(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105143463 A
(43)申请公布日 2015.12.09

(21)申请号 201480010231.9

(22)申请日 2014.02.24

(30)优先权数据
61/768,860 2013.02.25 US
61/878,669 2013.09.17 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.08.24

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/017977 2014.02.24

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2014/130932 EN 2014.08.28

(71)申请人 诺华股份有限公司
地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 V·库克 J·科恩 M·科帕尔
W·周 P·朱 S·德拉奇
G·卡波尼格罗

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所 11247
代理人 黄革生 林柏楠

(51)Int.Cl.
C12Q 1/68(2006.01)
C07K 14/705(2006.01)
G01N 33/74(2006.01)
A61K 31/00(2006.01)
C07K 14/72(2006.01)

权利要求书5页 说明书56页 附图14页

(54)发明名称

新的雄激素受体突变

(57)摘要

提供了用于AR-相关疾病，例如前列腺疾病如前列腺癌、乳腺癌和许多其他疾病的诊断、预后和治疗的组合物和方法。特别地，已经鉴定出雄激素受体(AR)的位置876处的新的和临床相关突变。基于存在或不存在该突变，可以预测药物敏感性，并可以设计治疗方案。包括突变体AR的多肽、突变体AR的抗体和编码突变体AR的多核苷酸可以用于鉴定新的治疗。在AR中位置741和位置877处的双突变也显示出可用于患者分层。

CN 105143463 A

1. 组合物，其包括包含雄激素受体的多肽或其片段或变体，所述多肽或其片段或变体包括或跨越位置 876，其中位置 876 处的氨基酸被置换或缺失或者不是苯丙氨酸 (F)（其中氨基酸的位置依据 SEQ ID NO:54 的编号）。

2. 权利要求 1 的组合物，其中位置 876 处的氨基酸缺失。

3. 权利要求 1 的组合物，其中位置 876 处的氨基酸是亮氨酸 (L)。

4. 组合物，其包括包含雄激素受体的多肽或其片段或变体，所述多肽或其片段或变体包括或跨越位置 876，其中位置 876 处的氨基酸被置换或缺失或者不是苯丙氨酸 (F)（其中氨基酸的位置依据 SEQ ID NO:54 的编号）；并且

其中多肽或其片段或变体任选地在其他位置处包括一个或多个突变。

5. 权利要求 4 的组合物，其中位置 877 处的氨基酸不是苏氨酸 (T)，位置 874 处的氨基酸不是组氨酸 (H)，位置 715 处的氨基酸不是缬氨酸 (V)，并且 / 或者位置 741 处的氨基酸不是色氨酸 (W)。

6. 权利要求 4 的组合物，其中片段为至少 5 个、至少 6 个、至少 7 个、至少 8 个、至少 9 个、至少 10 个、至少 15 个、至少 20 个、至少 25 个、至少 30 个、至少 35 个、至少 40 个、至少 50 个、至少 60 个、至少 75 个、至少 100 个，或者至少 150 个、至少 200 个、至少 250 个、至少 300 个、至少 350 个、至少 400 个、至少 450 个、至少 500 个、至少 550 个、至少 600 个、至少 650 个、至少 700 个、至少 750 个、至少 800 个、至少 850 和 / 或至少 900 个氨基酸长。

7. 权利要求 1 或 4 的组合物，其中片段或变体保留在 F876 或 F876 处缺少突变的野生型 AR 的至少一种活性。

8. 组合物，其包括多肽，或其片段或变体，所述多肽或其片段或变体具有 SEQ ID NO:54 所示的序列，或者其不同之处在于 SEQ ID NO:54 中不多于 50％的残基处的一个或多个氨基酸缺失、添加、插入或置换的变体，使得多肽保留 SEQ ID NO:54 的多肽的至少一种活性。

9. 组合物，其包括多肽，或其片段或变体，所述多肽或其片段或变体具有 SEQ ID NO:54 所示的序列，或者其不同之处在于 SEQ ID NO:54 中不多于 1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％或 50％的残基处的一个或多个氨基酸缺失、添加、插入或置换的变体，使得所述多肽保留 SEQ ID NO:54 的多肽的至少一种活性。

10. 权利要求 9 的组合物，其中片段包括 SEQ ID NO:54 的至少 10 个连续氨基酸。

11. 权利要求 9 的组合物，其中片段包括 SEQ ID NO:54 的至少 15 个连续氨基酸。

12. 组合物，其包括多肽，或其片段或变体，其中多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO:54 所示，其中所述序列在 SEQ ID NO:54 的氨基酸位置 876 处含有突变或者跨越 SEQ ID NO:54 的氨基酸位置 876 使得位置 876 处的氨基酸被置换或缺失或者不是苯丙氨酸 (F)，其中任选地位置 877 处的氨基酸不是苏氨酸 (T)，位置 874 处的氨基酸不是组氨酸 (H)，位置 715 处的氨基酸不是缬氨酸 (V)，并且 / 或者位置 741 处的氨基酸不是色氨酸 (W)，并且其中片段的序列包括 SEQ ID NO:54 的至少 5、10 或 15 个连续氨基酸，并包括位置 876。

13. 包括多肽的组合物，所述多肽包括包含 SEQ ID NO:3 至 53 中任意者的序列。

14. 检测来自患者的样品中 AR 多核苷酸或者多肽中位置 F876 处的突变的方法，该方法包括以下步骤：(a) 自患者取得包括 AR 的样品；和 (b) 测定 AR 多核苷酸或多肽或其部分的序列，以确定 AR 是否在位置 F876 处包括突变。

15. 诊断、预后和 / 或治疗患者的方法，该方法包括以下步骤 :(a) 自患者取得包括 AR 的样品 ;(b) 测定 AR 多核苷酸或多肽或其部分的序列，以确定 AR 是否在位置 F876 处包括突变 ;和 (c) 如果 AR 在 F876 处不包括突变，施用或推荐施用包括 MDV3100 的治疗组合物 ; 或者如果 AR 在 F876 处包括突变，施用或推荐施用不包括 MDV3100 的治疗组合物。

16. 权利要求 15 的方法，其中不包括 MDV3100 的治疗组合物包括比卡鲁胺或 CDK4/6 抑制剂例如 LEE011 或 PD0332991，或者治疗性核酸。

