag aaccgcgtgg actacggcag cgcctgggcg	1200
gctgcggcgg cgcagtgccg ctatggggac ctggcgagcc tgcatggcgc ggggtgcagcg	1260
ggacccggtt ctgggtcacc ctcagccgcc gcttctcat cctggcacac tctcttcaca	1320
gccgaagaag gccagttgta tggaccgtgt ggtggtggtg ggggtggtgg cggcggcggc	1380
ggcggcggcg gcggcggcgg cggcggcggc ggcggcggcg aggcgggagc tgtagcccc	1440
tacggctaca ctgggcccc tcaggggctg gcgggccagg aaagcgactt caccgcacct	1500

ES 2 798 899 T3

```

gatgtgtggt accctggcgg catggtgagc agagtgccct atcccagtc cacttgtgtc 1560
aaaagcgaaa tgggcccctg gatggatagc tactccggac cttacgggga catgcgtttg 1620
gagactgccca gggaccatgt tttgcccatt gactattact ttccacccca gaagacctgc 1680
ctgatctgtg gagatgaagc ttctgggtgt cactatggag ctctcacatg tggaaagtgc 1740
aaggtcttct tcaaaagagc cgctgaaggg aaacagaagt acctgtgcgc cagcagaaat 1800
gattgcacta ttgataaatt ccgaaggaaa aattgtccat cttgtcgtct tcggaaatgt 1860
tatgaagcag ggatgactct gggagcccgg aagctgaaga aacttggtta tctgaaacta 1920
caggaggaag gagaggcttc cagcaccacc agcccactg aggagacaac ccagaagctg 1980
acagtgtcac acattgaagg ctatgaatgt cagcccactct ttctgaatgt cctggaagcc 2040
attgagccag gtgtagtgtg tgctggacac gacaacaacc agcccactc ctttgacgcc 2100
ttgctctcta gcctcaatga actgggagag agacagcttg tacacgtggt caagtgggcc 2160
aaggccttgc ctggcttccg caacttacac gtggacgacc agatggctgt cattcagtac 2220
tcctggatgg ggctcatggt gtttgccatg ggctggcgat ccttcaccaa tgtcaactcc 2280
aggatgctct acttcgcccc tgatctggtt ttcaatgagt accgcatgca caagtcccgg 2340
atgtacagcc agtgtgtccg aatgaggcac ctctctcaag agtttgatg gctccaaatc 2400
accccccagg aattcctgtg catgaaagca ctgctactct tcagcattat tccagtggat 2460
gggctgaaaa atcaaaaatt ctttgatgaa cttcgaatga actacatcaa ggaactcgat 2520
cgtatcattg catgcaaaaag aaaaaatccc acatcctgct caagacgctt ctaccagctc 2580
accaagctcc tggactccgt gcagcctatt gcgagagagc tgcacagtt cacttttgac 2640
ctgctaataca agtcacacat ggtgagcgtg gactttccgg aaatgatggc agagatcatc 2700
tctgtgcaag tgcccaagat cctttctggg aaagtcaagc ccatctatct ccacaccag 2760
tga 2763

```

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Cualquier aminoácido excepto Phe

<400> 3

Pro Ile Ala Arg Glu Leu His Gln Xaa Thr

1

5

10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Cualquier aminoácido excepto Phe

<400> 4
 Ile Ala Arg Glu Leu His Gln Xaa Thr Phe
 1 5 10

<210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Cualquier aminoácido excepto Phe

<400> 5
 Ala Arg Glu Leu His Gln Xaa Thr Phe Asp
 1 5 10

<210> 6
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(6)
 <223> Cualquier aminoácido excepto Phe

<400> 6
 Arg Glu Leu His Gln Xaa Thr Phe Asp Leu
 1 5 10

<210> 7
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

```

<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Cualquier aminoácido excepto Phe

<400> 7
Glu Leu His Gln Xaa Thr Phe Asp Leu Leu
1          5          10

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Cualquier aminoácido excepto Phe

<400> 8
Leu His Gln Xaa Thr Phe Asp Leu Leu Ile
1          5          10

<210> 9
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Cualquier aminoácido excepto Phe

<400> 9
His Gln Xaa Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys
      1          5          10

<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

```

```

<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Cualquier aminoácido excepto Phe

<400> 10
Gln Xaa Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys Ser
1          5          10

<210> 11
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Cualquier aminoácido excepto Phe

<400> 11
Gln Xaa Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys Ser His
1          5          10

<210> 12

<400> 12
000

<210> 13

<400> 13
000

<210> 14

<400> 14
000

<210> 15

<400> 15
000

<210> 16

<400> 16
000

<210> 17

<400> 17
000

<210> 18

```

<400> 18
000

<210> 19

<400> 19
000

<210> 20
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Cualquier aminoácido excepto Phe o ausente

<400> 20
Glu Leu His Gln Xaa Thr Phe Asp Leu Leu
1 5 10

<210> 21
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Cualquier aminoácido excepto Phe o ausente

<400> 21
Leu His Gln Xaa Thr Phe
1 5

<210> 22
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (3)..(3)
<223> Cualquier aminoácido excepto Phe o ausente

```

<400> 22
His Gln Xaa Thr Phe Asp
1           5

<210> 23
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (2)..(2)
<223> Cualquier aminoácido excepto Phe o ausente

<400> 23
Gln Xaa Thr Phe Asp
1           5

<210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 24
Glu Leu His Gln Thr
      1           5

<210> 25
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 25
Leu His Gln Thr Phe
1           5

<210> 26
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 26

```

His Gln Thr Phe Asp
1 5

<210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 27
Gln Thr Phe Asp Leu
1 5

<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 28
Gln Pro Ile Ala Arg Glu Leu His Gln Thr
1 5 10

<210> 29
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 29
Pro Ile Ala Arg Glu Leu His Gln Thr Phe
1 5 10

<210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 30
Ile Ala Arg Glu Leu His Gln Thr Phe Asp
1 5 10

<210> 31
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 31
 Ala Arg Glu Leu His Gln Thr Phe Asp Leu
 1 5 10

<210> 32
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 32
 Arg Glu Leu His Gln Thr Phe Asp Leu Leu
 1 5 10

<210> 33
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 33
 Glu Leu His Gln Thr Phe Asp Leu Leu Ile
 1 5 10

<210> 34
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 34
 Leu His Gln Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys
 1 5 10

<210> 35
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 35

His Gln Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys Ser
1 5 10

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 36

Gln Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys Ser His
1 5 10

<210> 37

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (10)..(11)

<223> Cualquier aminoácido

<220>

<221> fuente

<223> /nota = «véase la memoria descriptiva tal como se ha presentado para consultar una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas»

<400> 37

Gln Pro Ile Ala Arg Glu Leu His Gln Xaa Xaa
1 5 10

<210> 38

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (9)..(10)

<223> Cualquier aminoácido

<220>

<221> fuente

<223> /nota = «véase la memoria descriptiva tal como se ha presentado para consultar una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas»

<400> 38
Pro Ile Ala Arg Glu Leu His Gln Xaa Xaa Phe
1 5 10

<210> 39
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(9)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> fuente
<223> /nota = «véase la memoria descriptiva tal como se ha presentado para consultar una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas»

<400> 39
Ile Ala Arg Glu Leu His Gln Xaa Xaa Phe Asp
1 5 10

<210> 40
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(8)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> fuente
<223> /nota = «véase la memoria descriptiva tal como se ha presentado para consultar una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas»

<400> 40
Ala Arg Glu Leu His Gln Xaa Xaa Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 41
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(7)
 <223> Cualquier aminoácido

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = «véase la memoria descriptiva tal como se ha presentado para consultar una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas»

<400> 41
 Arg Glu Leu His Gln Xaa Xaa Phe Asp Leu Leu
 1 5 10

<210> 42
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(6)
 <223> Cualquier aminoácido

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = «véase la memoria descriptiva tal como se ha presentado para consultar una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas»

<400> 42
 Glu Leu His Gln Xaa Xaa Phe Asp Leu Leu Ile
 1 5 10

<210> 43
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(5)
 <223> Cualquier aminoácido

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = «véase la memoria descriptiva tal como se ha presentado para consultar una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas»

<400> 43

Leu His Gln Xaa Xaa Phe Asp Leu Leu Ile Lys
1 5 10

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (3)..(4)

<223> Cualquier aminoácido

<220>

<221> fuente

<223> /nota = «véase la memoria descriptiva tal como se ha presentado para consultar una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas»

<400> 44

His Gln Xaa Xaa Phe Asp Leu Leu Ile Lys Ser
1 5 10

<210> 45

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>

<221> MOD_RES

<222> (2)..(3)

<223> Cualquier aminoácido

<220>

<221> fuente

<223> /nota = «véase la memoria descriptiva tal como se ha presentado para consultar una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas»

<400> 45

Gln Xaa Xaa Phe Asp Leu Leu Ile Lys Ser His
1 5 10

<210> 46

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Cualquier aminoácido

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(11)
 <223> Cualquier aminoácido

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = «véase la memoria descriptiva tal como se ha presentado para consultar una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas»

<400> 46
 Gln Pro Ile Ala Arg Glu Leu Xaa Gln Xaa Xaa
 1 5 10

<210> 47
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Cualquier aminoácido

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (9)..(10)
 <223> Cualquier aminoácido

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = «véase la memoria descriptiva tal como se ha presentado para consultar una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas»

<400> 47
 Pro Ile Ala Arg Glu Leu Xaa Gln Xaa Xaa Phe
 1 5 10

<210> 48
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
 <221> MOD_RES

<222> (6)..(6)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> MOD_RES
<222> (8)..(9)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> fuente
<223> /nota = «véase la memoria descriptiva tal como se ha presentado para consultar una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas»

<400> 48
Ile Ala Arg Glu Leu Xaa Gln Xaa Xaa Phe Asp
1 5 10

<210> 49
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (5)..(5)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> MOD_RES
<222> (7)..(8)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> fuente
<223> /nota = «véase la memoria descriptiva tal como se ha presentado para consultar una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas»

<400> 49
Ala Arg Glu Leu Xaa Gln Xaa Xaa Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 50
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)..(4)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (6)..(7)
 <223> Cualquier aminoácido

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = «véase la memoria descriptiva tal como se ha presentado para consultar una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas»

<400> 50
 Arg Glu Leu Xaa Gln Xaa Xaa Phe Asp Leu Leu
 1 5 10

<210> 51
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Cualquier aminoácido

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(6)
 <223> Cualquier aminoácido

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = «véase la memoria descriptiva tal como se ha presentado para consultar una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas»

<400> 51
 Glu Leu Xaa Gln Xaa Xaa Phe Asp Leu Leu Ile
 1 5 10

<210> 52
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Cualquier aminoácido

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (4)..(5)
 <223> Cualquier aminoácido

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = «véase la memoria descriptiva tal como se ha presentado para consultar una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas»

<400> 52
 Leu Xaa Gln Xaa Xaa Phe Asp Leu Leu Ile Lys
 1 5 10

<210> 53
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Cualquier aminoácido

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(4)
 <223> Cualquier aminoácido

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota = «véase la memoria descriptiva tal como se ha presentado para consultar una descripción detallada de sustituciones y realizaciones preferidas»

<400> 53
 Xaa Gln Xaa Xaa Phe Asp Leu Leu Ile Lys Ser
 1 5 10

<210> 54
 <211> 920
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético"

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (877)..(877)
 <223> Cualquier aminoácido excepto Phe o ausente

<400> 54

ES 2 798 899 T3

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

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

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

ES 2 798 899 T3

Pro Pro Gly Ala Ser Leu Leu Leu Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln
 50 55 60
 Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
 65 70 75 80
 Glu Thr Ser Pro Arg Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly Glu Asp Gly Ser
 85 90 95
 Pro Gln Ala His Arg Arg Gly Pro Thr Gly Tyr Leu Val Leu Asp Glu
 100 105 110
 Glu Gln Gln Pro Ser Gln Pro Gln Ser Ala Leu Glu Cys His Pro Glu
 115 120 125
 Arg Gly Cys Val Pro Glu Pro Gly Ala Ala Val Ala Ala Ser Lys Gly
 130 135 140
 Leu Pro Gln Gln Leu Pro Ala Pro Pro Asp Glu Asp Asp Ser Ala Ala
 145 150 155 160
 Pro Ser Thr Leu Ser Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro Gly Leu Ser Ser
 165 170 175
 Cys Ser Ala Asp Leu Lys Asp Ile Leu Ser Glu Ala Ser Thr Met Gln
 180 185 190
 Leu Leu Gln Gln Gln Gln Gln Glu Ala Val Ser Glu Gly Ser Ser Ser
 195 200 205
 Gly Arg Ala Arg Glu Ala Ser Gly Ala Pro Thr Ser Ser Lys Asp Asn
 210 215 220
 Tyr Leu Gly Gly Thr Ser Thr Ile Ser Asp Asn Ala Lys Glu Leu Cys
 225 230 235 240
 Lys Ala Val Ser Val Ser Met Gly Leu Gly Val Glu Ala Leu Glu His
 245 250 255
 Leu Ser Pro Gly Glu Gln Leu Arg Gly Asp Cys Met Tyr Ala Pro Leu
 260 265 270
 Leu Gly Val Pro Pro Ala Val Arg Pro Thr Pro Cys Ala Pro Leu Ala
 275 280 285
 Glu Cys Lys Gly Ser Leu Leu Asp Asp Ser Ala Gly Lys Ser Thr Glu
 290 295 300

ES 2 798 899 T3

Asp Thr Ala Glu Tyr Ser Pro Phe Lys Gly Gly Tyr Thr Lys Gly Leu
 305 310 315 320
 Glu Gly Glu Ser Leu Gly Cys Ser Gly Ser Ala Ala Ala Gly Ser Ser
 325 330 335
 Gly Thr Leu Glu Leu Pro Ser Thr Leu Ser Leu Tyr Lys Ser Gly Ala
 340 345 350
 Leu Asp Glu Ala Ala Ala Tyr Gln Ser Arg Asp Tyr Tyr Asn Phe Pro
 355 360 365
 Leu Ala Leu Ala Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Pro His
 370 375 380
 Ala Arg Ile Lys Leu Glu Asn Pro Leu Asp Tyr Gly Ser Ala Trp Ala
 385 390 395 400
 Ala Ala Ala Ala Gln Cys Arg Tyr Gly Asp Leu Ala Ser Leu His Gly
 405 410 415
 Ala Gly Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Ser Pro Ser Ala Ala Ala Ser
 420 425 430
 Ser Ser Trp His Thr Leu Phe Thr Ala Glu Glu Gly Gln Leu Tyr Gly
 435 440 445
 Pro Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 450 455 460
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Glu Ala Gly Ala Val Ala Pro
 465 470 475 480
 Tyr Gly Tyr Thr Arg Pro Pro Gln Gly Leu Ala Gly Gln Glu Ser Asp
 485 490 495
 Phe Thr Ala Pro Asp Val Trp Tyr Pro Gly Gly Met Val Ser Arg Val
 500 505 510
 Pro Tyr Pro Ser Pro Thr Cys Val Lys Ser Glu Met Gly Pro Trp Met
 515 520 525
 Asp Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Gly Asp Met Arg Leu Glu Thr Ala Arg
 530 535 540
 Asp His Val Leu Pro Ile Asp Tyr Tyr Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys

ES 2 798 899 T3

545		550		555		560									
Leu	Ile	Cys	Gly	Asp	Glu	Ala	Ser	Gly	Cys	His	Tyr	Gly	Ala	Leu	Thr
				565					570					575	
Cys	Gly	Ser	Cys	Lys	Val	Phe	Phe	Lys	Arg	Ala	Ala	Glu	Gly	Lys	Gln
			580					585					590		
Lys	Tyr	Leu	Cys	Ala	Ser	Arg	Asn	Asp	Cys	Thr	Ile	Asp	Lys	Phe	Arg
		595					600					605			
Arg	Lys	Asn	Cys	Pro	Ser	Cys	Arg	Leu	Arg	Lys	Cys	Tyr	Glu	Ala	Gly
	610					615					620				
Met	Thr	Leu	Gly	Ala	Arg	Lys	Leu	Lys	Lys	Leu	Gly	Asn	Leu	Lys	Leu
625					630					635					640
Gln	Glu	Glu	Gly	Glu	Ala	Ser	Ser	Thr	Thr	Ser	Pro	Thr	Glu	Glu	Thr
				645					650					655	
Thr	Gln	Lys	Leu	Thr	Val	Ser	His	Ile	Glu	Gly	Tyr	Glu	Cys	Gln	Pro
			660					665					670		
Ile	Phe	Leu	Asn	Val	Leu	Glu	Ala	Ile	Glu	Pro	Gly	Val	Val	Cys	Ala
		675					680					685			
Gly	His	Asp	Asn	Asn	Gln	Pro	Asp	Ser	Phe	Ala	Ala	Leu	Leu	Ser	Ser
	690					695					700				
Leu	Asn	Glu	Leu	Gly	Glu	Arg	Gln	Leu	Val	His	Val	Val	Lys	Trp	Ala
705					710					715					720
Lys	Ala	Leu	Pro	Gly	Phe	Arg	Asn	Leu	His	Val	Asp	Asp	Gln	Met	Ala
				725					730					735	
Val	Ile	Gln	Tyr	Ser	Trp	Met	Gly	Leu	Met	Val	Phe	Ala	Met	Gly	Trp
			740				745						750		
Arg	Ser	Phe	Thr	Asn	Val	Asn	Ser	Arg	Met	Leu	Tyr	Phe	Ala	Pro	Asp
		755					760					765			
Leu	Val	Phe	Asn	Glu	Tyr	Arg	Met	His	Lys	Ser	Arg	Met	Tyr	Ser	Gln
	770					775					780				
Cys	Val	Arg	Met	Arg	His	Leu	Ser	Gln	Glu	Phe	Gly	Trp	Leu	Gln	Ile
785					790					795					800

ES 2 798 899 T3

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

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

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

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

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

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

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

Lys Pro Ile Tyr Phe His Thr Gln
915 920

<210> 55

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético»

<400> 55

attgcgagag agctgcatca

20

<210> 56

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético»

<400> 56

ttctcgtcac tattggcctc

20

<210> 57

<400> 57

000

<210> 58

<211> 35

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético»

<400> 58
 gagagctgca tcagttcgct tttgacctgc taatc 35

<210> 59
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético»

<400> 59
 gattagcagg tcaaaagcga actgatgcag ctctc 35

<210> 60
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético»

<400> 60
 cattcagtac tcctgcatgg ggctcatggt g 31

<210> 61
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético»

<400> 61
 caccatgagc cccatgcagg agtactgaat g 31

<210> 62
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético»

<400> 62
 gtcattcagt actccctgat ggggctcatg g 31

<210> 63
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético»

 <400> 63
 ccatgagccc catcagggag tactgaatga c 31

 <210> 64
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético»

 <400> 64
 gagagctgca tcagctcact tttgacctg 29

 <210> 65
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético»

 <400> 65
 caggtcaaaa gtgagctgat gcagctctc 29

 <210> 66
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético»

 <400> 66
 gagagctgca tcagctcgct tttgacctg 29

 <210> 67
 <211> 29
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <221> fuente
 <223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Cebador sintético»

<400> 67
cagggtcaaaa gcgagctgat gcagctctc 29

<210> 68
<211> 14
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<220>
<221> CDS
<222> (2)..(13)

<400> 68
t cag ttc gct ttt g 14
Gln Phe Ala Phe
1

<210> 69
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético"

<400> 69
Gln Phe Ala Phe
1

<210> 70
<211> 11
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

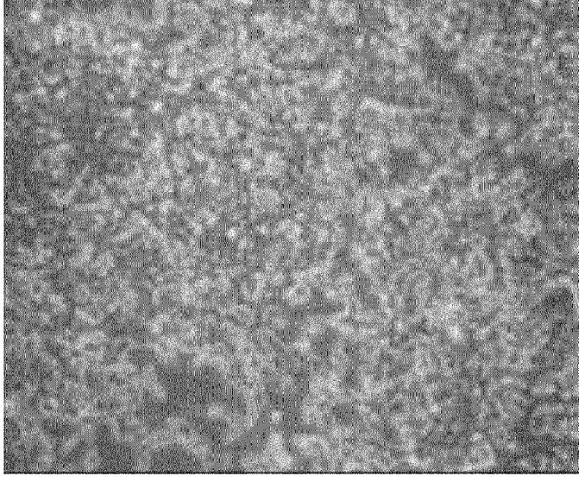
<220>
<221> fuente
<223> /nota=»Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético"

<400> 70
aagcgaactg a 11

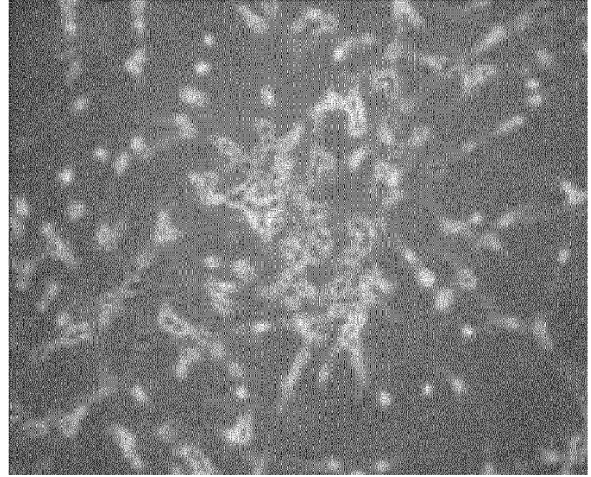
REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición terapéutica para su uso en el tratamiento de un paciente que padece cáncer de próstata o de mama, asociado con una mutación del receptor de andrógenos, donde el aminoácido en la posición 877 del receptor de andrógenos en dicho paciente está ausente o es un aminoácido diferente de fenilalanina, y donde la composición terapéutica comprende el inhibidor de CDK4/6 LEE011 y donde la posición 877 de los aminoácidos está de acuerdo con la numeración de la SEQ ID NO: 1.

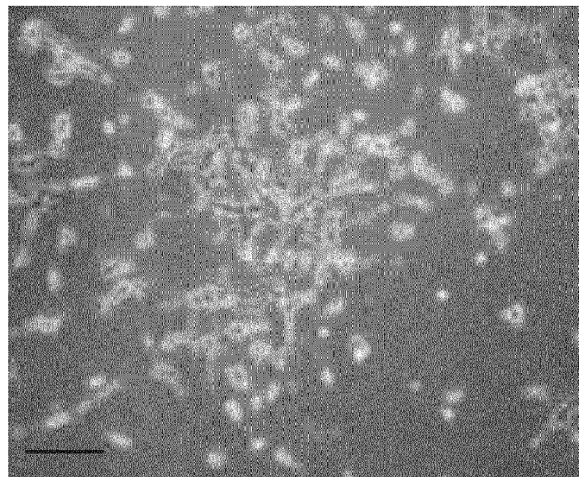
FCS



CSS



FCS+MDV3100



FCS+MDV3100+R1881

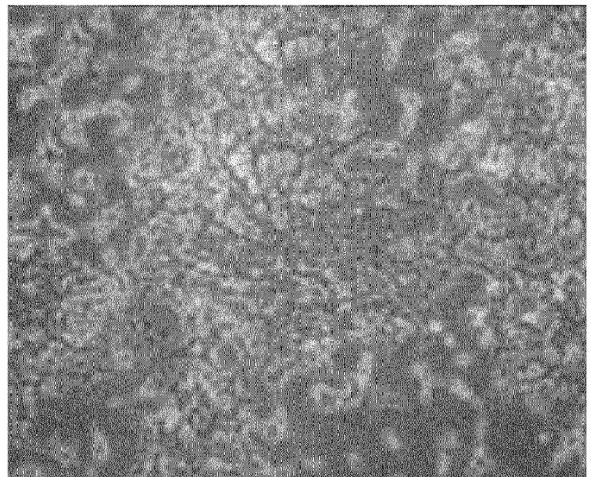


FIG.1A

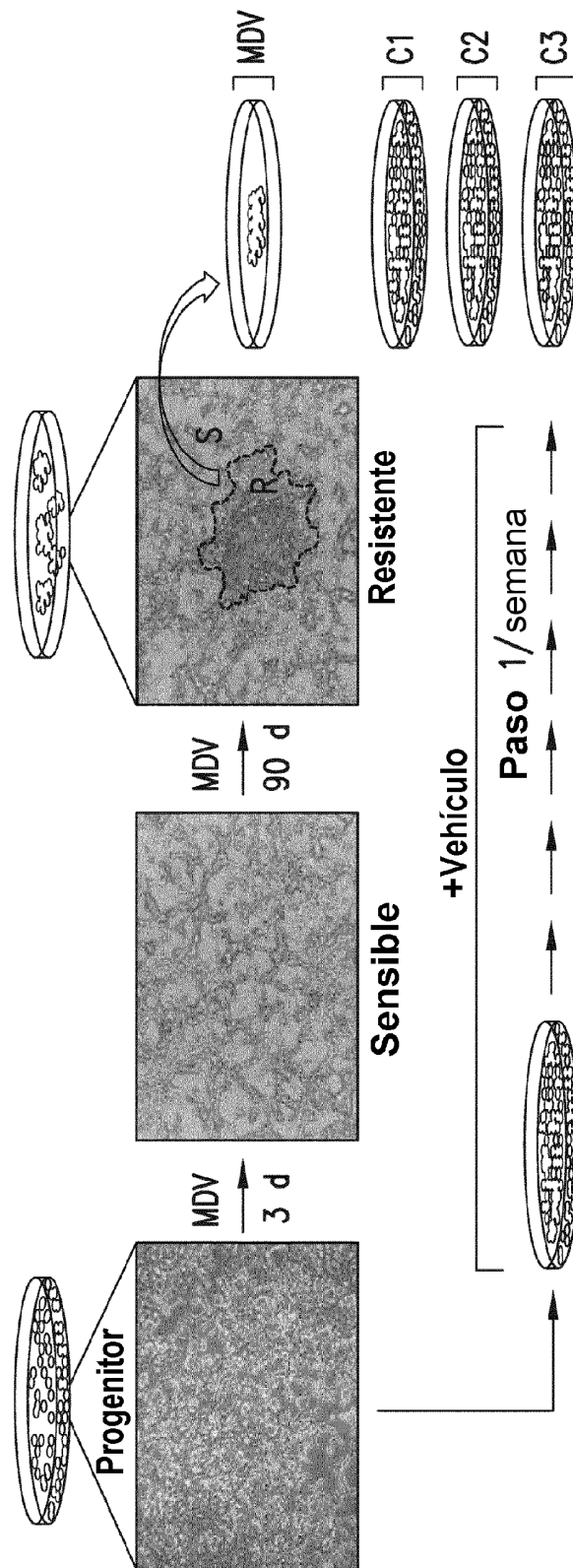


FIG.1B

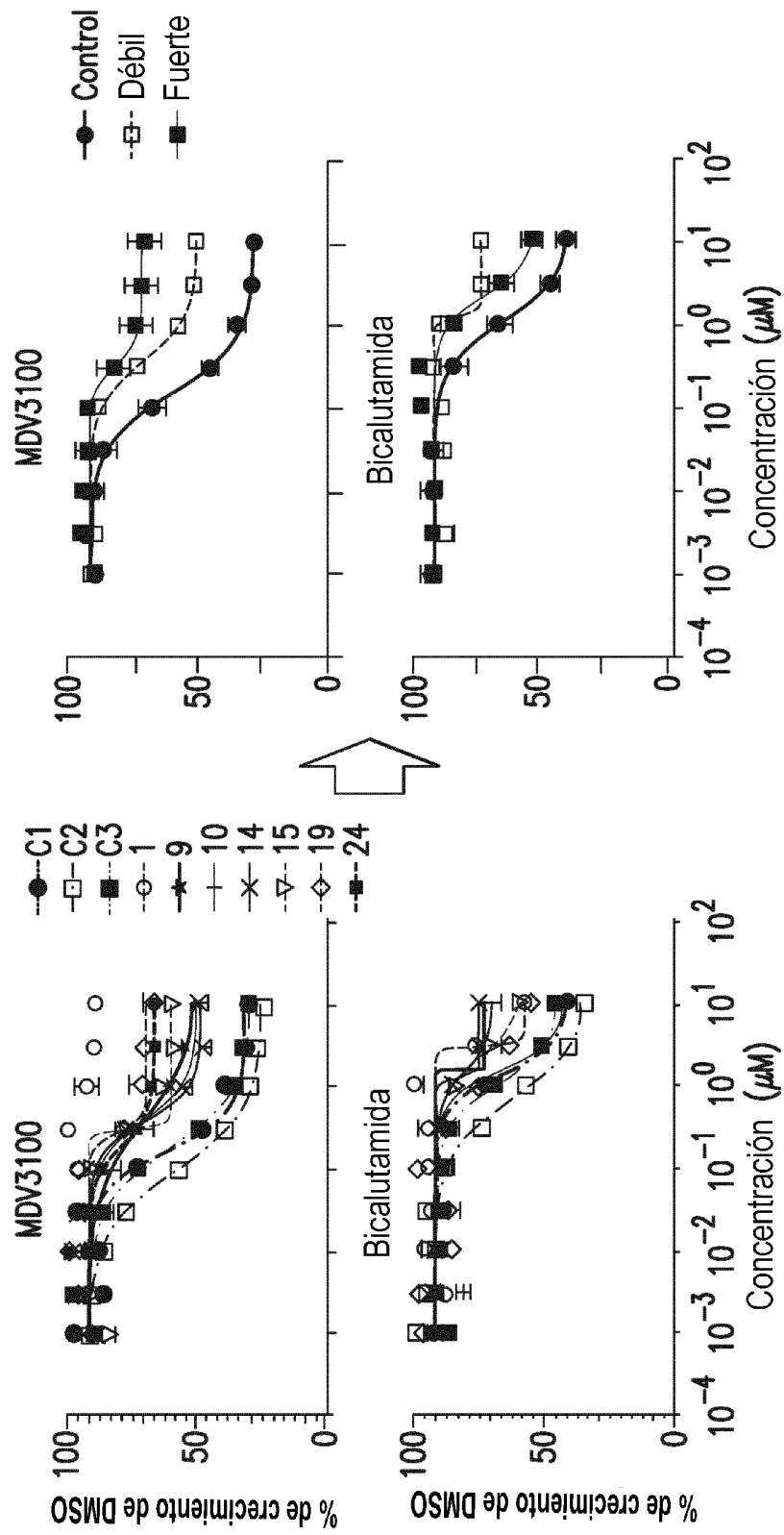


FIG.1C

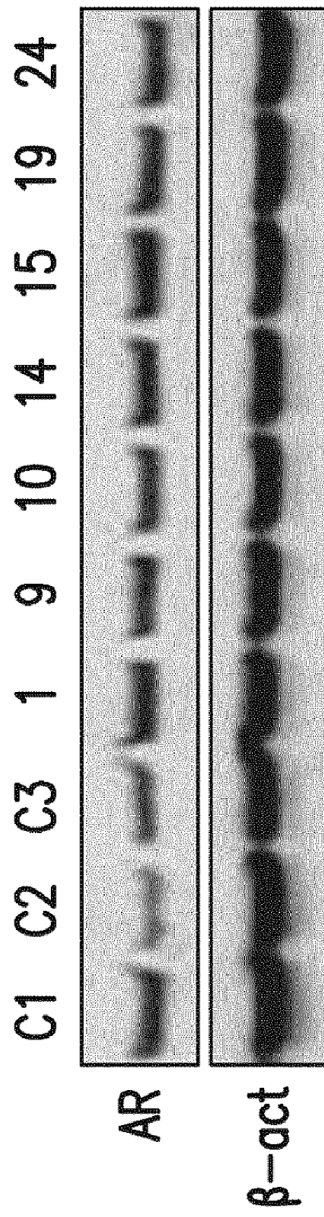


FIG.1D

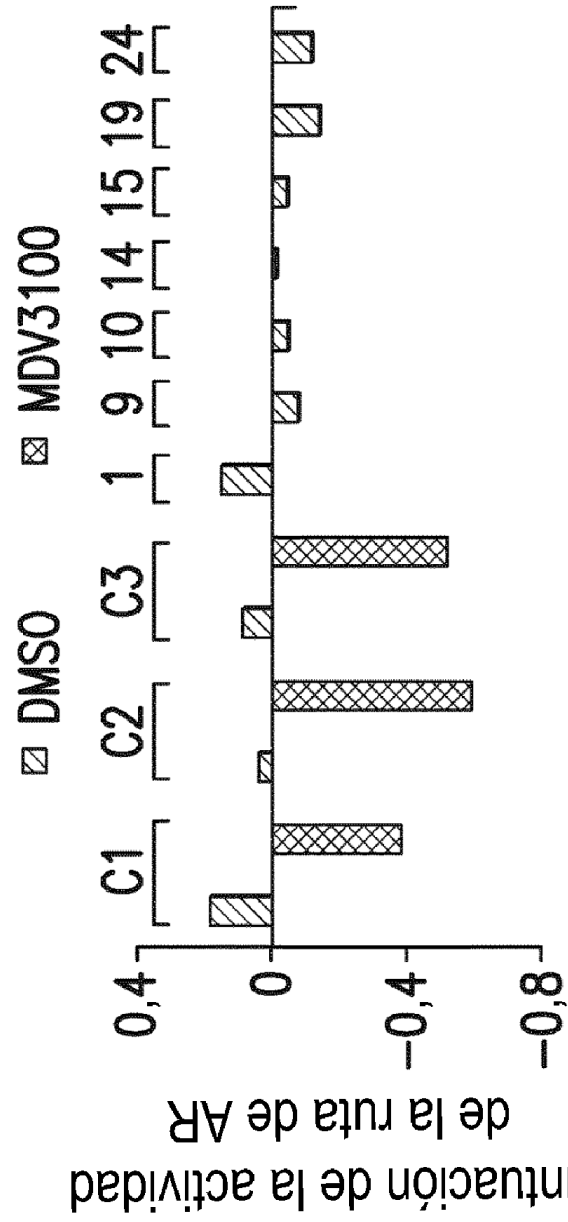


FIG.1E

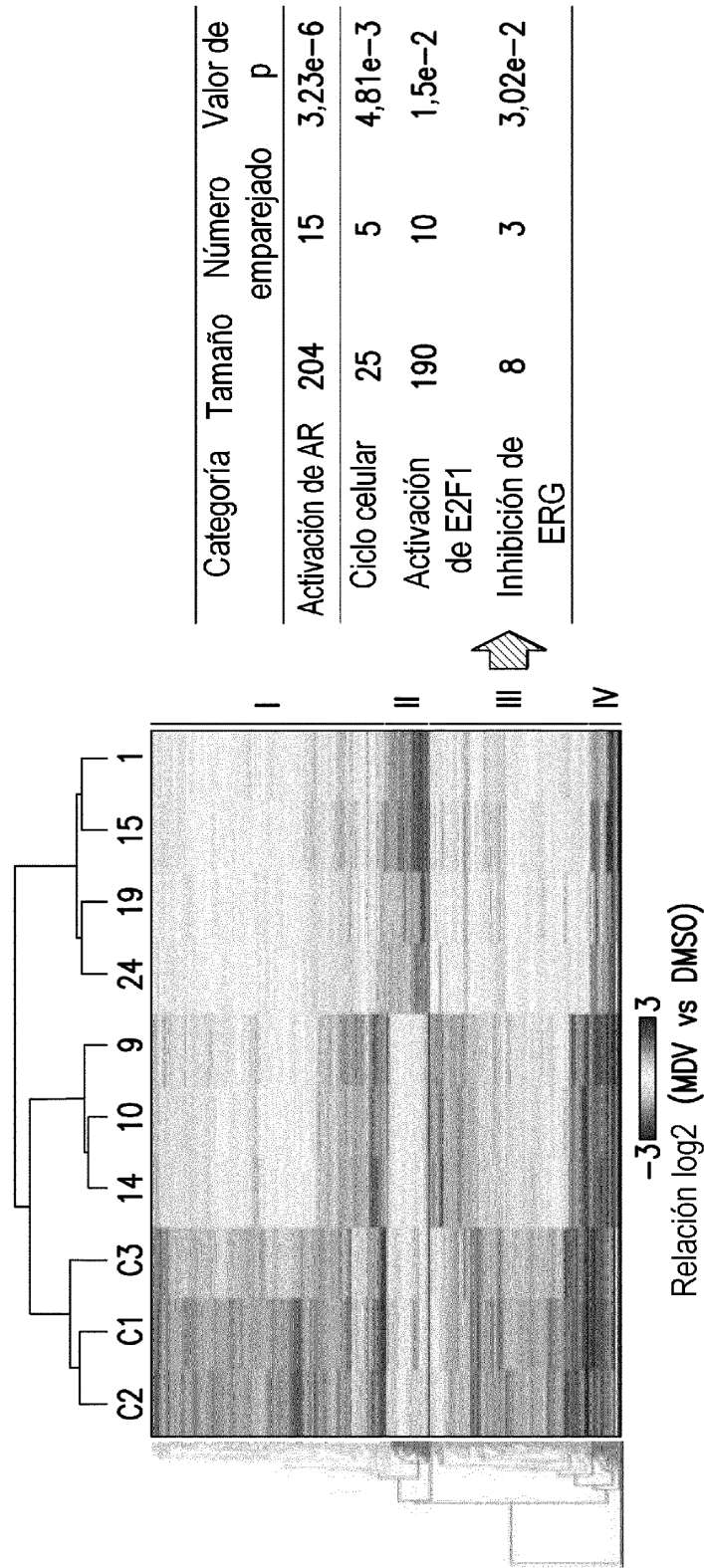


FIG.2A-1

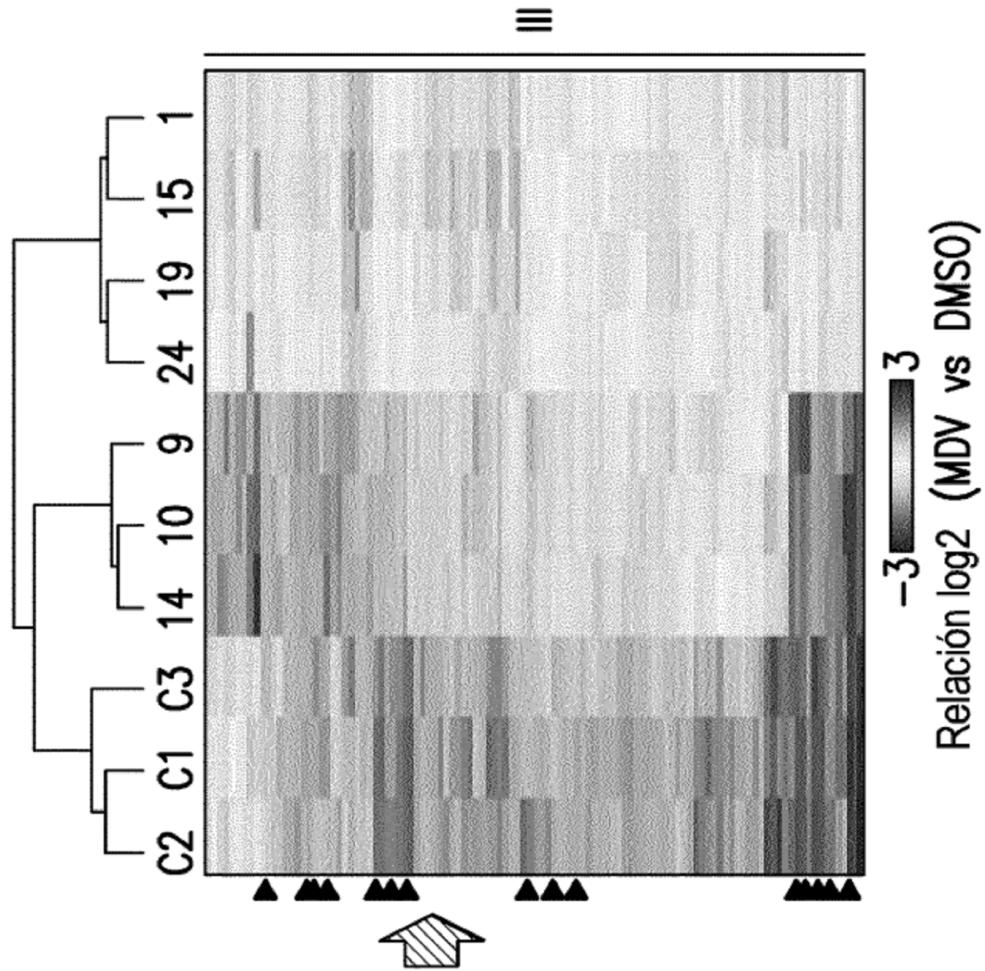
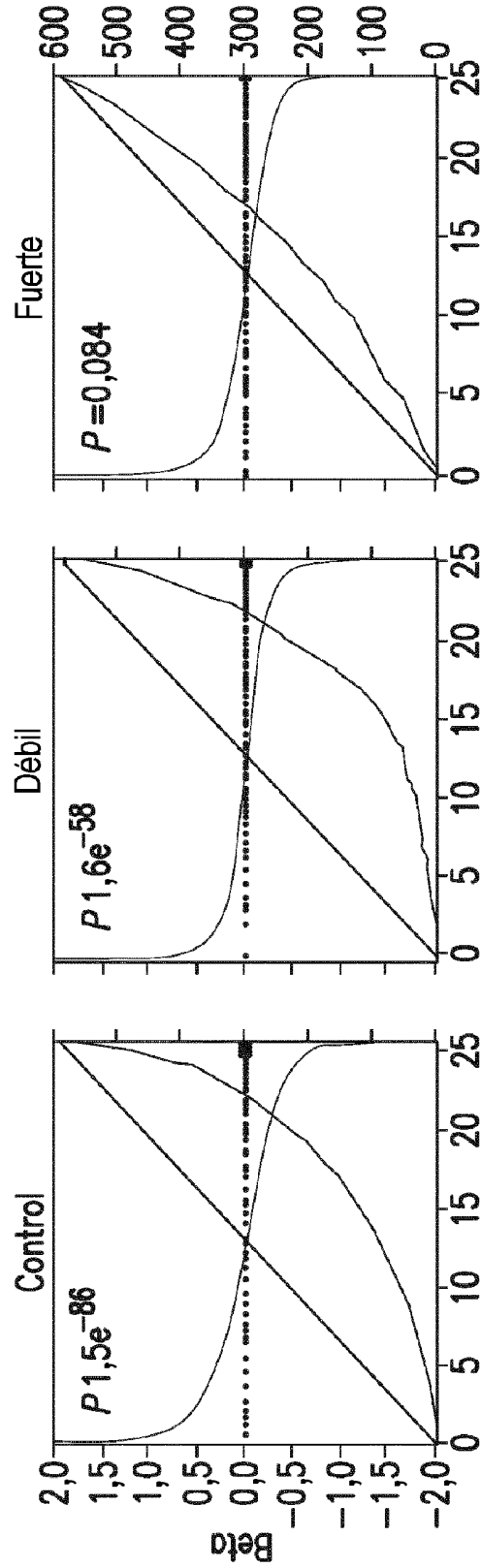