17. 诊断、预后和 / 或治疗患者的方法，该方法包括以下步骤 :(a) 确定患者中雄激素受体或其片段的位置 741 和 877 处的氨基酸是否分别是色氨酸 (W) 和苏氨酸 (T) ;(b) 对患者推荐施用和 / 或施用 (1) 比卡鲁胺或 MDV3100 如果位置 741 和 877 处的氨基酸分别是色氨酸 (W) 和苏氨酸 (T) ;或者 (2) 不是比卡鲁胺或 MDV3100 的前列腺疾病治疗如果位置 741 和 877 处的氨基酸不分别是色氨酸 (W) 和苏氨酸 (T)。18. 权利要求 17 的方法，其中不包括比卡鲁胺或 MDV3100 的治疗包括 CDK4/6 抑制剂例如 LEE011 或 PD0332991 或者治疗性核酸。

18. 多核苷酸或反义多核苷酸，其包括至少 15 个连续核苷酸，所述至少 15 个连续核苷酸包括 0、1、2 或 3 个错配，具有以下序列和 / 或具有与以下序列互补的序列 :编码包括位置 876 的 SEQ ID NO:54 的至少 5 个连续氨基酸的第一序列，其中位置 876 处的氨基酸被置换或缺失并且是苯丙氨酸 (F) 以外的氨基酸。

19. 权利要求 18 的多核苷酸，其中第一序列编码 SEQ ID NO:2 的至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 个连续氨基酸，其中至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 个连续氨基酸包括或跨越 SEQ IDNO:2 的位置 876，并且其中位置 876 处的氨基酸不是苯丙氨酸 (F)，并且其中任选地，位置 877 处的氨基酸不是苏氨酸 (T)，位置 874 处的氨基酸不是组氨酸 (H)，位置 715 处的氨基酸不是缬氨酸 (V)，并且 / 或者位置 741 处的氨基酸不是色氨酸 (W)。

20. 表达构建物或载体，其包括权利要求 18 或 19 的多核苷酸。

21. 宿主细胞，其包括权利要求 20 的表达构建物或载体。

22. 多核苷酸，其编码包括 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的突变体雄激素受体，除了编码的突变体雄激素受体蛋白在 SEQ ID NO:2 的位置 876 处含有亮氨酸 (L) 之外。

23. 表达构建物或载体，其包括 :启动子 ;和编码突变体雄激素受体或其片段的多核苷酸区段，其中雄激素受体的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示，其中所述序列在 SEQ ID NO:2 的氨基酸位置 876 处含有突变，使得位置 876 处的氨基酸不是苯丙氨酸 (F)，并且其中，任选地，位置 877 处的氨基酸不是苏氨酸 (T)，874 处的氨基酸不是组氨酸 (H)，位置 715 处的氨基酸不是缬氨酸 (V)，并且 / 或者位置 741 处的氨基酸不是色氨酸 (W)，并且其中片段的序列包括 SEQ ID NO:2 的至少 5 个连续氨基酸并包括位置 876，其中多核苷酸区段位于启动子的下游，其中多核苷酸区段的转录在启动子处起始。

24. 分离的多核苷酸，其中分离的多核苷酸或其互补序列编码 SEQ ID NO:54 的至少 10、15 或 20 个连续氨基酸，其中至少 10 个连续氨基酸包括或跨越 SEQ ID NO:54 的位置 876，并且其中位置 876 处的氨基酸被置换或缺失或者不是苯丙氨酸 (F)。

25. 宿主细胞，其包括包含启动子 ;和权利要求 22 或 24 的多核苷酸的构建物。

26. 测定细胞对 MDV3100 的敏感性的方法，该方法包括 :

(a) 若有的话，确定细胞中雄激素受体中位置 876 处的氨基酸，其中位置 876 根据 SEQ ID NO:54 的编号确定 ;

(b) 若有的话，将位置 876 处的氨基酸与野生型雄激素受体比较，其中不存在氨基酸或存在苯丙氨酸以外的氨基酸提示细胞对 MDV3100 不敏感。

27. 权利要求 26 的方法，其中细胞是前列腺癌细胞、乳腺癌细胞或其他的 AR- 相关疾病细胞。

28. 权利要求 27 的方法，其中 AR- 相关疾病是聚谷氨酸病、秃头症、良性前列腺增生、多毛症、痤疮、脊髓和肌肉萎缩症或肯尼迪病。

29. 预测 AR- 相关疾病的患者对使用 MDV3100 的治疗的敏感性的方法，该方法包括 ：

(a) 若有的话，确定患者中或获自患者的样品中雄激素受体中位置 876 处的氨基酸，其中位置 876 根据 SEQ ID NO:54 的编号确定 ；

(b) 若有的话，将位置 876 处的氨基酸与野生型雄激素受体比较，其中不存在氨基酸或存在苯丙氨酸以外的氨基酸提示患者对 MDV3100 不敏感。

30. 权利要求 29 的方法，其中 AR- 相关疾病是前列腺癌或乳腺癌。

31. 权利要求 29 的方法，其中 AR- 相关疾病是聚谷氨酸病、秃头症、良性前列腺增生、多毛症、痤疮、脊髓和肌肉萎缩症或肯尼迪病。

32. 治疗具有 AR- 相关疾病的患者的方法，该方法包括 ：

(a) 若有的话，确定患者中或获自患者的样品中雄激素受体中位置 876 处的氨基酸，其中位置 876 根据 SEQ ID NO:54 的编号确定 ；

(b) 若有的话，将位置 876 处的氨基酸与野生型雄激素受体比较，其中不存在氨基酸或存在苯丙氨酸以外的氨基酸提示患者对 MDV3100 不敏感 ；

(c) 如果 876 处的氨基酸不是苯丙氨酸，施用不包括 MDV3100 的治疗 ；或者如果 876 处的氨基酸是苯丙氨酸，施用包括 MDV3100 的治疗 ；和