FIG.2A-2

Suma acumulativa de los conjuntos de sondas
que se solapan con la lista de genes



Posición del conjunto de sondas expresadas clasificada por beta promedio

FIG.2B

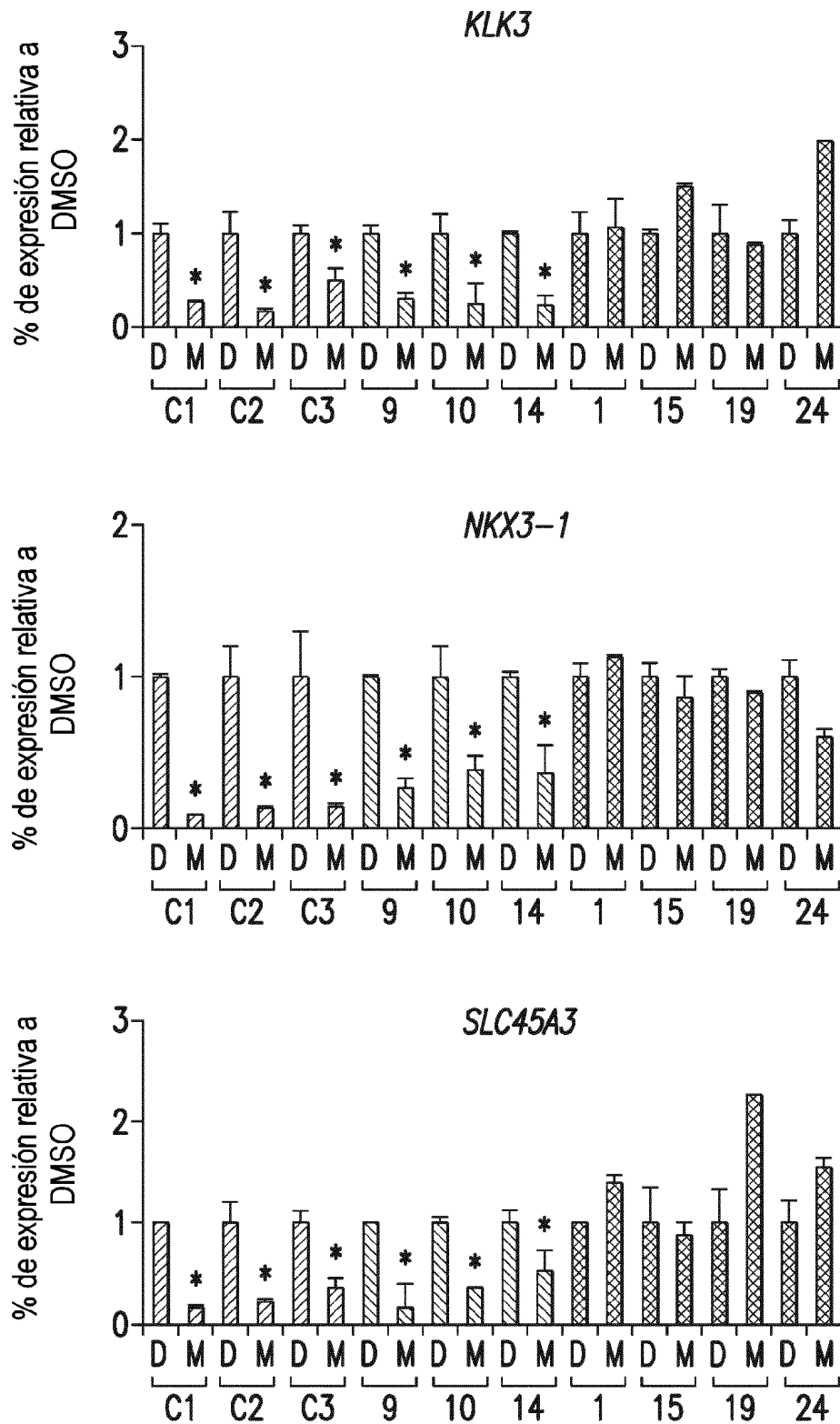


FIG.2C

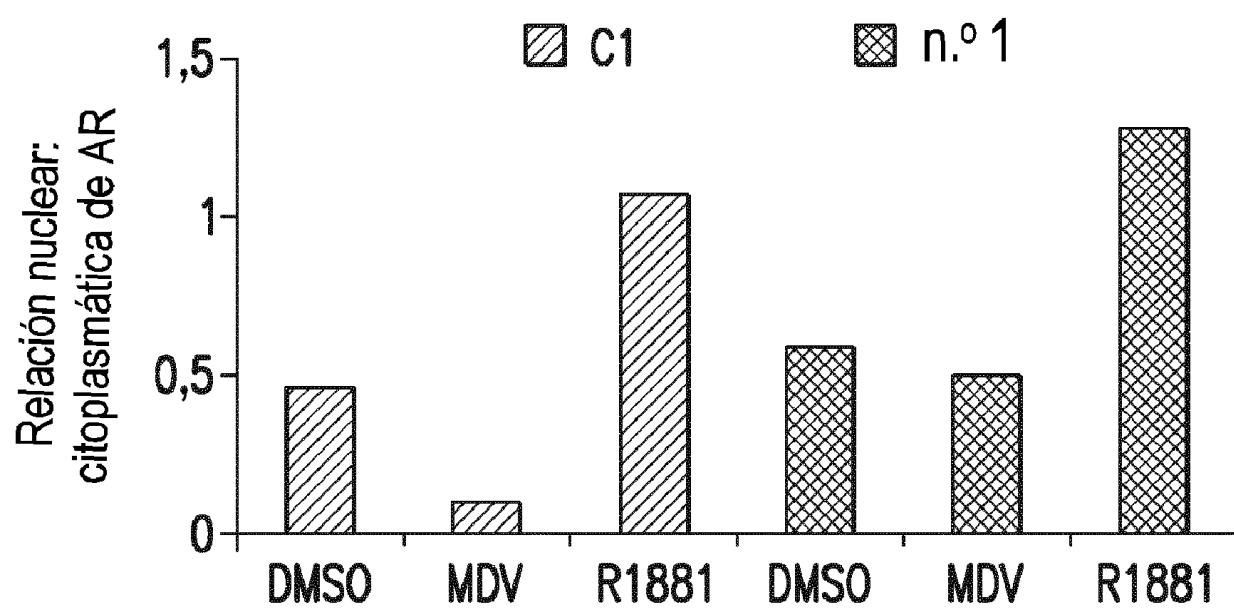


FIG.2D

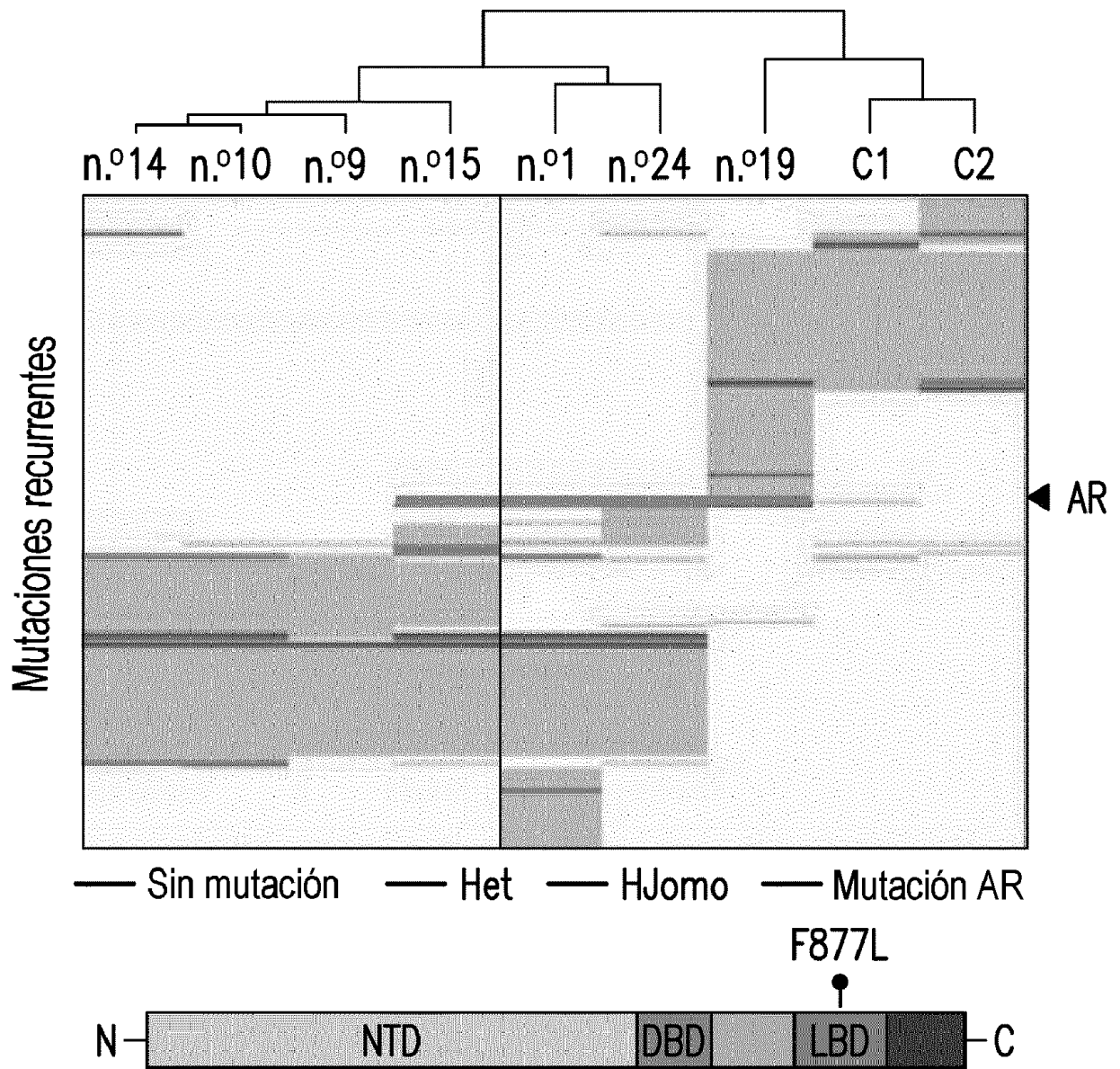


FIG.3A

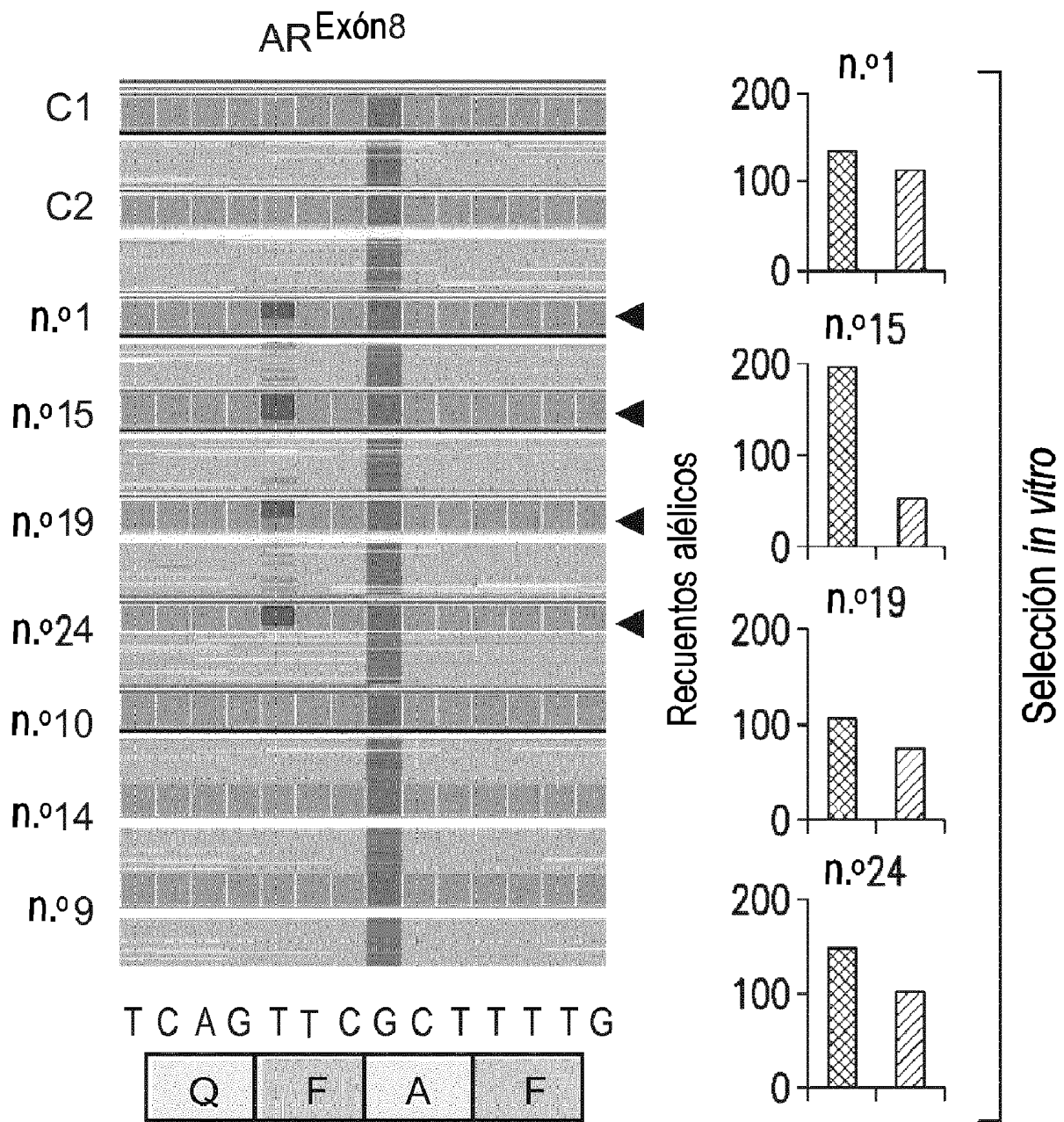


FIG.3B

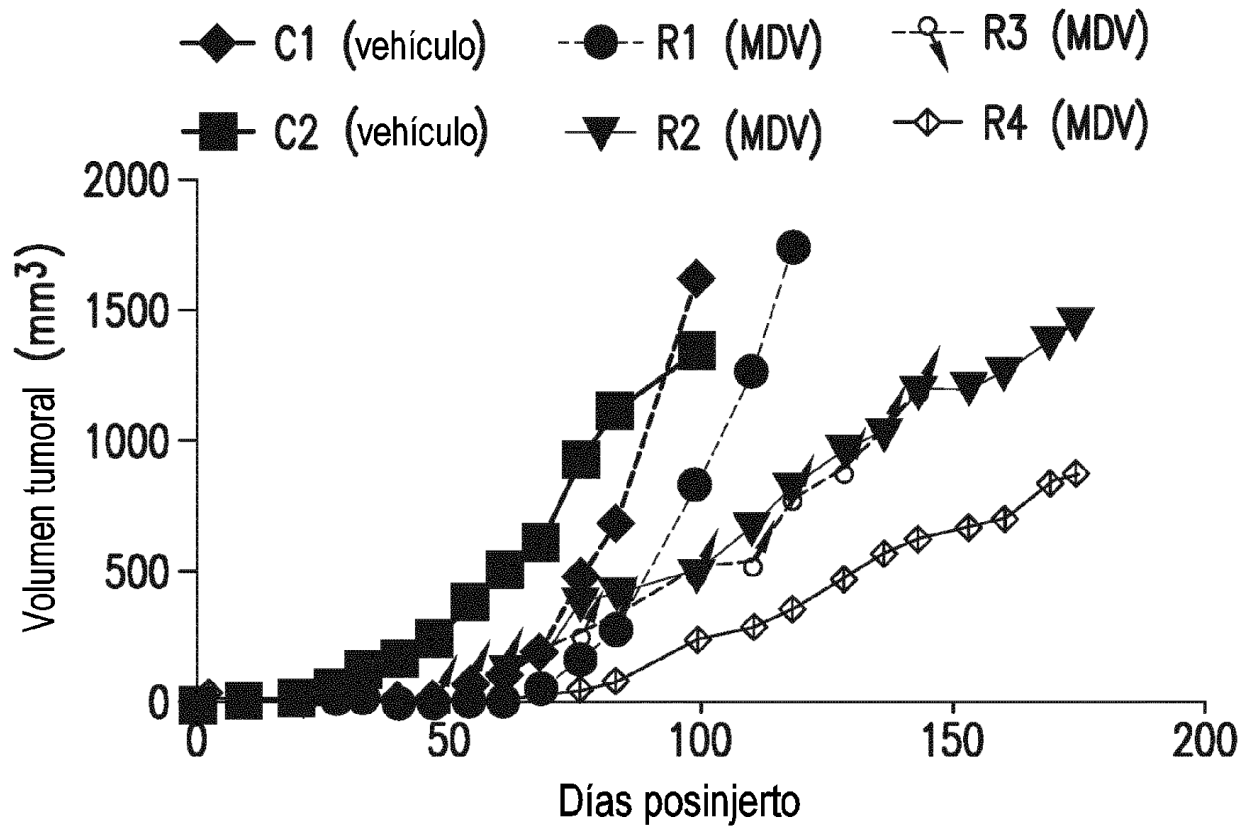


FIG.3C

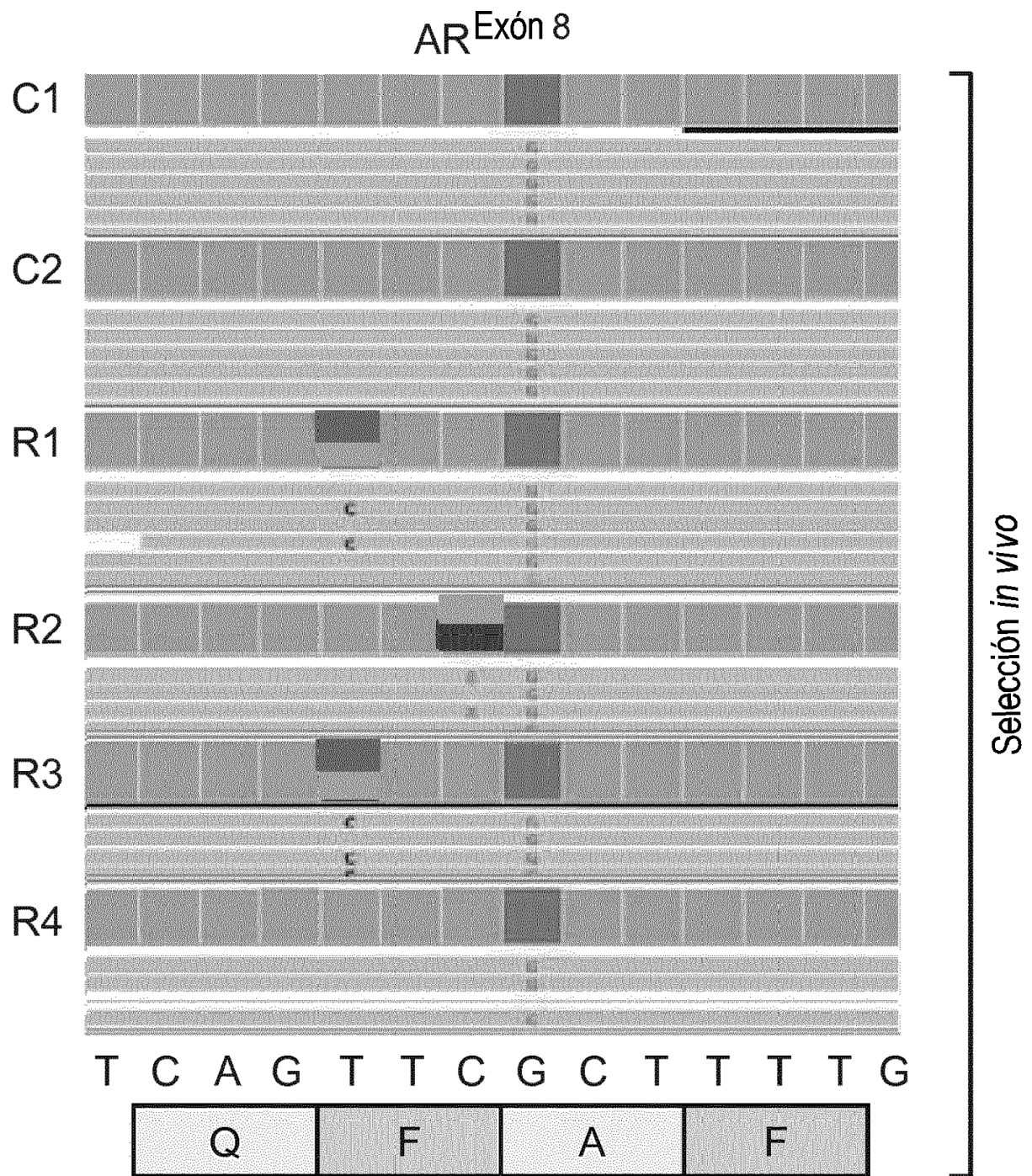


FIG.3D

Tumor	AA	Codón	Frecuencia de F877L
Control 1 (C1)	F	TTC	0
Control 2 (C2)	F	TTC	0
Resistente 1 (R1)	L	CTC	52%
Resistente 1 (R2)	L	TTA	50%
Resistente 1 (R3)	L	CTC	46%
Resistente 4 (R4)	F	TTC	0%