(d) 测定疾病进展或缓解。

33. 权利要求 32 的方法，其中 AR- 相关疾病是前列腺癌或乳腺癌。

34. 权利要求 32 的方法，其中 AR- 相关疾病是聚谷氨酸病、秃头症、良性前列腺增生、多毛症、痤疮、脊髓和肌肉萎缩症或肯尼迪病。

35. 测定细胞对 MDV3100 的敏感性的方法，该方法包括 ：

(a) 若有的话，确定细胞中雄激素受体中位置 741 和 877 处的氨基酸，其中位置 741 和 877 根据 SEQ ID NO:54 的编号确定 ；

(b) 若有的话，将位置 741 和 877 处的氨基酸与野生型雄激素受体比较，其中在位置 741 处不存在氨基酸或存在色氨酸 (W) 以外的氨基酸和在位置 877 处不存在氨基酸或存在苏氨酸 (T) 以外的氨基酸共同提示细胞对 MDV3100 不敏感。

36. 权利要求 35 的方法，其中细胞是前列腺癌细胞、乳腺癌细胞或其他 AR- 相关疾病细胞。

37. 权利要求 35 的方法，其中 AR- 相关疾病是聚谷氨酸病、秃头症、良性前列腺增生、多毛症、痤疮、脊髓和肌肉萎缩症或肯尼迪病。

38. 预测 AR- 相关疾病的患者对使用 MDV3100 的治疗的敏感性的方法，该方法包括 ：

(a) 若有的话，确定患者中或获自患者的样品中雄激素受体中位置 741 和 877 处的氨基酸，其中位置 741 和 877 根据 SEQ ID NO:54 的编号确定 ；

(b) 若有的话，将位置 741 和 877 处的氨基酸与野生型雄激素受体比较，其中在位置

741 处不存在氨基酸或存在色氨酸 (W) 以外的氨基酸和在位置 877 处不存在氨基酸或存在苏氨酸 (T) 以外的氨基酸共同提示患者对 MDV3100 不敏感。

39. 权利要求 38 的方法，其中 AR- 相关疾病是前列腺癌或乳腺癌。

40. 权利要求 38 的方法，其中 AR- 相关疾病是聚谷氨酸病、秃头症、良性前列腺增生、多毛症、痤疮、脊髓和肌肉萎缩症或肯尼迪病。

41. 治疗具有 AR- 相关疾病的患者的方法，该方法包括 ：

(a) 若有的话，确定患者中或获自患者的样品中雄激素受体中位置 741 和 877 处的氨基酸，其中位置 741 和 877 根据 SEQ ID NO:54 的编号确定 ；

(b) 若有的话，将位置 741 和 877 处的氨基酸与野生型雄激素受体比较，其中在位置 741 处不存在氨基酸或存在色氨酸 (W) 以外的氨基酸和在位置 877 处不存在氨基酸或存在苏氨酸 (T) 以外的氨基酸共同提示患者对 MDV3100 不敏感 ；

(c) 如果位置 876 处的氨基酸不是苯丙氨酸，施用不包括 MDV3100 的治疗 ；或者如果位置 741 和 877 处的氨基酸是苯丙氨酸，施用包括 MDV3100 的治疗 ；和

(d) 测定疾病进展或缓解。

42. 权利要求 41 的方法，其中 AR- 相关疾病是前列腺癌或乳腺癌。

43. 权利要求 41 的方法，其中 AR- 相关疾病是聚谷氨酸病、秃头症、良性前列腺增生、多毛症、痤疮、脊髓和肌肉萎缩症或肯尼迪病。

44. 治疗具有雄激素受体 (AR)- 相关疾病的患者的方法，其中 AR 的位置 876 处的氨基酸不存在或者不是苯丙氨酸，并且其中方法包括施用不包含 MDV3100 的治疗组合物的步骤。

45. 权利要求 44 的方法，其中不包括 MDV3100 的治疗组合物包括比卡鲁胺或 CDK4/6 抑制剂例如 LEE011 或 PD0332991，或者治疗性核酸。

46. 权利要求 41 的方法，其中 AR- 相关疾病是前列腺癌或乳腺癌。

47. 权利要求 41 的方法，其中 AR- 相关疾病是聚谷氨酸病、秃头症、良性前列腺增生、多毛症、痤疮、脊髓和肌肉萎缩症或肯尼迪病。

48. 治疗具有雄激素受体 (AR)- 相关疾病的患者的方法，其中 AR 的位置 741 和 877 处的氨基酸是苯丙氨酸，并且其中方法包括施用包括 MDV3100 的治疗组合物的步骤。

49. 权利要求 48 的方法，其中 AR- 相关疾病是前列腺癌或乳腺癌。

50. 权利要求 48 的方法，其中 AR- 相关疾病是聚谷氨酸病、秃头症、良性前列腺增生、多毛症、痤疮、脊髓和肌肉萎缩症或肯尼迪病。

51. 治疗具有雄激素受体 (AR)- 相关疾病的患者的方法，其中 AR 的位置 876 处的氨基酸不存在或者不是苯丙氨酸，并且其中方法包括施用包括 CDK4/6 抑制剂的治疗组合物的步骤。

52. 权利要求 51 的方法，其中 CDK4/6 抑制剂是 LEE011 或 PD0332991。

53. 权利要求 51 的方法，其中 AR- 相关疾病是前列腺癌或乳腺癌。

54. 权利要求 51 的方法，其中 AR- 相关疾病是聚谷氨酸病、秃头症、良性前列腺增生、多毛症、痤疮、脊髓和肌肉萎缩症或肯尼迪病。

55. 治疗具有雄激素受体 (AR)- 相关疾病的患者的方法，其中 AR 是野生型或者其中 AR 的位置 876 处的氨基酸不存在或者不是苯丙氨酸，并且其中方法包括施用包括 CDK4/6 抑制

剂的治疗组合物的步骤。

56. 权利要求 51 的方法，其中 CDK4/6 抑制剂是 LEE011 或 PD0332991。

57. 权利要求 51 的方法，其中 AR- 相关疾病是前列腺癌或乳腺癌。

58. 权利要求 51 的方法，其中 AR- 相关疾病是聚谷氨酸病、秃头症、良性前列腺增生、多毛症、痤疮、脊髓和肌肉萎缩症或肯尼迪病。

59. 权利要求 55 的方法，其中 CDK4/6 抑制剂抑制表达雄激素受体的细胞系的体外或者体内生长，其中雄激素受体的位置 876 处的氨基酸不存在或者不是苯丙氨酸。

60. 权利要求 59 的方法，其中生长抑制通过增殖速率、集落测定、显微测定和 / 或图像分析确定。

新的雄激素受体突变

发明领域

[0001] 本公开内容主要涉及可用于治疗雄激素受体 (AR) 相关病状例如前列腺疾病如前列腺癌 (PCa)、乳腺癌和多种其他疾病的组合物和方法。本公开内容更具体地涉及包含在 F876 处具有新的突变的雄激素受体或其片段或变体 [AR(F876)] 的组合物。该突变可用于分层患者、预测药物敏感性和设计治疗方案，因为它使得 AR 对一些治疗剂 (例如 MDV3100) 具有敏感性，而对其他 (例如，抗雄激素比卡鲁胺 (bicalutamide) 或 CDK4/6 抑制剂 LEE011 和 PD0332991) 不敏感。该 F876 突变甚至可以导致 MDV3100 的拮抗剂到激动剂的转换。本公开内容还涉及包含突变体 AR 的多肽、其抗体和编码该多肽的多核苷酸，所有这些均可用于鉴定新的 AR- 相关疾病的治疗。本公开内容还涉及 AR 中在位置 W741 和 T877 处的双突变，其也赋予对 MDV3100 的抗性。因此这些 AR 突变可用于患者分层和新的 AR- 相关疾病治疗剂的开发。本公开内容还涉及治疗 AR- 相关疾病的方法，其中 AR 具有 F876 或 W741/T877 突变。本公开内容还涉及包括组合疗法的治疗方法。

背景技术

[0002] 雄激素受体 (AR) 是与配体例如睾酮和二氢睾酮结合、然后移位至细胞核的受体。在此其起到 DNA- 结合转录因子的作用，调节基因表达和许多其他功能。

[0003] 在许多种疾病中已经涉及到 AR 的超量表达或突变，包括癌症，包括前列腺癌以及许多其他疾病。

[0004] 前列腺癌是世界上最常诊断出的癌症。Kawata 等人，The Prostate 70,745-754(2010) ；和 Jemal 等人 . CA 58,71-96(2008)。尽管局部肿瘤常常是可治愈的，但远处的转移在相当大部分的患者中发生。Scher 等人，Journal of clinical oncology 23,8253-8261(2005) ；和 Clegg 等人，Cancer Research72,1494-1503(2012)。包括外科或化学阉割的雄激素剥夺疗法最初是有效的 ；但是，几乎总是获得抗性，导致攻击性要强得多的肿瘤形式，其称作阉割抗性前列腺癌 (CRPC)。CRPC 是美国男性中第二常见的癌症相关死亡的原因 [Jemal 等人，CA:a cancer journal for clinicians 60,277-300(2010)]，目前不可治愈。CRPC 的保守特征是由于许多机制包括 AR 基因超量表达 / 扩增和 AR 基因突变造成的 AR- 信号传导的持续活性 [Chen 等人，Nature medicine 10,33-39(2004)]。Scher 等人，Journal of clinical oncology23,8253-8261(2005)。CRPC 中对 AR 信号传导的持续依赖导致开发出与雄激素竞争结合 AR 的配体结合袋的竞争性抑制剂。比卡鲁胺便是这类抗雄激素，其作为单一疗法或者与阉割结合已在临床上应用多年，以阻断雄激素作用。但是，在 CRPC 情形中，比卡鲁胺经历了拮抗剂到激动剂的转换，自相矛盾地促进 AR 信号传导活性。Culig 等人，British journal of cancer 81,242-251(1999)。

[0005] 近来，已经发现更加有效的抗雄激素 MDV3100(enzalutamide(恩杂鲁胺)，由 Astellas Pharma US,Inc.,Northbrook,IL, 和 Medivation Inc.,San Francisco,CA 作为 XTANDI® 上市) 缺少激动剂活性。Tran 等人，Science 324,787-790(2009)。基于令人信服的临床前和临床数据，MDV3100 已经被 FDA 许可用于治疗之前用多西紫杉醇

(docetaxel)治疗的患转移性CRPC的人。正在进行中的临床试验也在测试将MDV3100作为尚未被阉割的患有晚期前列腺癌的患者的单一疗法,以及作为诊断出患有前列腺癌但是尚未经历前列腺切除术的人的新辅助疗法。

[0006] 尽管MDV3100已经在临床试验中表现出极大的效力,但许多最初具有有利反应的人后来发展出对这一第二代抗雄激素的抗性。Kim等人,Current treatment options in oncology 13,189-200(2012)。

[0007] 因此,对于用于患者分层和预测对于前列腺癌、乳腺癌和其他AR-相关疾病的治疗的药物敏感性,存在对于新的组合物和方法的需求。另外还存在有对于AR-相关疾病的新的疗法的需求。

发明内容

[0008] 本公开内容的目的在于提供用于诊断、预后和治疗雄激素受体(AR)相关疾病例如前列腺疾病如前列腺癌(PCa)包括阉割抗性Pca(CRPC)和乳腺癌以及其他AR-相关疾病例如聚谷氨酸病、秃头症、良性前列腺增生、多毛症、痤疮、脊髓和肌肉萎缩症和肯尼迪病的工具和方法。本公开内容的该目标和其他目标通过以下所述的一个或多个实施方式提供。

[0009] 在多个方面,本公开内容涉及新的和临床相关的AR中的突变,即在位置F876处(根据SEQ ID NO:1或54的序列编号),这赋予对于治疗剂MDV3100的抗性,甚至导致对于该药物从拮抗剂到激动剂的转换。本公开内容还涉及患者分层方法,包括以下步骤:检测AR-相关疾病患者的细胞或组织样品中该突变的存在或不存在,和据此开处方并设计治疗方案。本公开内容还涉及治疗患有雄激素受体(AR)-相关疾病的患者的方法,其中AR的位置876处的氨基酸不存在或者不是苯丙氨酸,并且其中该方法包括施用包含CDK4/6抑制剂的治疗组合物。在多个实施方式中,CDK4/6抑制剂是LEE011或PD0332991,其可以用作AR-相关疾病的治疗剂。这包括其中AR包含F876突变的AR-相关疾病。此外,PD0332991、LEE011和其他的CDK4/6抑制剂可以用作针对其中AR是野生型的AR-相关疾病的治疗剂。具有F876突变的AR多肽、其抗体以及编码其的多核苷酸也可以用于筛选新的治疗剂。此外,在多个方面,本公开内容涉及AR中在位置W741和T877处的双突变(也根据SEQ ID NO:1的序列编码),本公开内容也显示其赋予对MDV3100的抗性。