FIG.3E

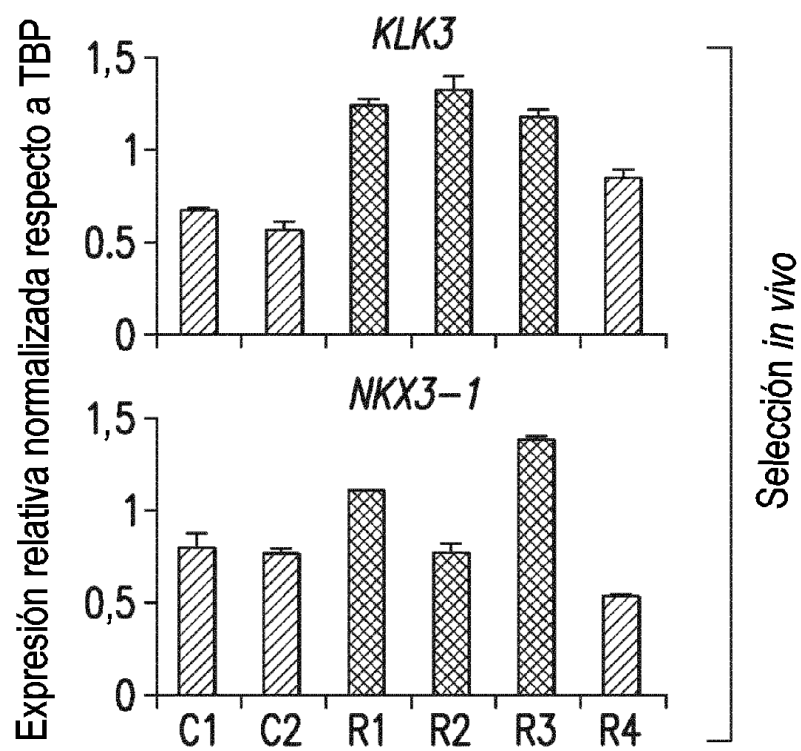


FIG.3F

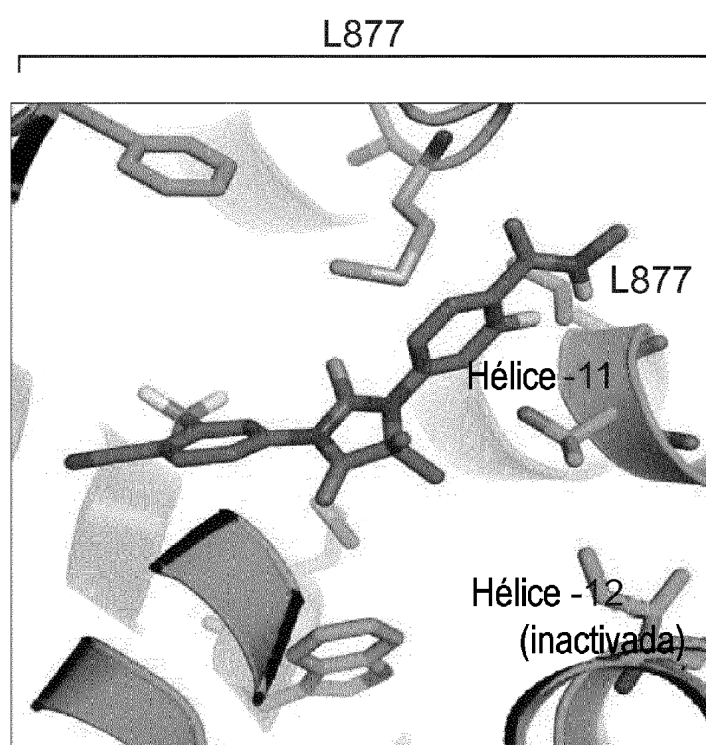
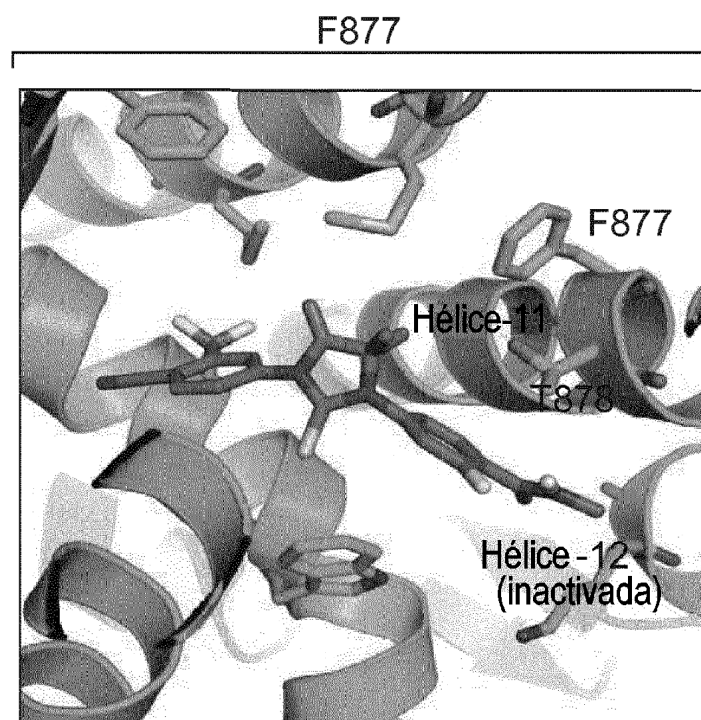


FIG.4A

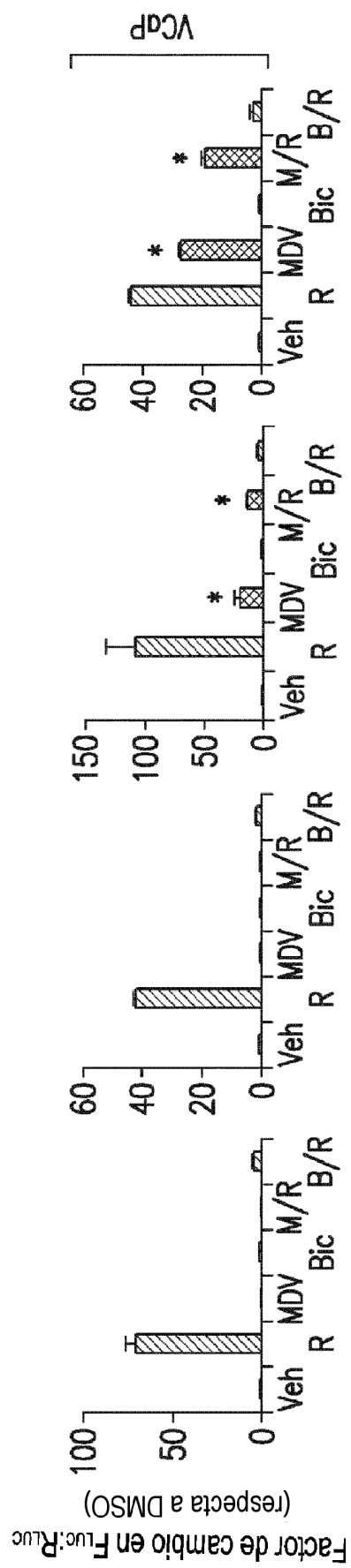


FIG.4B

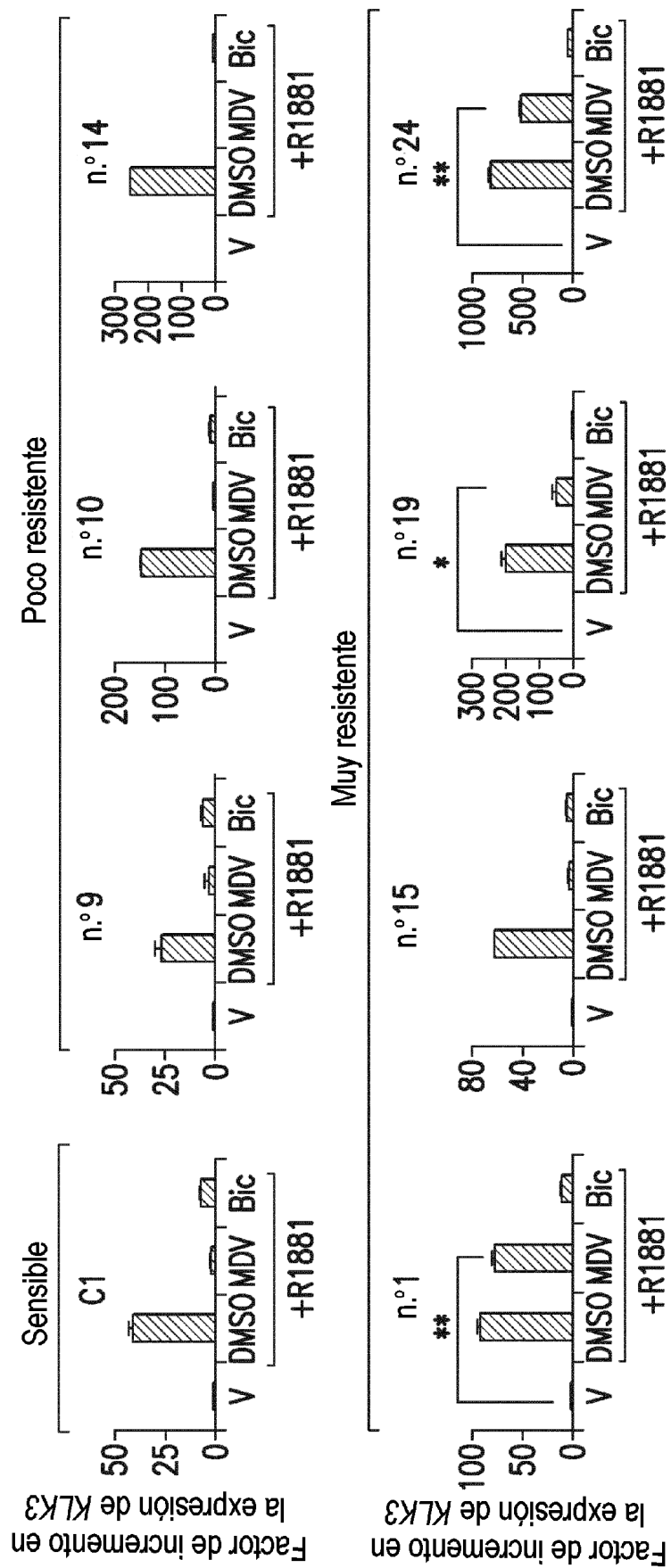


FIG.4C

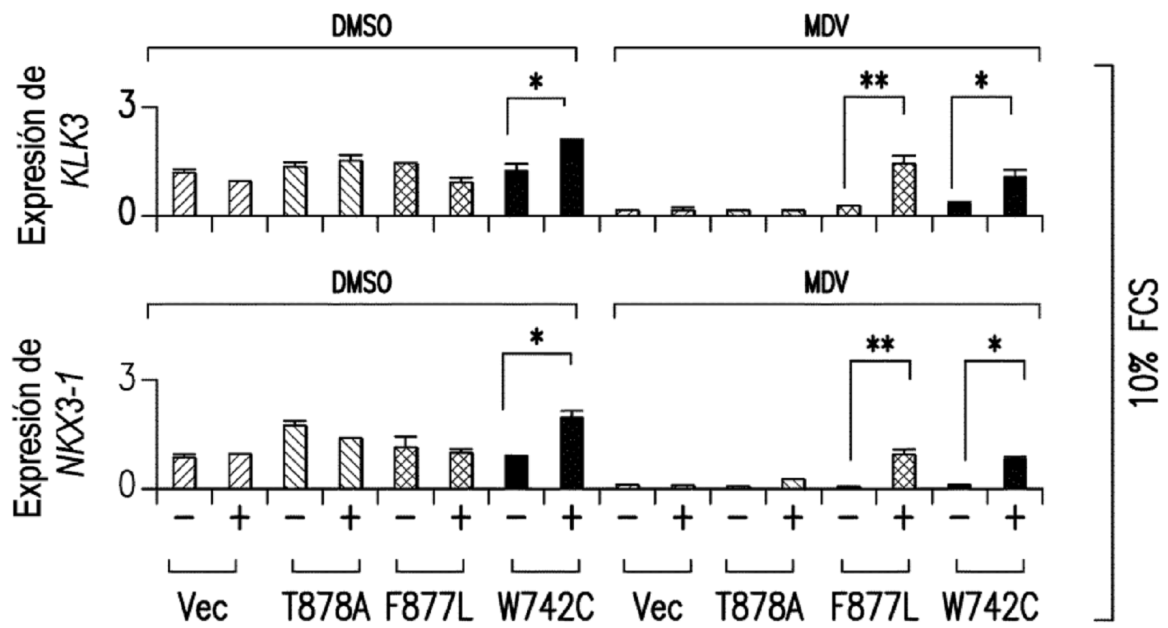


FIG.5A

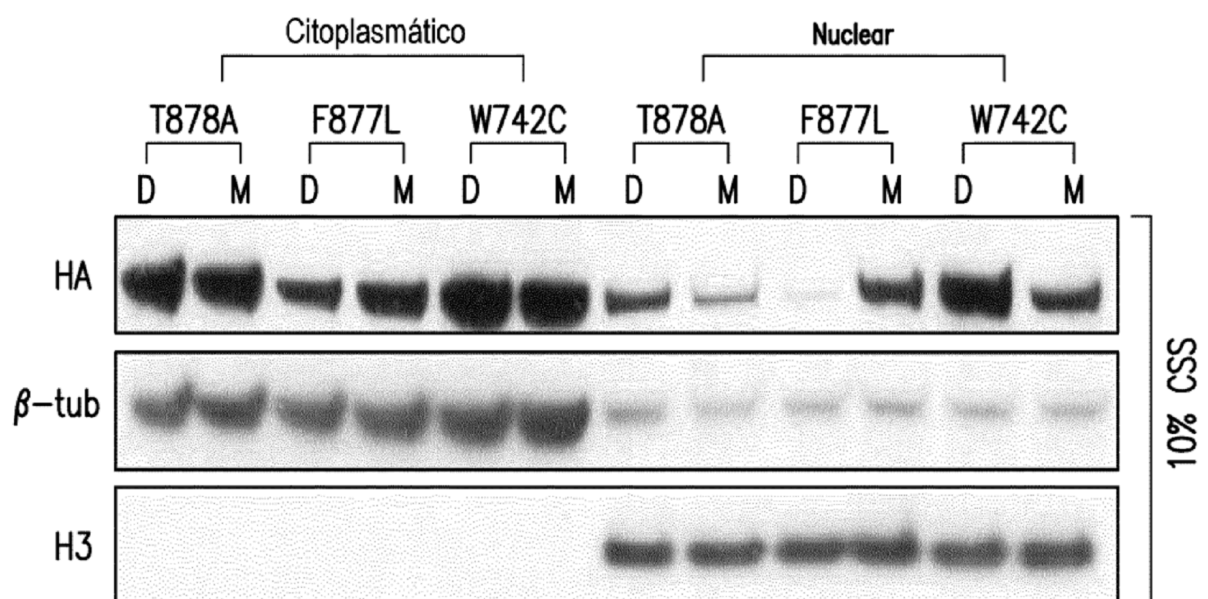


FIG.5B

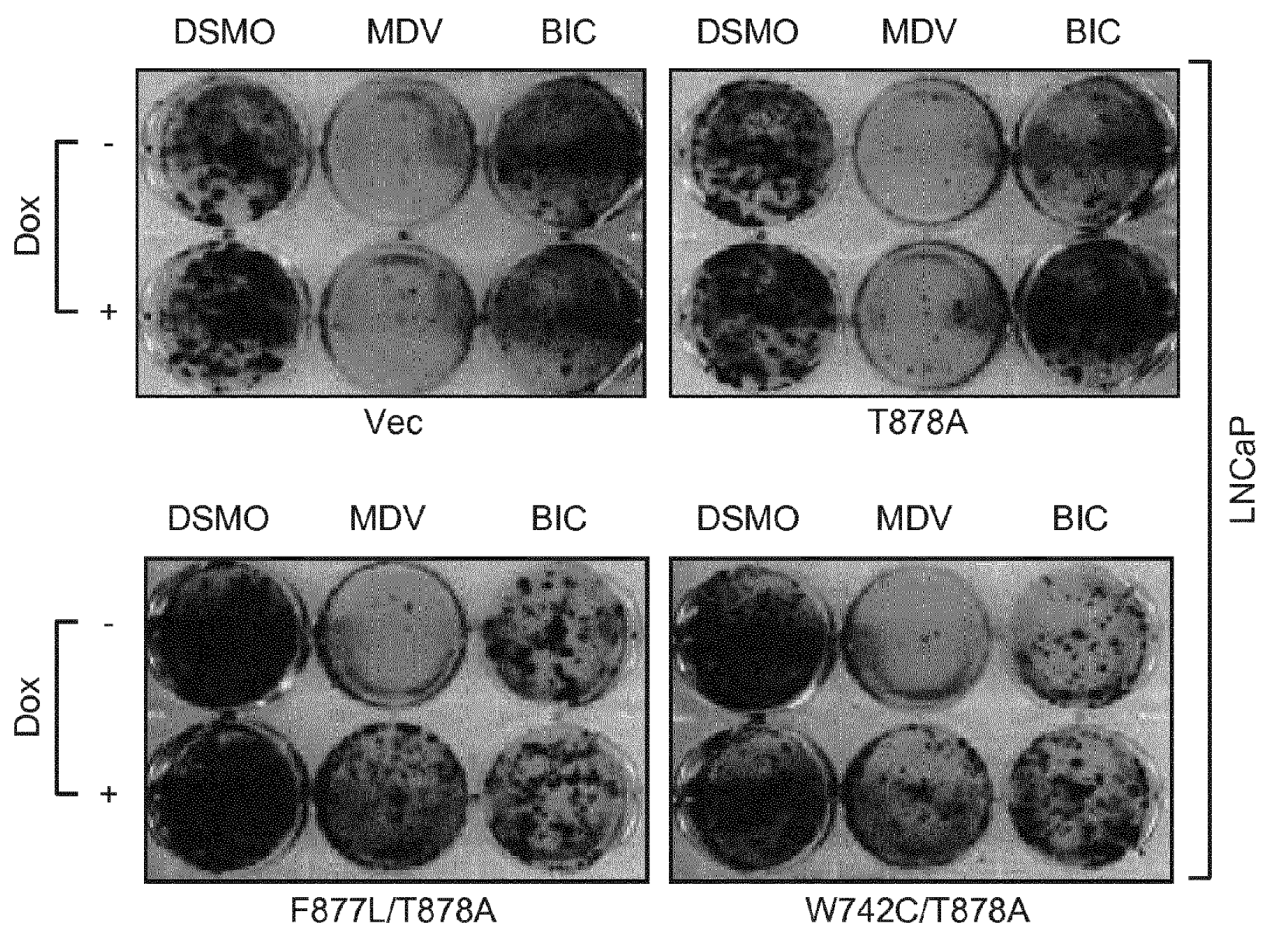
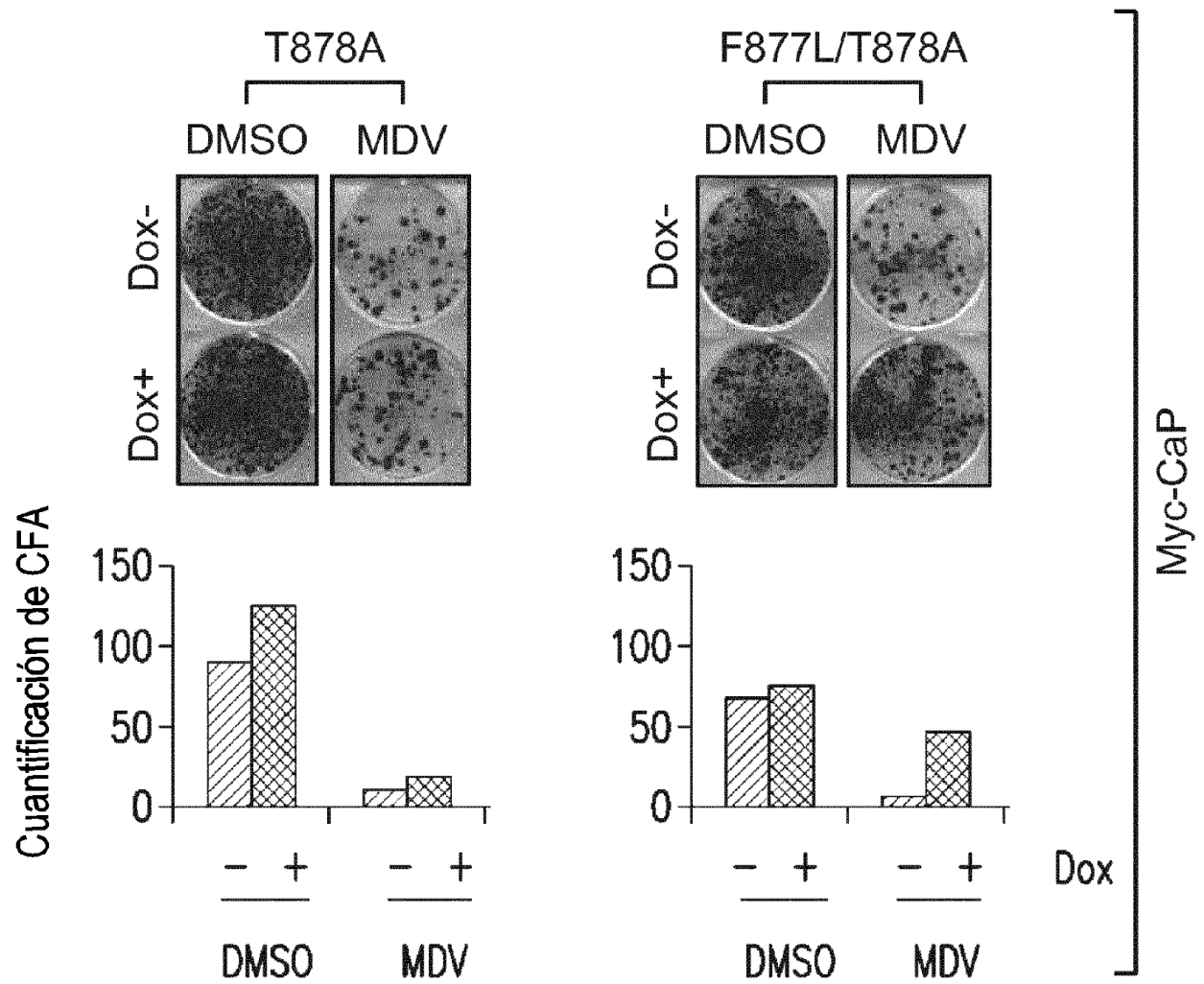