[0010] 突变体雄激素受体(AR)多肽

[0011] 在多个方面,本公开内容涉及AR(F876),其为包括包含或跨越位置876的雄激素受体的多肽等或其片段或变体,其中位置876处的氨基酸被置换或缺失或者不是苯丙氨酸(F)(其中氨基酸的位置依据SEQ ID NO:54的编号)。在一些方面,位置876处的氨基酸被置换或缺失。在一些方面,位置876处的氨基酸是亮氨酸(L)。在多个方面,AR(F876)多肽或其片段或变体任选地在其他位置处包括一个或多个突变,使得位置877处的氨基酸不是苏氨酸(T),位置874处的氨基酸不是组氨酸(H),位置715处的氨基酸不是缬氨酸(V),并且/或者位置741处的氨基酸不是色氨酸(W)。

[0012] 在多个方式中,片段的长度为至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少15个、至少20个、至少25个、至少30个、至少35个、至少40个、至少50个、至少60个、至少75个、至少100或者至少150个、至少200个、至少250个、至少300个、至少350个、至少400个、至少450个、至少500个、至少550个、至少600个、至少650个、

至少 700 个、至少 750 个、至少 800 个、至少 850 和 / 或至少 900 个氨基酸。在多个实施方式中，AR(F876) 片段或变体保留在 F876 或 AR(F876) 处缺少突变的野生型（或“WT”)AR 的至少一种活性。

[0013] 在一方面，本公开内容提供分离的具有 SEQ ID NO:54 所示序列的 AR(F876) 多肽，或者其不同之处在于 SEQ ID NO:54 中不多于 50％的残基处的一个或多个氨基酸缺失、添加、插入或置换的变体，使得多肽保留 AR(F876) 的至少一种活性。

[0014] 在一方面，本公开内容提供分离的具有 SEQ ID NO:54 所示序列的 AR(F876) 多肽，或者其不同之处在于 SEQ ID NO:54 中不多于 1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％或 50％的残基处的一个或多个氨基酸缺失、添加、插入或置换的变体，使得多肽保留 AR(F876) 的至少一种活性。

[0015] 本公开内容的另一实施方式包括如上所述的分离的多肽，其中片段包括 SEQ ID NO:54 的至少 10 个连续氨基酸。

[0016] 本公开内容的另一实施方式包括如上所述的分离的多肽，其中片段包括 SEQ ID NO:54 的至少 15 个连续氨基酸。

[0017] 本公开内容的另一实施方式提供分离的多肽，其包括突变体雄激素受体或其片段，其中突变体雄激素受体的氨基酸序列如 SEQ ID NO:54 所示，其中所述序列在 SEQ ID NO:54 的氨基酸位置 876 处含有突变或者跨越上述氨基酸位置，使得位置 876 处的氨基酸被置换或缺失或者不是苯丙氨酸 (F)，其中任选地位置 877 处的氨基酸不是苏氨酸 (T)，位置 874 处的氨基酸不是组氨酸 (H)，位置 715 处的氨基酸不是缬氨酸 (V)，并且 / 或者位置 741 处的氨基酸不是色氨酸 (W)，并且其中片段的序列包括 SEQ ID NO:54 的至少 5 个连续氨基酸，并包括位置 876。

[0018] 本公开内容的另一实施方式提供如上所述的分离的多肽，其中片段包括 SEQ ID NO:54 的至少 10 个连续氨基酸。

[0019] 本公开内容的另一实施方式提供如上所述的分离的多肽，其中片段包括 SEQ ID NO:54 的至少 15 个连续氨基酸。

[0020] 在多个方面，本公开内容涉及 AR(F876)，其为包括雄激素受体的多肽等或其包括位置 876 的片段，其中位置 876 处的氨基酸不是苯丙氨酸 (F)。

[0021] 因此，在多个方面，本公开内容涉及包括在位置 F876 处具有突变（任选地在其他位置处具有一个或多个突突）的 AR 的多种多肽或其包括或跨越位置 F876 的片段或变体，其中多肽、片段或变体保持在位置处具有突变的 AR 的至少一种活性。

[0022] 检测 AR(F876) 和分层患者的方法

[0023] 在进一步的方面内，本公开内容提供检测患者中或来自患者的样品中的 AR 中在位置 F876 处存在或不存在突变的方法。AR 中 F876 处的突变是临床相关的，因为呈现该突变 AR 的患者不应当用 MDV3100 治疗，而应当用不包括 MDV3100 的治疗（例如比卡鲁胺或 CDK4/6 抑制剂例如 LEE011 或 PD0332991) 治疗。应当注意到，CDK4/6 抑制剂（例如 LEE011 和 PD0332991) 在治疗其中 AR 是野生型的 AR- 相关疾病的方法中也是有效的。对 CDK4/6 抑制的反应不仅仅限于作为不依赖于雄激素的 22Rv1 细胞的具有 F876L 的细胞——表达 WT AR 并能够保持 AR 信号传导并在 MDV3100 处理条件下表达 DHFR 和 TK1 的 PCa 系也表现出对 CDK4/6 抑制的强敏感性。这些数据累积地说明，靶向 CDK4/6 功能可以用作对于 MDV3100 的

抗性的多种机制的有效治疗策略，并且一般地可能是不依赖雄激素的。

[0024] 应注意到，样品内的细胞可以是异质的；一些可以表达 AR(F876)，而其他可以表达 WT（野生型）AR 和 / 或其他突变体 AR。在本文所述的多个方面，本公开内容涉及检测可以包括 AR(F876)、WT AR 和 / 或其他突变体 AR 的混合物的样品的 AR 中位置 F876 处的突变的方法。

[0025] 在多个方面，本发明提供检测来自患者的样品中 AR 多肽或多核苷酸中位置 F876 处的突变的方法，该方法包括以下步骤：(a) 自患者取得包括 AR 的样品；和 (b) 测定 AR 多核苷酸或多肽或其一部分的序列，以确定 AR 是否在位置 F876 处包括突变。该方法任选地涉及诊断、预后和 / 或治疗患者，并任选地还包括额外的步骤：(c) 如果 AR 在 F876 处不包括突变，施用或推荐施用包括 MDV3100 的治疗组合物；或者如果 AR 在 F876 处包括突变，施用或推荐施用不包括 MDV3100 的治疗组合物。在多个方面，不包括 MDV3100 的治疗组合物包括比卡鲁胺或 CDK4/6 抑制剂例如 LEE011 或 PD0332991，或者治疗性核酸。在多个方面，如果测定样品包括表达 AR(F876)、WT AR 和 / 或其他突变体 AR 的细胞的混合物，若干步骤可以是必需的，以攻击混合物内不同类型的细胞。此外，WT 和多种呈现突变体 AR 的细胞的比例可随着细胞亚种群被杀灭或可能由治疗激活而变化，并产生抗性克隆。因此，可以重复步骤 (a)、(b) 和 (c)。

[0026] 在多个方面，确定 AR 中位置 876 处的氨基酸是否是苯丙氨酸 (F) 的方法包括但不限于，尤其是，使用核酸测序，或使用对 AR(F876) 有特异性的抗体或核酸。

[0027] 在再其他的方面内，本公开内容提供检测样品中 AR(F876) 表达的方法，其包括：(a) 在足以允许核酸与样品中的核酸杂交的条件下使样品与对 AR(F876) 有特异性的核酸或其片段或变体接触足够长的时间；和 (b) 检测杂交的水平。

[0028] 另外还提供了调节细胞中增殖反应的方法，其包括使细胞与调节 AR(F876) 活性的活性剂接触的步骤。

[0029] 在其他方面中，提供了调节细胞分化的方法，其包括使细胞与调节 AR(F876) 活性的活性剂接触的步骤。

[0030] 本公开内容还提供了调节细胞存活的方法，其包括使细胞与调节 AR(F876) 活性的活性剂接触的步骤。

[0031] 因此，在多个方面中，本公开内容涉及多种检测 AR(F876) 和分层表达或不表达该多肽的患者的方法。

[0032] 在一方面，公开内容涉及测定细胞对 MDV3100 的敏感性的方法，该方法包括：(a) 若有的话，确定细胞中雄激素受体中位置 876 处的氨基酸，其中位置 876 根据 SEQ ID NO:54 的编号确定；(b) 若有的话，将位置 876 处的氨基酸与野生型雄激素受体比较，其中不存在氨基酸或存在苯丙氨酸以外的氨基酸表示细胞对 MDV3100 不敏感。一方面，细胞是前列腺癌细胞、乳腺癌细胞或其他的 AR- 相关疾病细胞。一方面，AR- 相关疾病是聚谷氨酸病、秃头症、良性前列腺增生、多毛症、痤疮、脊髓和肌肉萎缩症或肯尼迪病。

[0033] 一方面，公开内容涉及预测 AR- 相关疾病的患者对 MDV3100 治疗的敏感性的方法，该方法包括：(a) 若有的话，确定患者中或获自患者的样品中雄激素受体中位置 876 处的氨基酸，其中位置 876 根据 SEQ ID NO:54 的编号确定；(b) 若有的话，将位置 876 处的氨基酸与野生型雄激素受体比较，其中不存在氨基酸或存在苯丙氨酸以外的氨基酸表示患者对

MDV3100 不敏感。一方面，AR- 相关疾病是前列腺或乳腺癌。一方面，AR- 相关疾病是聚谷氨酸病、秃头症、良性前列腺增生、多毛症、痤疮、脊髓和肌肉萎缩症或肯尼迪病。

[0034] 一方面，公开内容涉及治疗具有 AR- 相关疾病的患者的方法，该方法包括 :(a) 若有的话，确定患者中或获自患者的样品中雄激素受体中位置 876 处的氨基酸，其中位置 876 根据 SEQ ID NO:54 的编号确定 ;(b) 若有的话，将位置 876 处的氨基酸与野生型雄激素受体比较，其中不存在氨基酸或存在苯丙氨酸以外的氨基酸表示患者对 MDV3100 不敏感 ;(c) 如果 876 处的氨基酸不是苯丙氨酸，施用不包括 MDV3100 的治疗 ;或者如果 876 处的氨基酸是苯丙氨酸，施用包括 MDV3100 的治疗 ;和 (d) 测定疾病进展或缓解。一方面，AR- 相关疾病是前列腺或乳腺癌。一方面，AR- 相关疾病是聚谷氨酸病、秃头症、良性前列腺增生、多毛症、痤疮、脊髓和肌肉萎缩症或肯尼迪病。

[0035] 检测 AR(W741/T8770) 和分层患者的方法

[0036] 在其他方面内，本公开内容还涉及位置 W741 和 T877 处的双突变 ;检测来自患者的样品中该双突变的方法 ;以及分层患者的方法，因为呈现该双突变的患者不应当用 MDV3100 或比卡鲁胺治疗，而应当用不包括 MDV3100 或比卡鲁胺的治疗来治疗。

[0037] 在多个方面中，本公开内容提供检测患者中 AR(W741/T877) 表达的方法，该方法包括以下步骤 :确定患者中雄激素受体或其片段的位置 741 和 877 处是否分别是色氨酸 (W) 和苏氨酸 (T)。在多个方面中，该方法还包括对患者推荐施用和 / 或施用以下的步骤 :(a) 如果位置 741 和 877 处的氨基酸分别是色氨酸 (W) 和苏氨酸 (T)，比卡鲁胺或 MDV3100 ;或者 (b) 如果位置 741 和 877 处的氨基酸不分别是色氨酸 (W) 和苏氨酸 (T)，比卡鲁胺或 MDV3100 以外的前列腺疾病治疗。作为非限定性的例子，不包括比卡鲁胺或 MDV3100 的治疗可以包括另一种治疗剂，例如 CDK4/6 抑制剂例如 LEE011 或 PD0332991，或者治疗性核酸。