FIG.5C



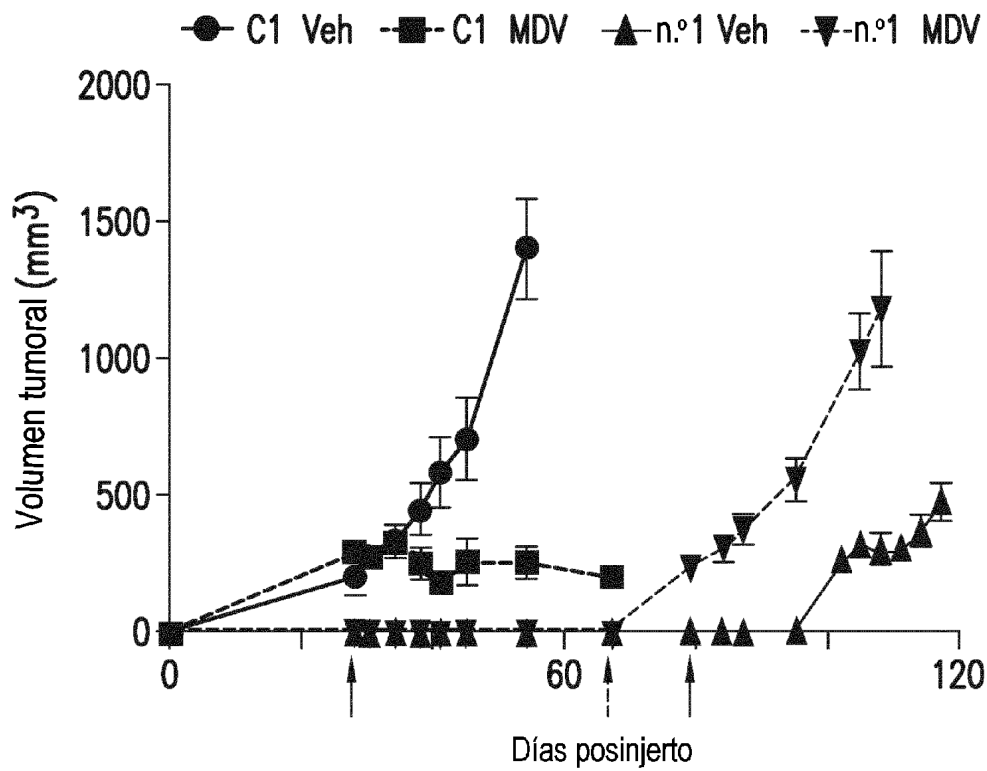


FIG.5E

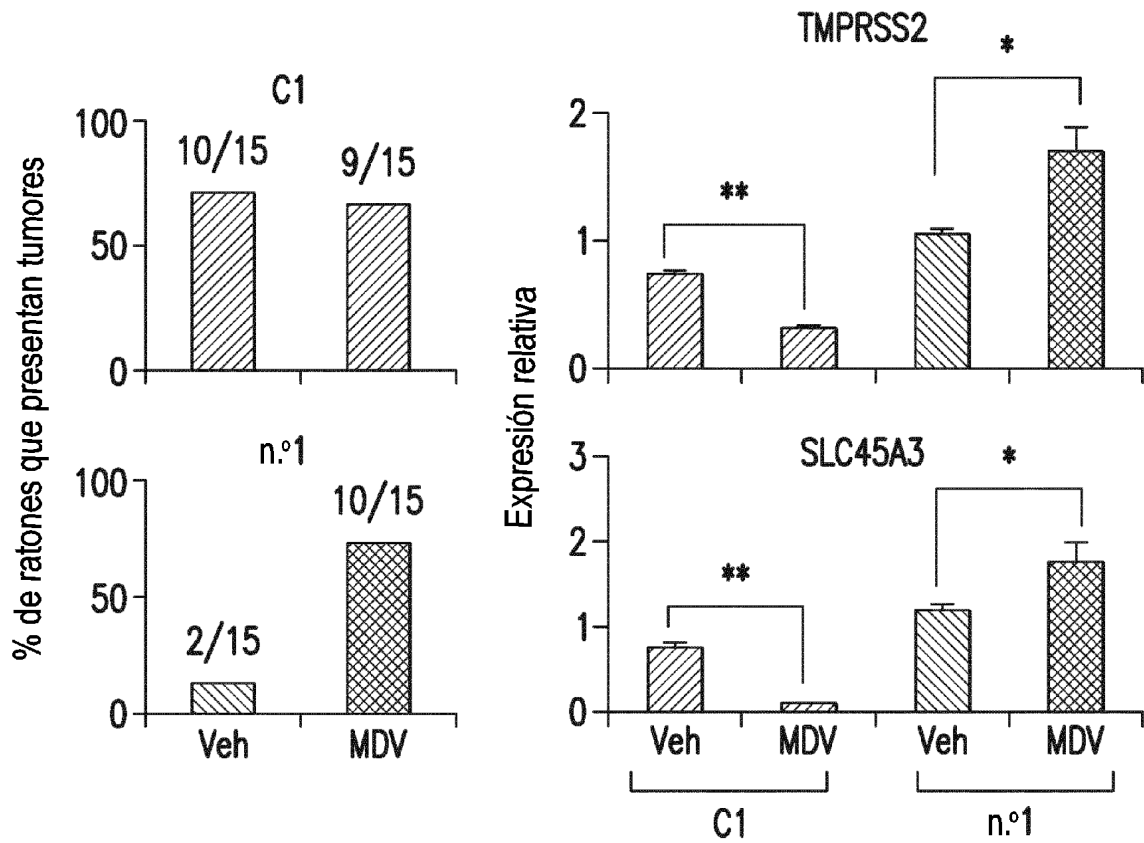


FIG.5F

FIG.5G

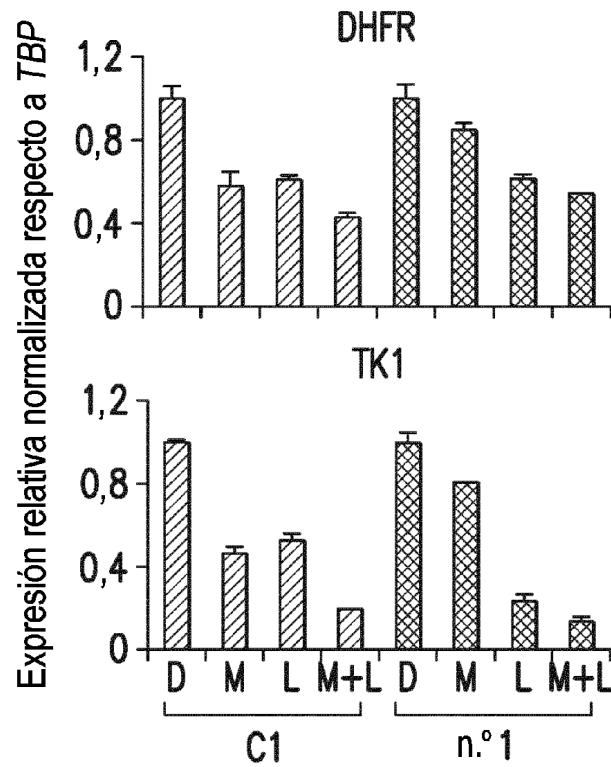


FIG.6A

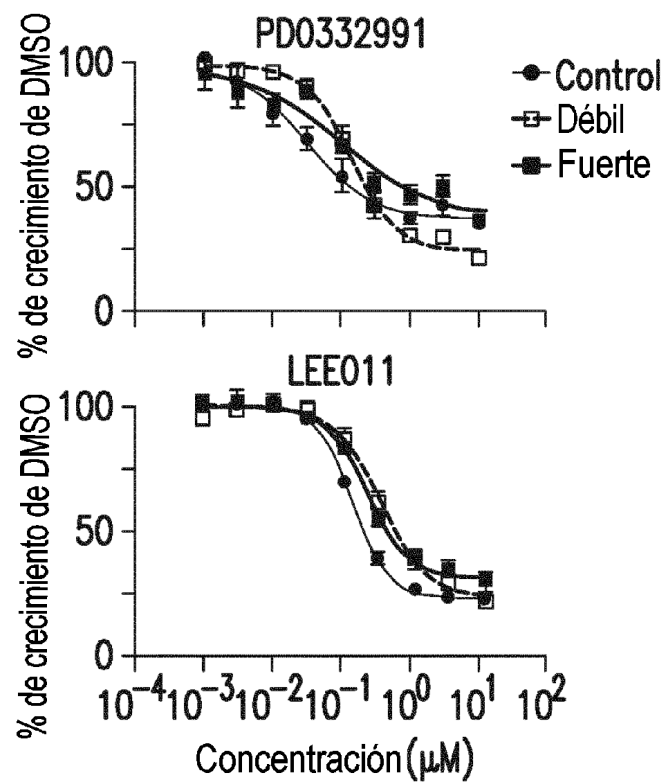


FIG.6B

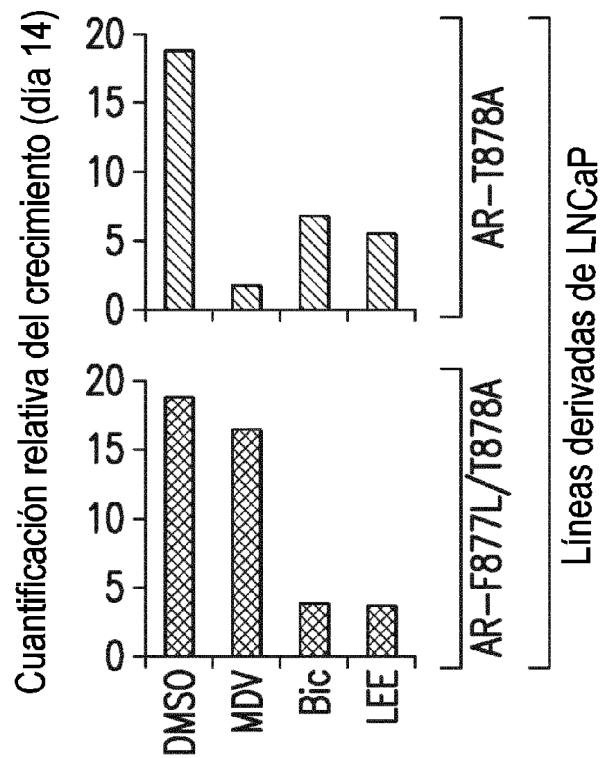


FIG.6C

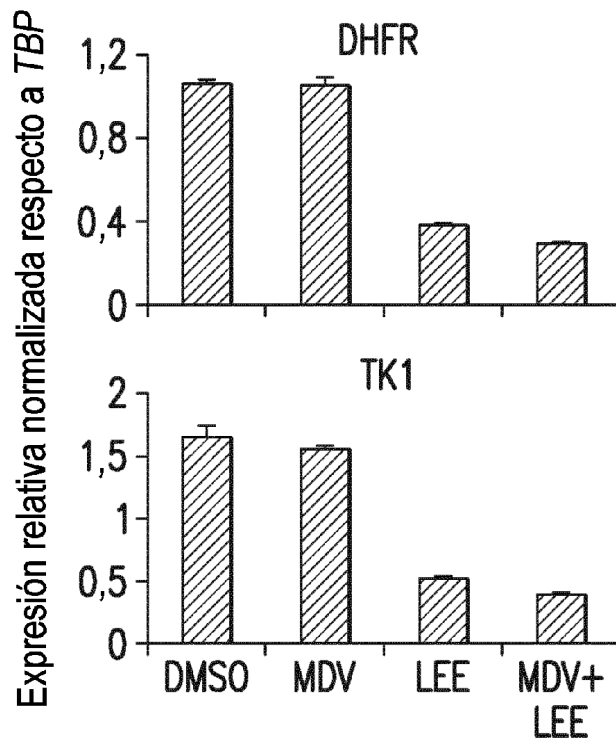


FIG.6D

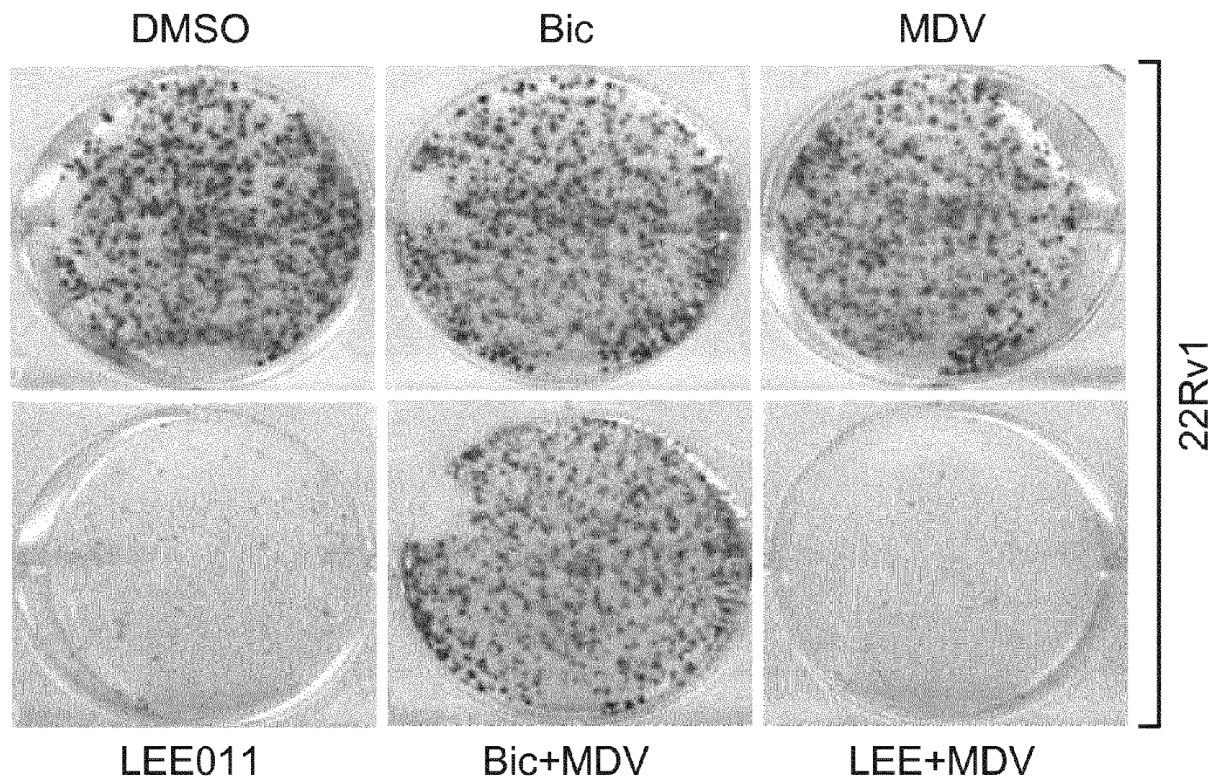


FIG.6E

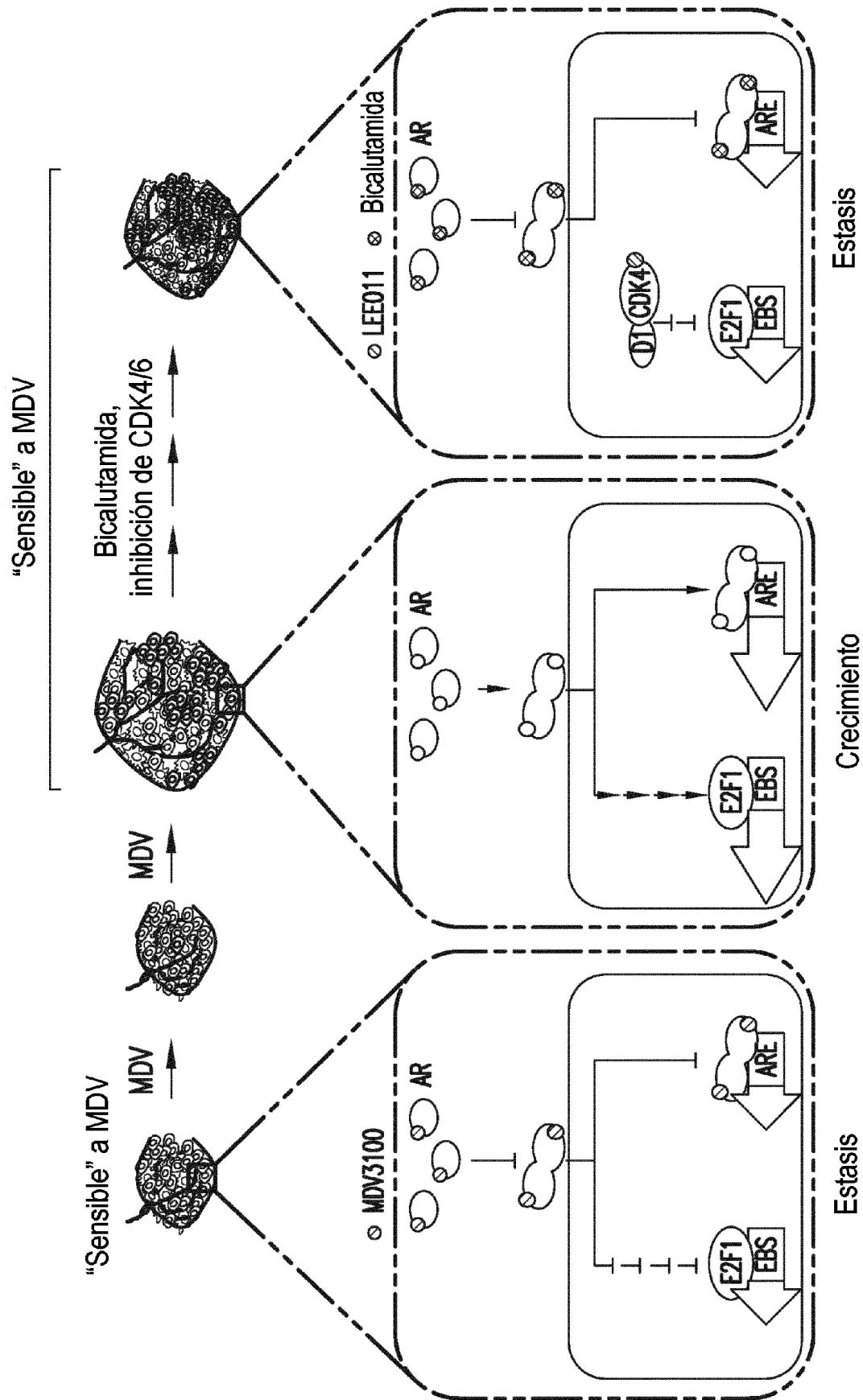


FIG. 7

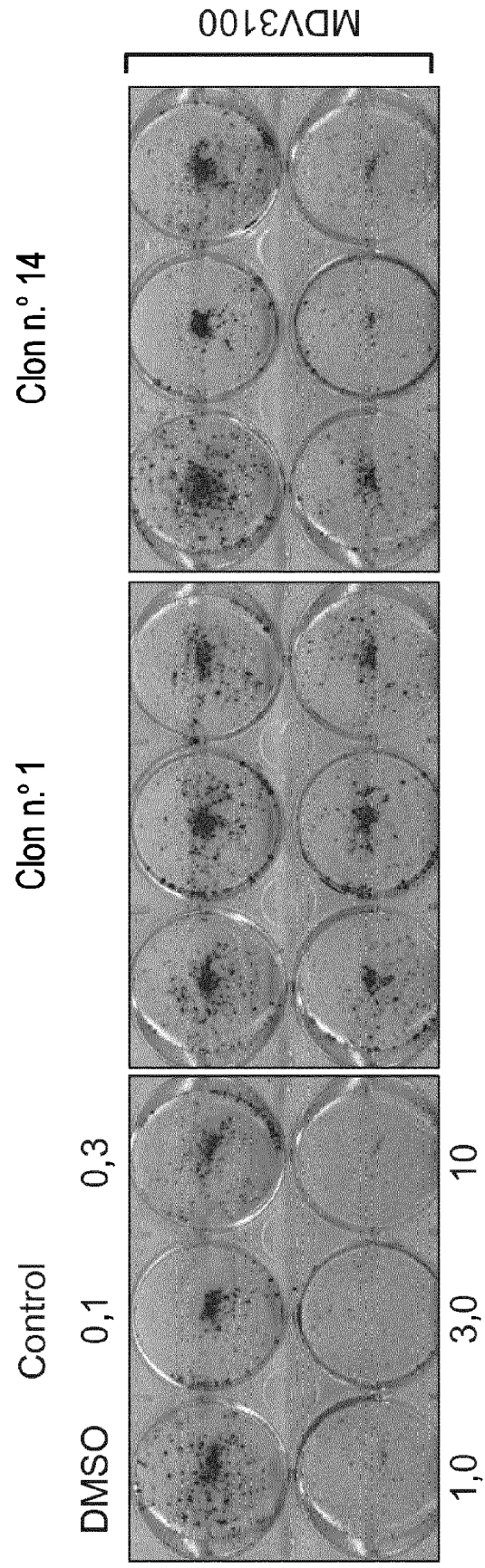


FIG.8

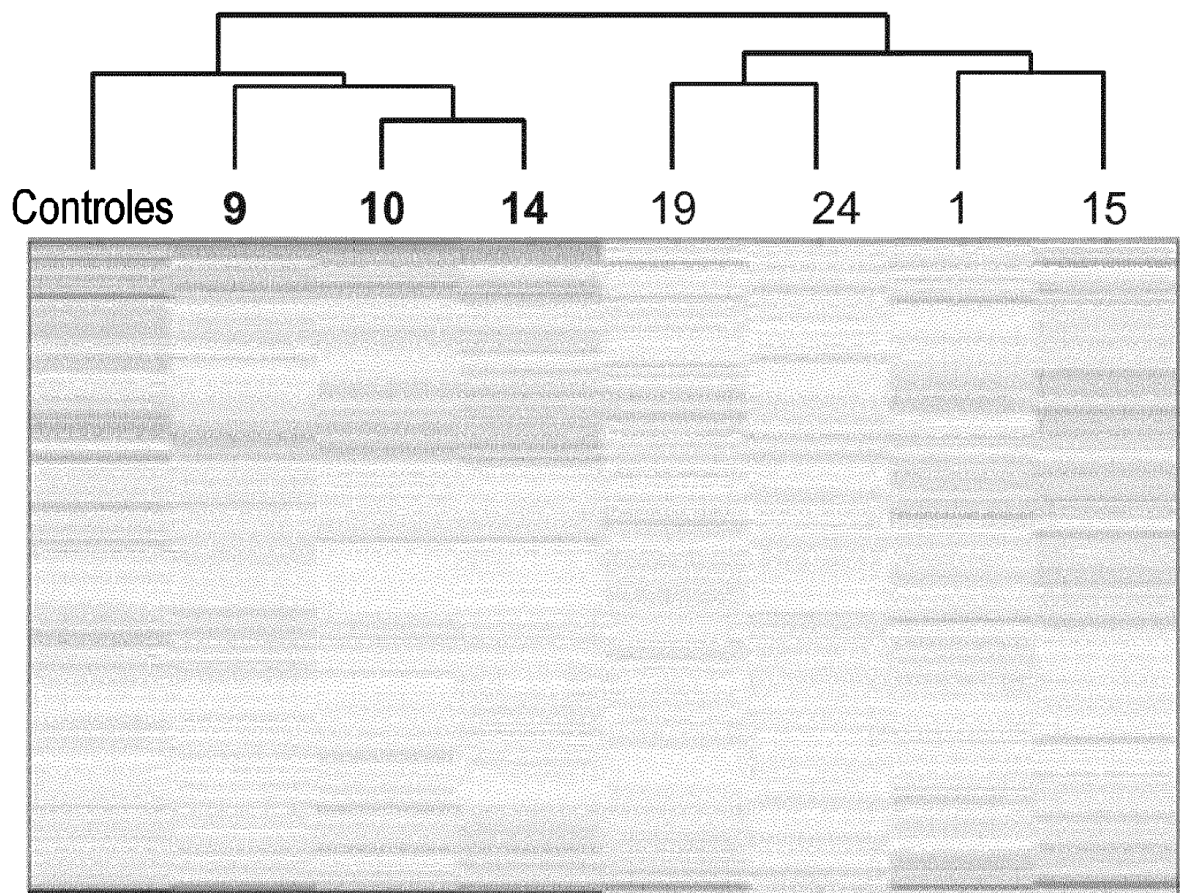
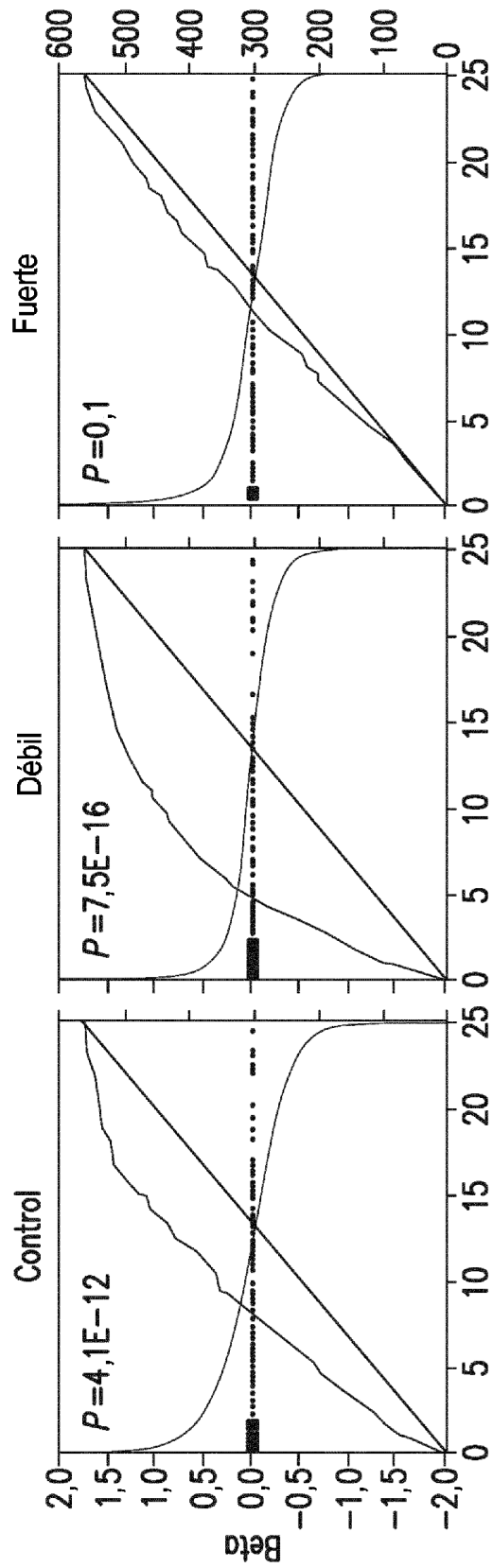