[0038] 在多个方面中，本公开内容提供诊断、预后和 / 或治疗具有或疑似具有 AR- 相关疾病的患者的方法，其包括以下步骤 :自患者获得包含表达雄激素受体的细胞的生物样品 ;确定雄激素受体是否在位置 741 和 877 处包括双突变，使得位置 741 处的氨基酸不是色氨酸 (W)，并且 877 处的氨基酸不是苏氨酸 (T)，和 :如果雄激素受体在氨基酸位置 741 处包括色氨酸 (W) 并在位置 877 处包括苏氨酸 (T)，用包括比卡鲁胺或 MDV3100 的治疗来治疗患者，或者如果雄激素受体在氨基酸位置 741 处包括色氨酸 (W) 以外的氨基酸并在氨基酸位置 877 处包括苏氨酸 (T) 以外的氨基酸，用不包括比卡鲁胺或 MDV3100 的用于前列腺疾病的治疗来治疗患者。作为非限定性的例子，不包括比卡鲁胺或 MDV3100 治疗可以包括另一种治疗剂，例如 CDK4/6 抑制剂例如 LEE011 或 PD0332991，或者治疗性核酸。该公开内容还要注意到，CDK4/6 抑制剂也可以用于治疗其中 AR 是野生型的 AR- 相关疾病的方法中。还要注意到，包括多种活性剂和 / 或疗法的组合疗法可以用于治疗 AR- 相关疾病 (例如，比卡鲁胺和 / 或 LEE011 和 / 或 PD0332991 和 / 或其他本领域已知的治疗剂)。

[0039] 一方面，公开内容涉及确定细胞对 MDV3100 的敏感性的方法，该方法包括 :(a) 若有的话，确定细胞中雄激素受体中位置 741 和 877 处的氨基酸，其中位置 741 和 877 根据 SEQ ID NO:54 的编号确定 ;(b) 若有的话，将位置 741 和 877 处的氨基酸与野生型雄激素受体比较，其中在位置 741 处不存在氨基酸或存在色氨酸 (W) 以外的氨基酸和在位置 877 处不存在氨基酸或存在苏氨酸 (T) 以外的氨基酸一起表示细胞对 MDV3100 不敏感。一方面，细胞是前列腺癌细胞、乳腺癌细胞或其他 AR- 相关疾病细胞。一方面，AR- 相关疾病是聚谷

氨酸病、秃头症、良性前列腺增生、多毛症、痤疮、脊髓和肌肉萎缩症或肯尼迪病。

[0040] 一方面，公开内容涉及预测AR-相关疾病的患者对MDV3100治疗的敏感性的方法，该方法包括：(a)若有的话，确定患者中或获自患者的样品中雄激素受体中位置741和877处的氨基酸，其中位置741和877根据SEQ ID NO:54的编号确定；(b)若有的话，将位置741和877处的氨基酸与野生型雄激素受体比较，其中在位置741处不存在氨基酸或存在色氨酸(W)以外的氨基酸和在位置877处不存在氨基酸或存在苏氨酸(T)以外的氨基酸一起表示患者对MDV3100不敏感。一方面，AR-相关疾病是前列腺癌或乳腺癌。一方面，AR-相关疾病是聚谷氨酸病、秃头症、良性前列腺增生、多毛症、痤疮、脊髓和肌肉萎缩症或肯尼迪病。

[0041] 一方面，公开内容涉及治疗具有AR-相关疾病的患者的方法，该方法包括：(a)若有的话，确定患者中或获自患者的样品中雄激素受体中位置741和877处的氨基酸，其中位置741和877根据SEQ ID NO:54的编号确定；(b)若有的话，将位置741和877处的氨基酸与野生型雄激素受体比较，其中在位置741处不存在氨基酸或存在色氨酸(W)以外的氨基酸和在位置877处不存在氨基酸或存在苏氨酸(T)以外的氨基酸一起表示患者对MDV3100不敏感；(c)如果位置876处的氨基酸不是苯丙氨酸，施用不包括MDV3100的治疗；或者如果位置741和877处的氨基酸是苯丙氨酸，施用包括MDV3100的治疗；和(d)测定疾病进展或缓解。一方面，AR-相关疾病是前列腺或乳腺癌。一方面，AR-相关疾病是聚谷氨酸病、秃头症、良性前列腺增生、多毛症、痤疮、脊髓和肌肉萎缩症或肯尼迪病。

[0042] 因此，在多个方面，本公开内容涉及多种检测AR(W741/T877)和对表达或不表达该多肽的患者进行分层的方法。

[0043] 筛选新的治疗剂

[0044] 位置F876处的突变使得AR对MDV3100有抗性，甚至导致对于该药物从拮抗剂到激动剂的转换。因此，存在对于与AR(F876)相互作用并可用于治疗在AR中具有该突变的AR-相关疾病患者的新的治疗剂的需求。

[0045] 在其他方面内，本公开内容还提供筛选能够与AR(F876)相互作用的分子(例如，潜在的治疗剂)的方法，其包括以下步骤：(a)在足以允许候选分子和多肽相互作用的条件和时间下使候选分子与AR(F876)多肽接触；和(b)检测存在或不存在候选分子与多肽的结合和/或干扰或降低多肽的至少一种活性的能力。检测步骤可以，例如，包括使用AR(F876)和AR报道基因，例如，包括ARE[WT或AT(F876)结合的DNA序列]、启动子和报道基因(例如，荧光素酶)的多核苷酸。检测步骤可以包括，例如，确定候选分子是否干扰或降低AR(F876)驱动AR报道基因表达的能力。检测步骤可以包括，例如，亲和纯化步骤、酵母双杂交筛选或噬菌体展示文库筛选。

[0046] 在一些方面，新治疗剂的筛选方法涉及使用包括或跨越位置876处的氨基酸的AR(F876)多肽或其片段或变体。该多肽可以本领域已知的任何方法产生，包括由编码多肽的多核苷酸表达。

[0047] 本公开内容包括制造AR(F876)多肽的方法。

[0048] 本公开内容还在其他方面内包括制造AR(F876)多肽的方法，其包括以下步骤：(a)在允许表达AR(F876)多肽的条件下培养上述的宿主细胞；和(b)从宿主细胞培养物中分离AR(F876)多肽。