FIG.9A

Suma acumulativa de los conjuntos de sondas
que se solapan con la lista de genes



Posición del conjunto de sondas expresadas clasificada por beta promedio

FIG.9B

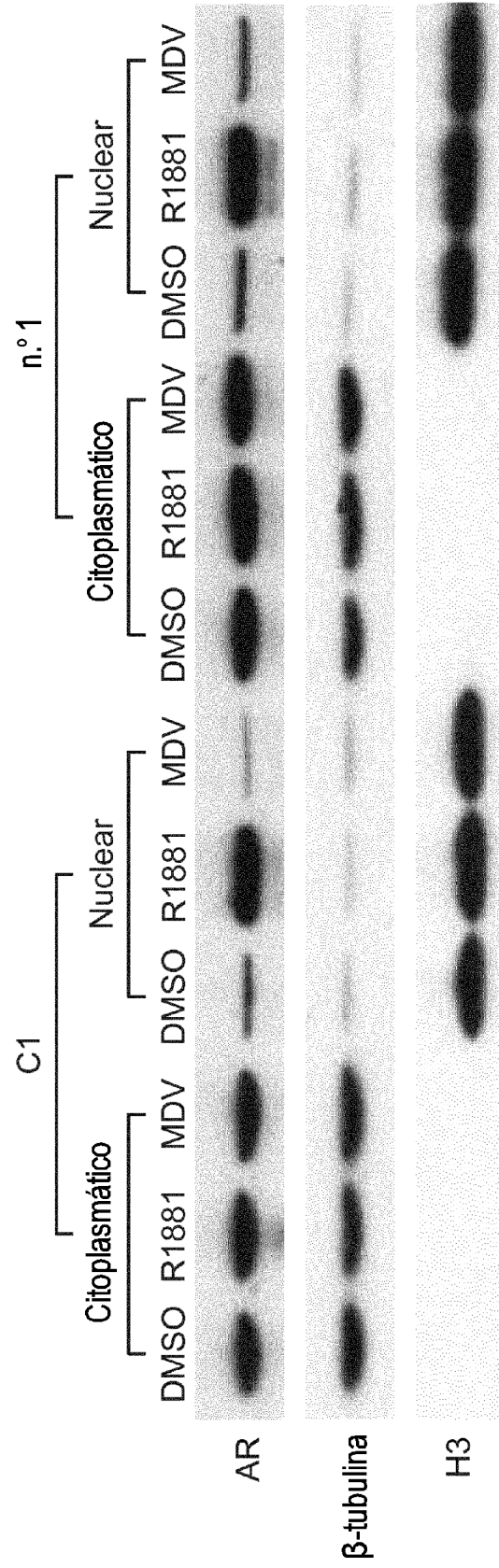


FIG.10

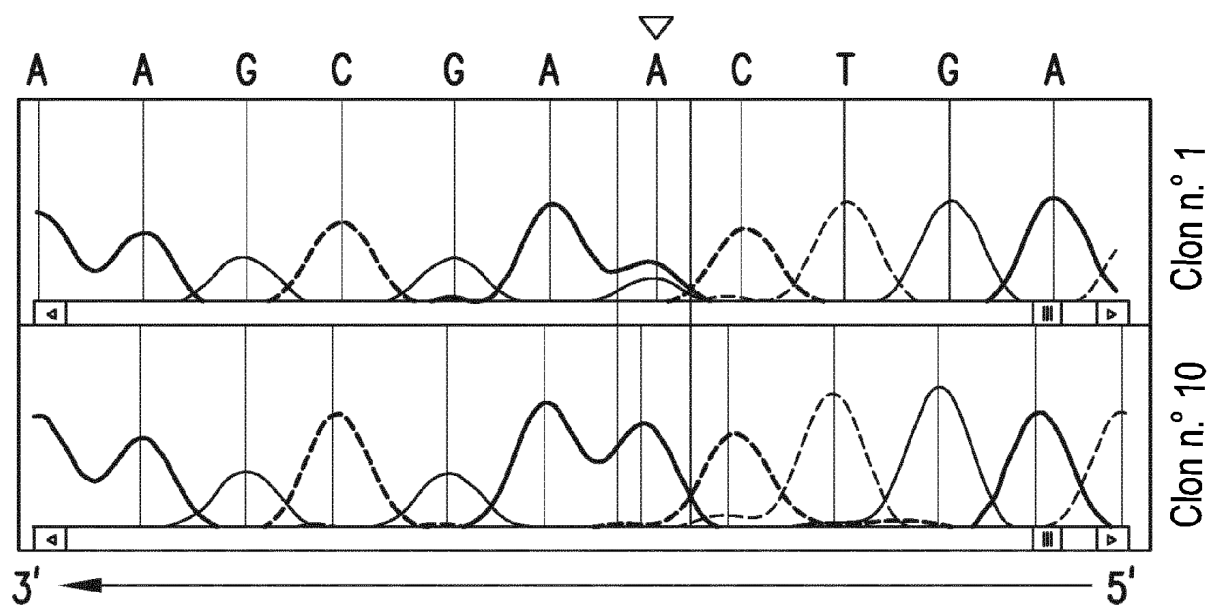


FIG.11

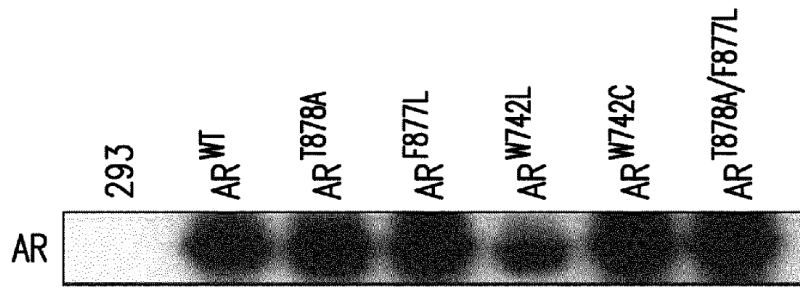


FIG.12A

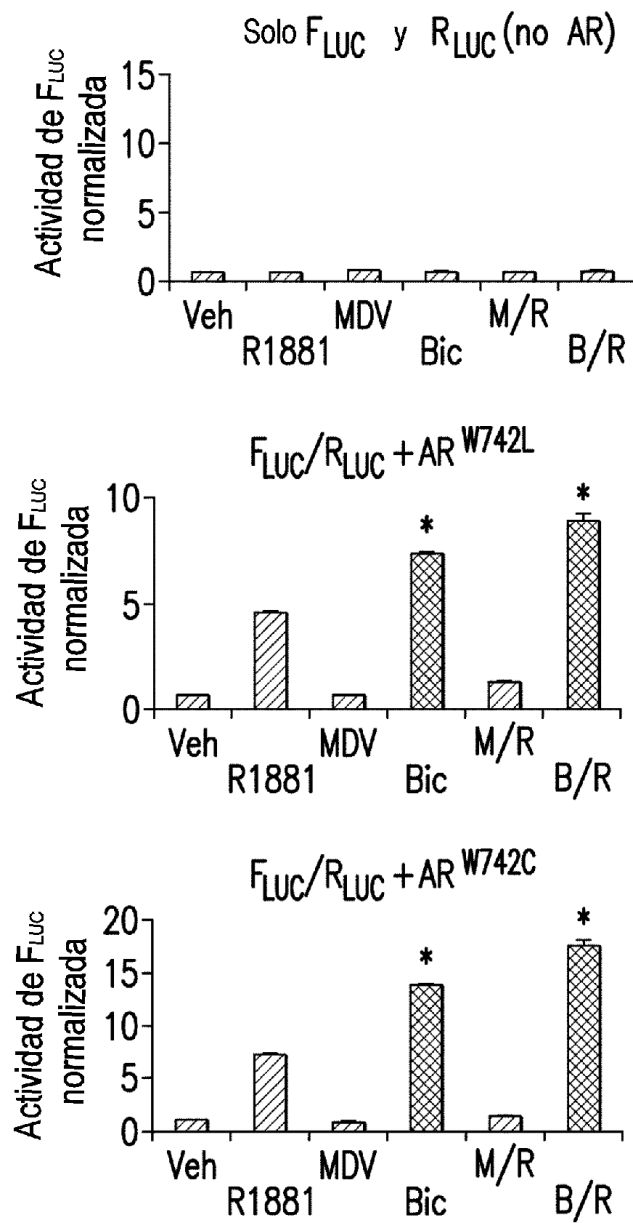


FIG.12B

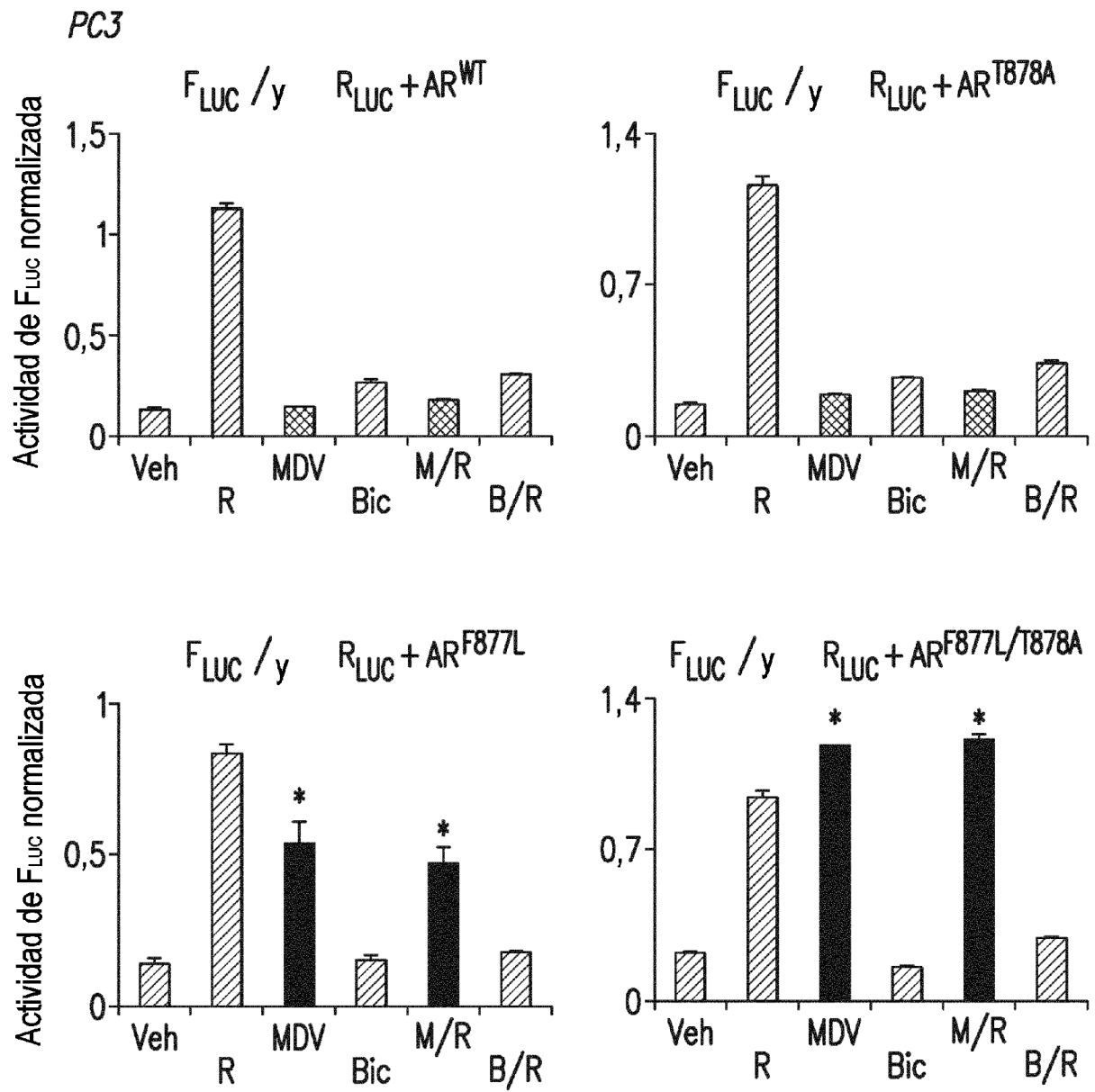


FIG.13

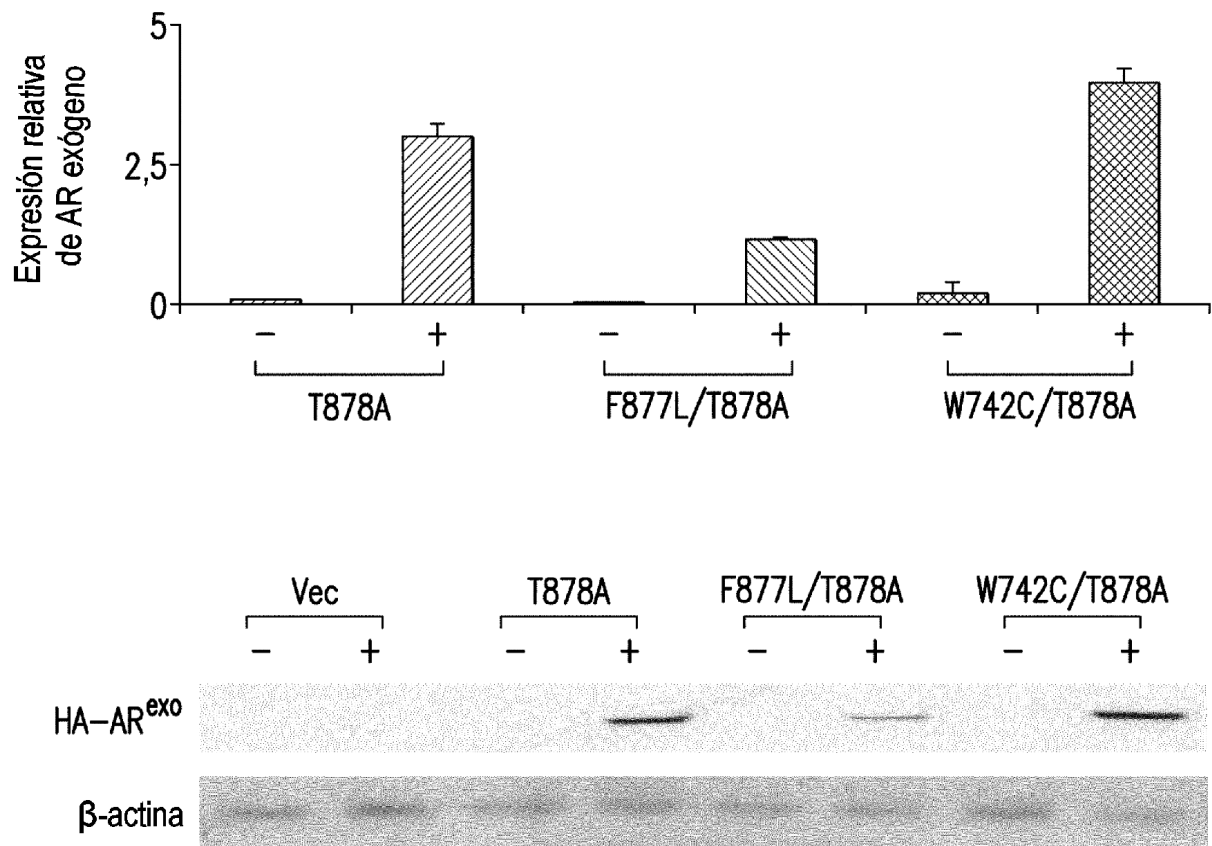


FIG.14

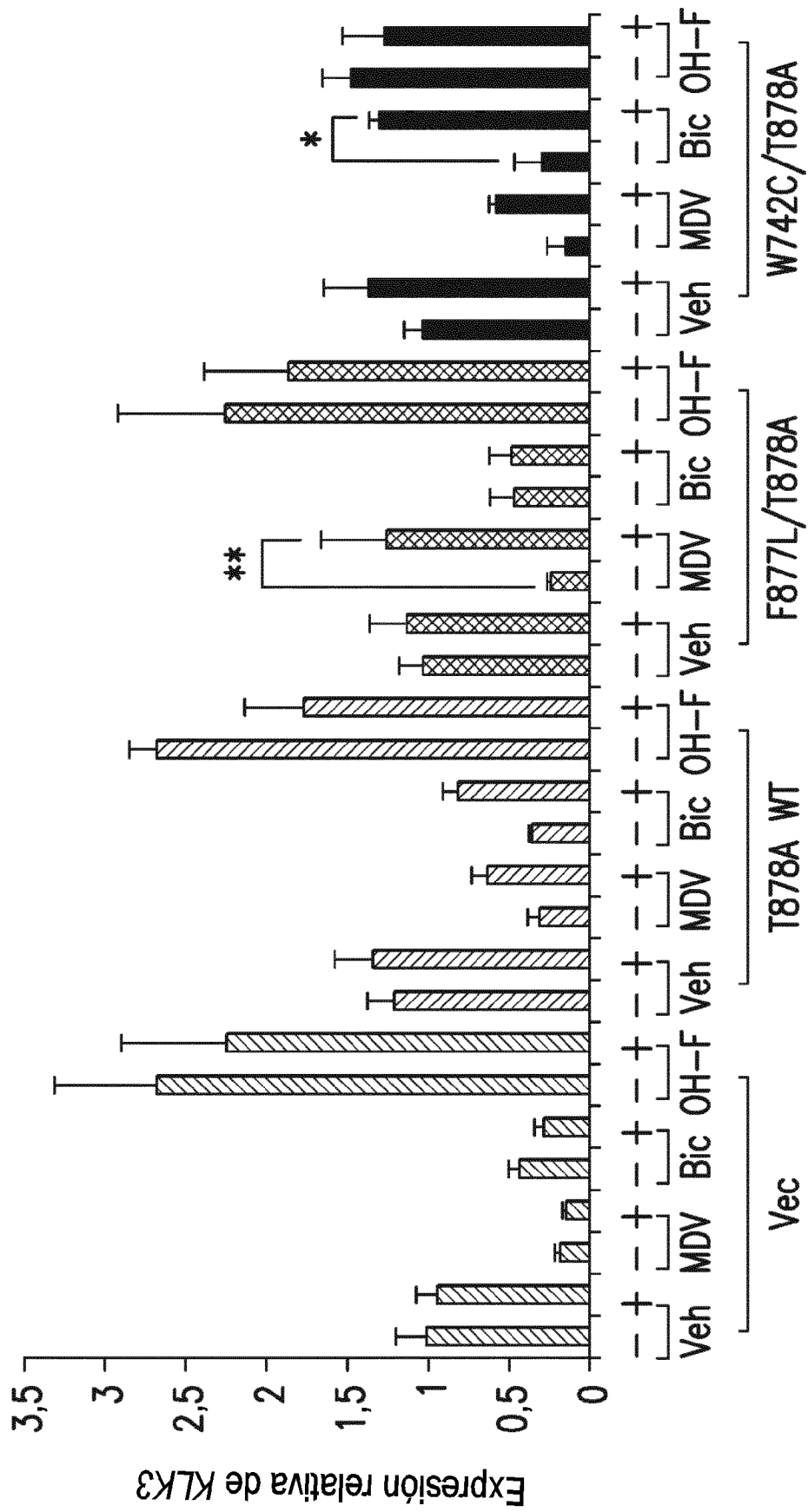


FIG.15

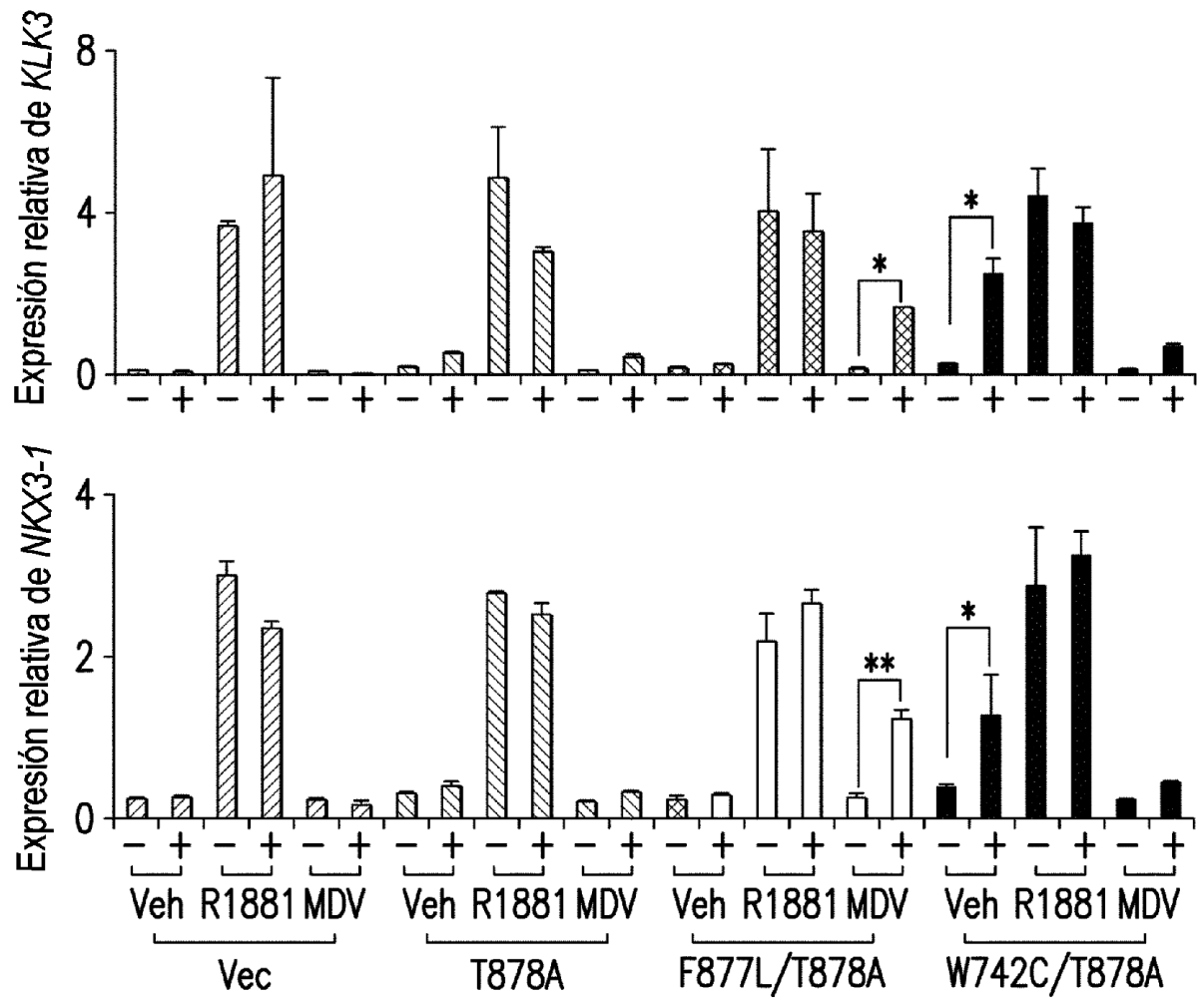


FIG.16A

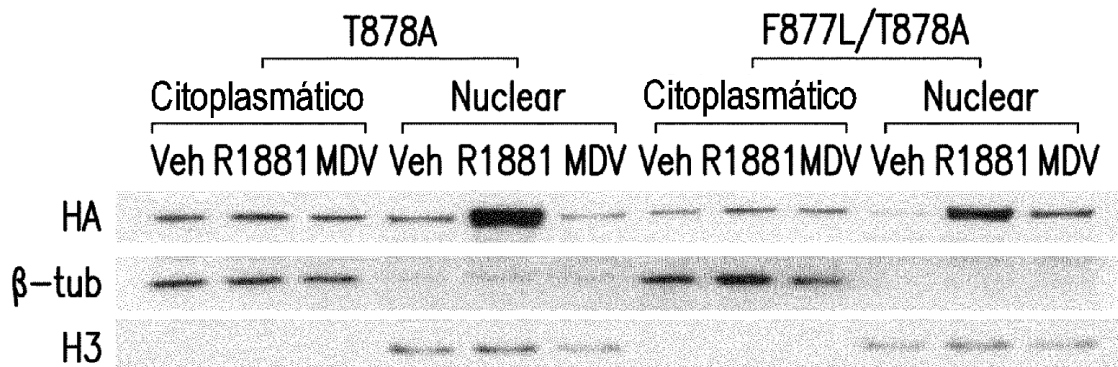


FIG.16B

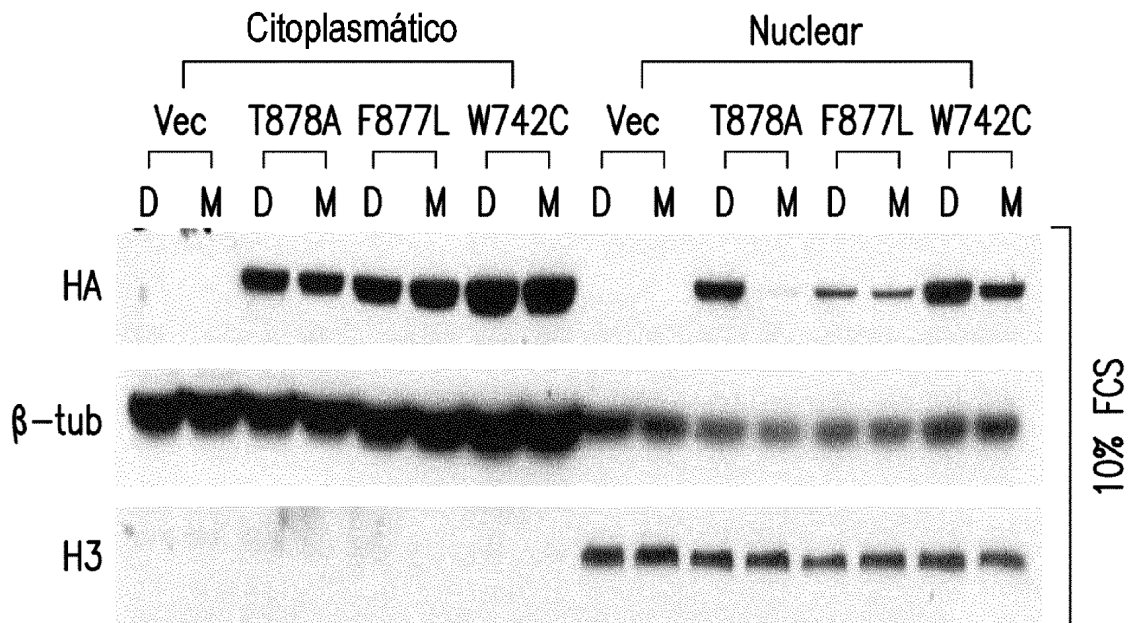


FIG.17A

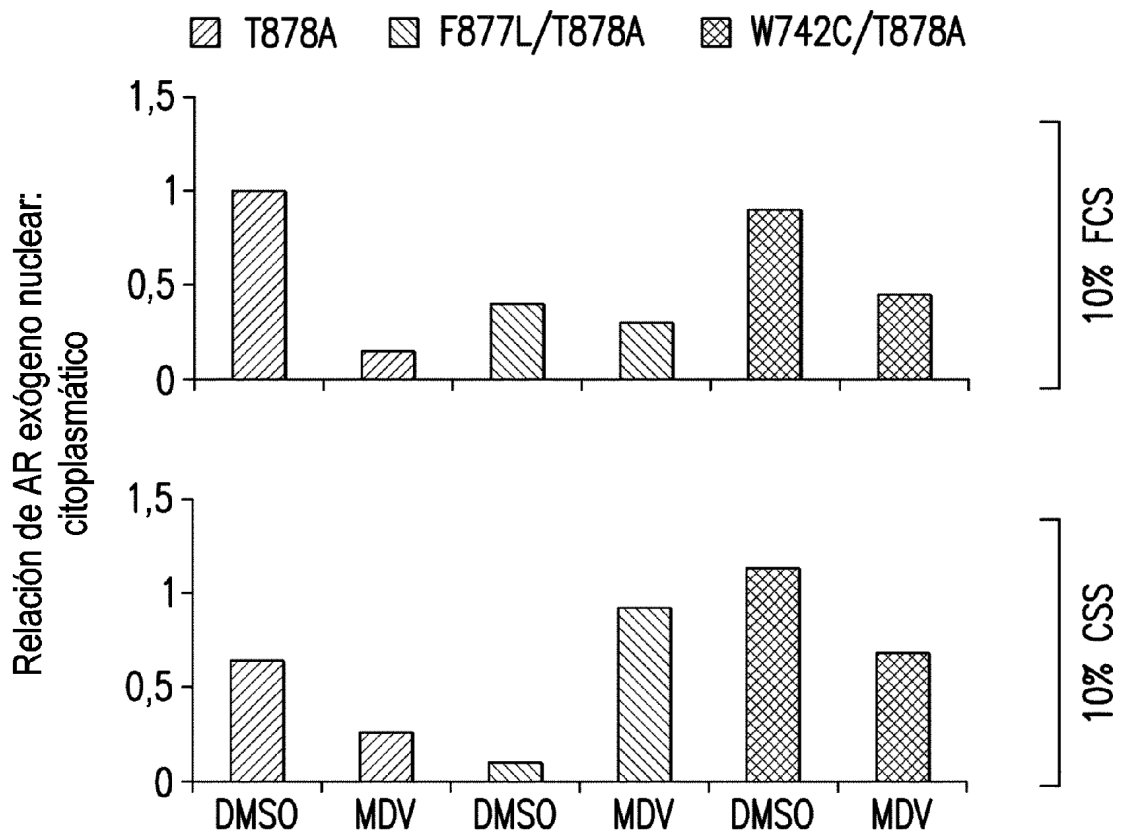


FIG.17B

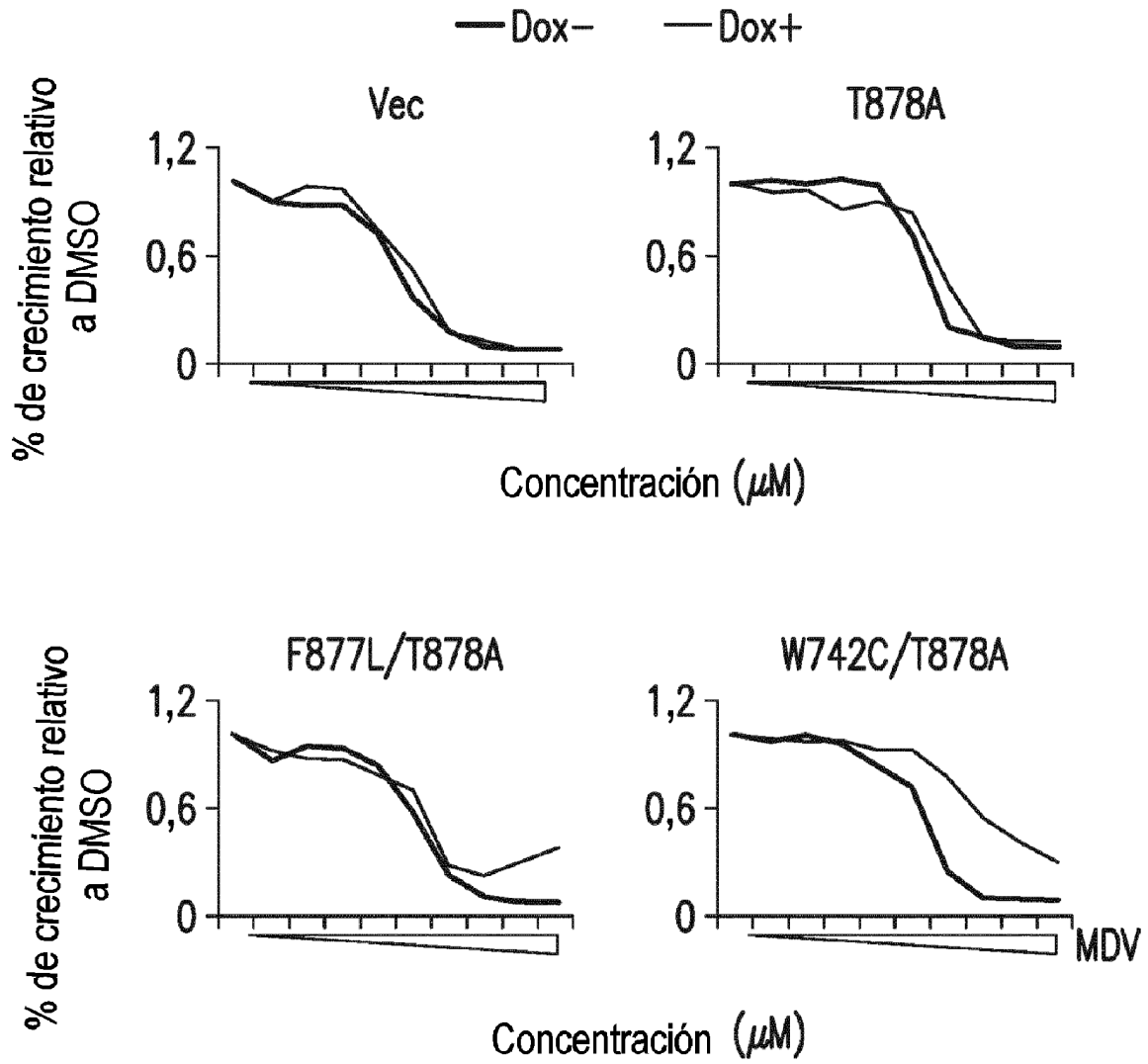


FIG.18A

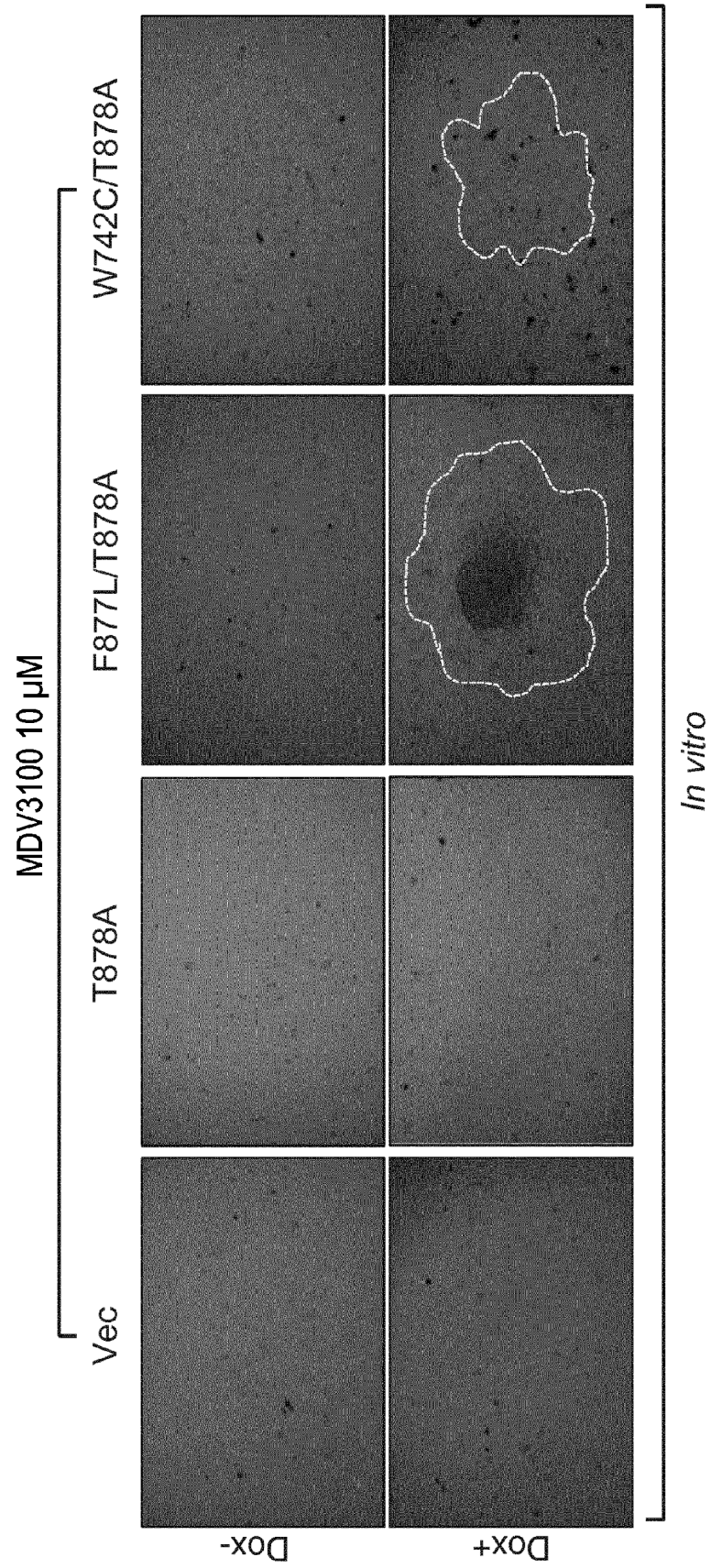


FIG.18B

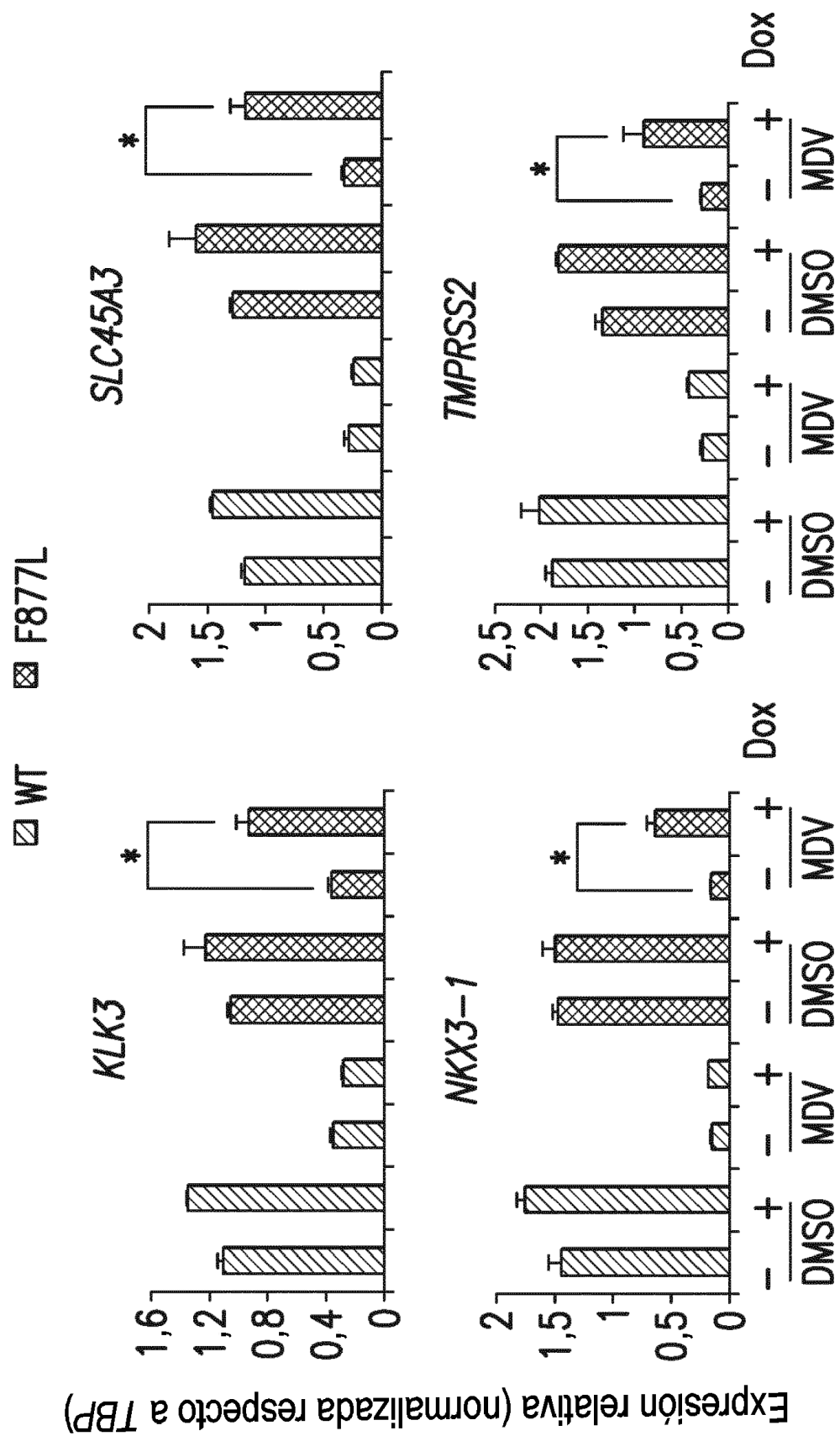


FIG.19A

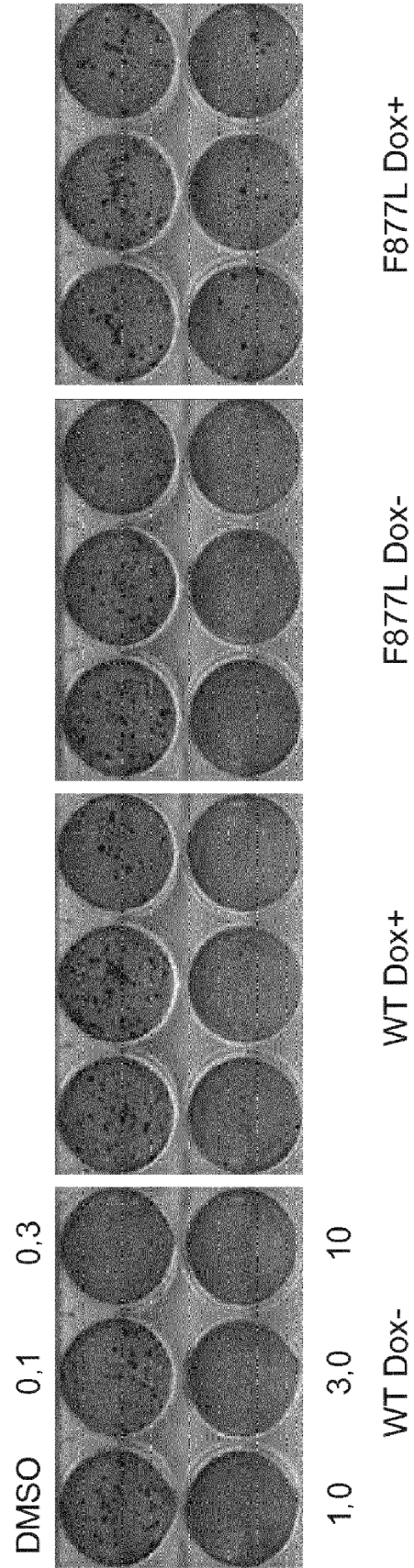


FIG.19B

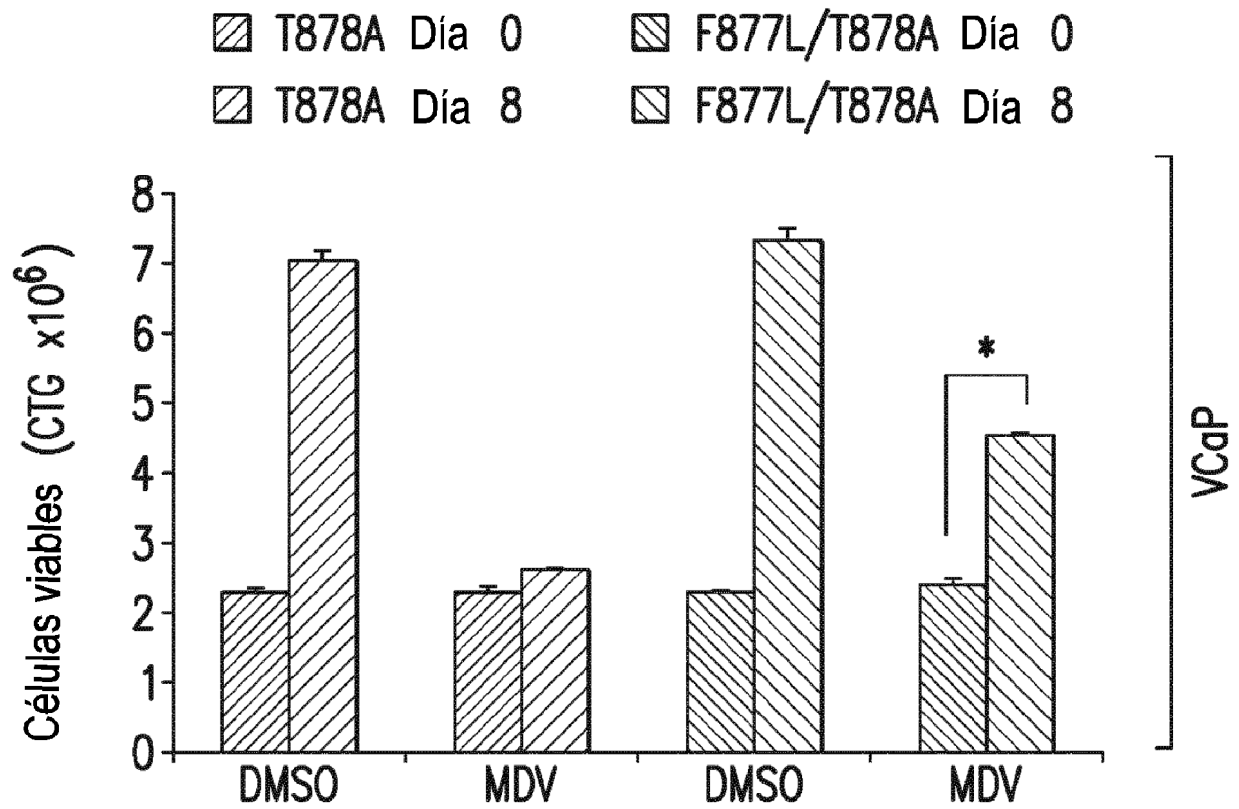
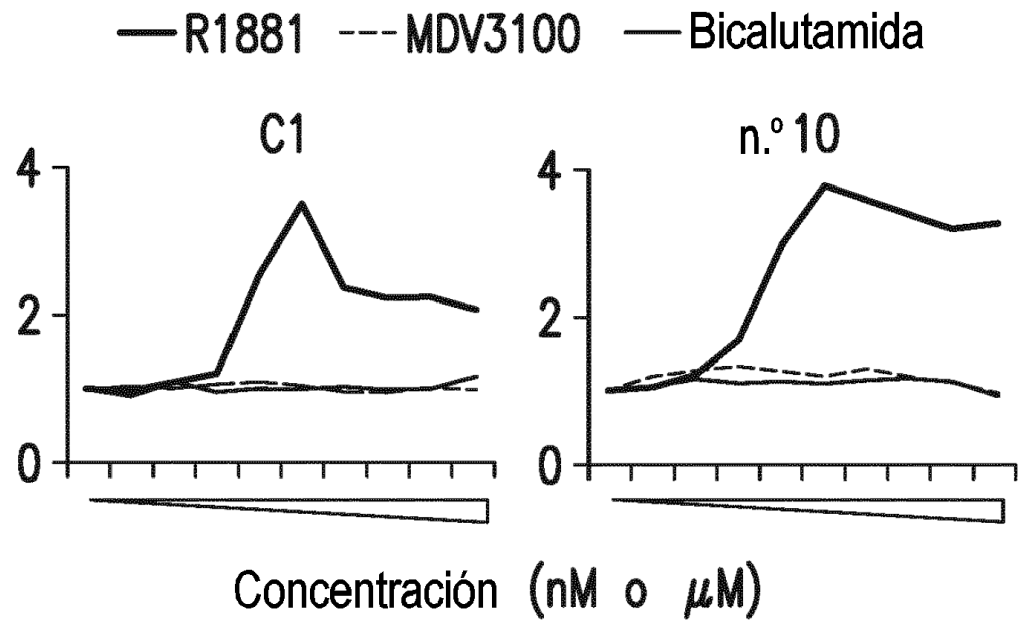


FIG.20

Factor de cambio en el número
de células respecto a DMSO



Factor de cambio en el número
de células respecto a DMSO

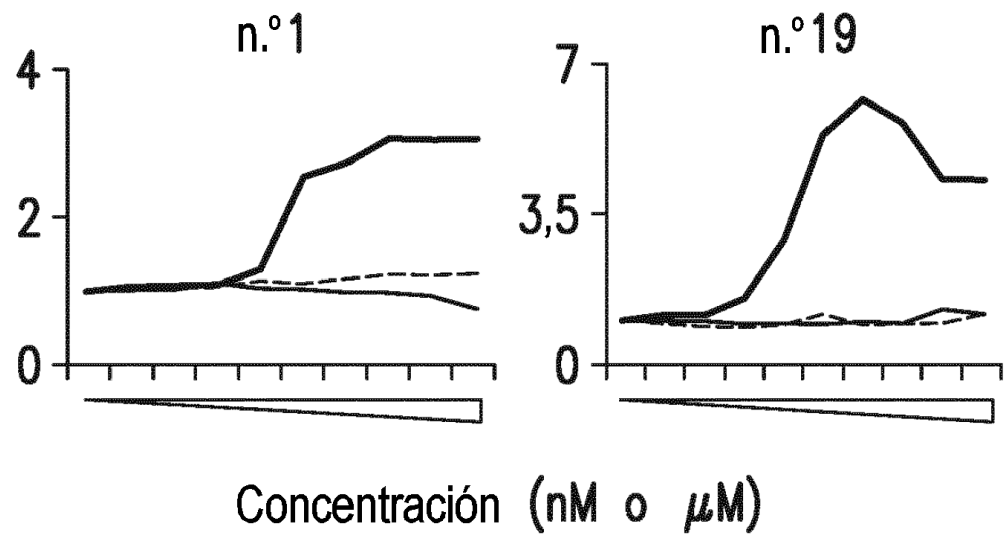


FIG.21

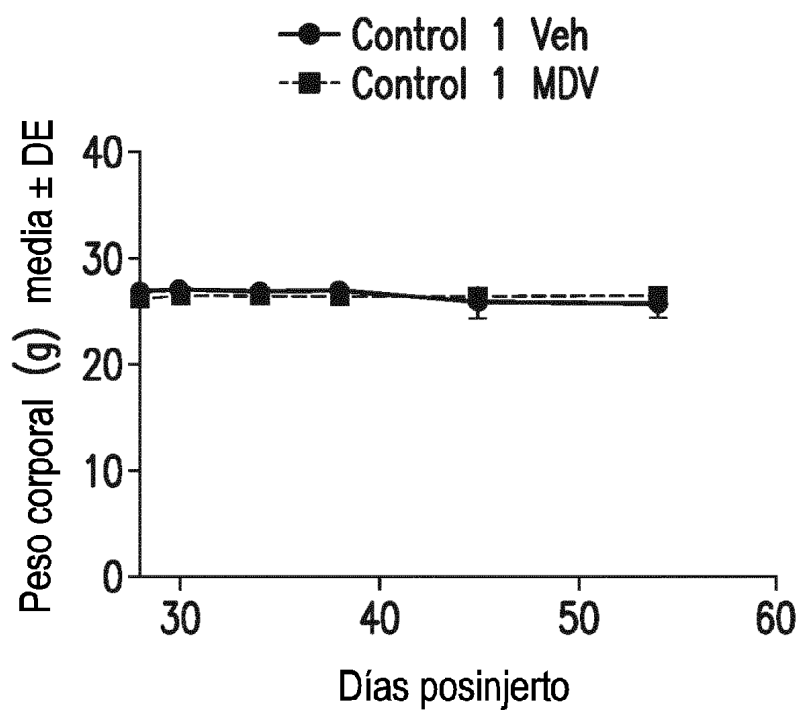


FIG. 22A

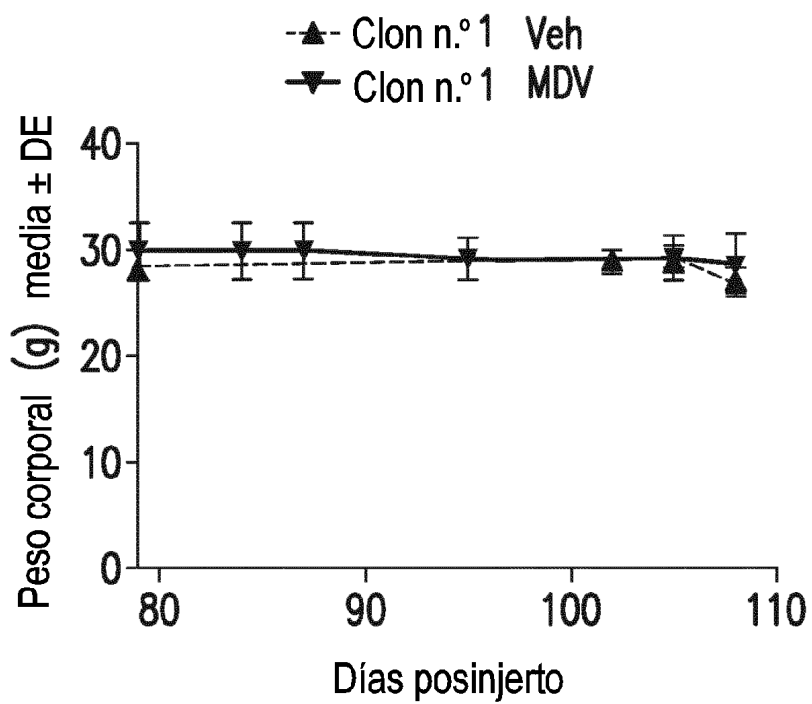


FIG. 22B