[0049] 本公开内容由此在多个方面中涉及用于筛选和开发新的治疗剂的组合物和方法，包括包含 AR(F876) 的多肽、包含 AR(F876) 的多肽的抗体和编码 AR(F876) 的多核苷酸。

[0050] 治疗方法

[0051] 在多个实施方式中，本公开内容涉及治疗 AR- 相关疾病的方法，其中 AR 具有本文所述的突变。

[0052] 在一个实施方式中，本公开内容涉及治疗具有雄激素受体 (AR)- 相关疾病的患者的方法，其中 AR 的位置 876 处的氨基酸不存在或者不是苯丙氨酸，并且其中该方法包括施用不包括 MDV3100 的治疗组合物的步骤。

[0053] 在多个实施方式中，不包括 MDV3100 的治疗组合物包括比卡鲁胺或 CDK4/6 抑制剂例如 LEE011 或 PD0332991，或者治疗性核酸。

[0054] 在一个实施方式中，本公开内容涉及治疗具有雄激素受体 (AR)- 相关疾病患者的方法，其中 AR 的位置 741 和 877 处的氨基酸是苯丙氨酸，并且其中该方法包括施用包括 MDV3100 的治疗组合物的步骤。

[0055] 在一个实施方式中，本公开内容涉及治疗具有雄激素受体 (AR)- 相关疾病患者的方法，其中 AR 的位置 876 处的氨基酸不存在或者不是苯丙氨酸，并且其中该方法包括施用包括 CDK4/6 抑制剂的治疗组合物的步骤。

[0056] 在多个实施方式中，CDK4/6 抑制剂是 LEE011 或 PD0332991。

[0057] 在多个实施方式中，AR- 相关疾病是前列腺癌或乳腺癌。在多个实施方式中，AR- 相关疾病是聚谷氨酸病、秃头症、良性前列腺增生、多毛症、痤疮、脊髓和肌肉萎缩症或肯尼迪病。

[0058] AR(F876) 多核苷酸

[0059] 在另一方面，本公开内容提供多核苷酸或反义多核苷酸，其包括具有以下序列和 / 或能够可检测地与以下序列杂交的至少 15 个连续核苷酸 (包括 0、1、2 或 3 个错配)，所述序列编码包括位置 876 的 SEQ ID NO:54 的至少 5 个连续氨基酸的序列，其中位置 876 处的氨基酸被置换或缺失，并且是苯丙氨酸 (F) 以外的氨基酸，其中杂交是在包括洗涤的条件下。这些多核苷酸可以用于编码 (例如，表达)AR(F876) 多肽，或者并入到治疗性核酸 [例如，AR(F876) 的 siRNA 或类似物] 中。

[0060] 本公开内容的另一实施方式提供分离的雄激素受体多核苷酸，其中分离的多核苷酸或其互补序列编码 SEQ ID NO:2 的至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 个连续氨基酸，其中至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 个连续氨基酸包括或跨越 SEQ ID NO:2 的位置 876，并且其中位置 876 处的氨基酸不是苯丙氨酸 (F)，并且其中任选地，位置 877 处的氨基酸不是苏氨酸 (T)，位置 874 处的氨基酸不是组氨酸 (H)，位置 715 处的氨基酸不是缬氨酸 (V)，并且 / 或者位置 741 处的氨基酸不是色氨酸 (W)。

[0061] 本公开内容的另一实施方式提供包括上述分离的雄激素受体多核苷酸的表达构建物 (或载体)。

[0062] 本公开内容的另一实施方式提供包括上述分离的雄激素受体多核苷酸的宿主细胞。

[0063] 本公开内容的另一实施方式提供多核苷酸，其编码包括 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的突变体雄激素受体，除了编码的突变体雄激素受体蛋白质在 SEQ ID NO:2 的位置 876

处含有亮氨酸 (L) 之外。

[0064] 本公开内容的另一实施方式提供构建物，其包括：启动子；和编码突变体雄激素受体或其片段的多核苷酸区段，其中雄激素受体的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示，其中所述序列在 SEQ ID NO:2 的位置 876 处含有突变，使得位置 876 处的氨基酸不是苯丙氨酸 (F)，并且其中，任选地，位置 877 处的氨基酸不是苏氨酸 (T)，位置 874 处的氨基酸不是组氨酸 (H)，位置 715 处的氨基酸不是缬氨酸 (V)，并且 / 或者位置 741 处的氨基酸不是色氨酸 (W)，并且其中片段的序列包括 SEQ ID NO:2 的至少 5 个连续氨基酸并包括位置 876，其中多核苷酸区段位于启动子的下游，其中多核苷酸区段的转录在启动子处起始。

[0065] 本公开内容的另一实施方式提供分离的多核苷酸，其中分离的多核苷酸或其互补序列编码 SEQ ID NO:54 的至少 10、15 或 20 个连续氨基酸，其中至少 10 个连续氨基酸包括 SEQ ID NO:54 的位置 876，并且其中位置 876 处的氨基酸被置换或缺失或者不是苯丙氨酸 (F)。

[0066] 本公开内容的另一实施方式提供包括包含启动子的构建体的宿主细胞；和本文所述的任意多核苷酸。

[0067] 因此，在多个方面，本公开内容涉及编码 AR(F876) 或其片段或变体的多核苷酸。

[0068] 当参考以下详述和附图时，本公开内容的这些和其他方面将会是显而易见的。本文公开的所有参考文献在此均全文并入作为参考，如同各自均单独并入。

附图说明

[0069] 图 1. 表征来自 LNCaP 细胞的 MDV3100- 抗性克隆。A，在补充有 10％ FCS（左上）、10％ CSS（右上）、10％ FCS+1 μM MDV3100（左下）和 10％ FCS+1 μM MDV3100+1nM R1881（右下）的 RPMI 培养基中生长的 LNCaP 细胞的相对比图像。B，所应用实验范例的图示（细节参见正文）。C，三组对照（棕色线）和用 MDV3100（顶部）和比卡鲁胺（底部）处理过的七种抗性克隆（绿色和红色）的单独（左）和平均（右）生长抑制曲线。数据表示成通过 CellTiter-Glo 测定法测量的相对于 DMSO 处理条件的百分比生长。D，在对照和抗性系中 AR 表达的 western 印迹分析。使用 β- 激动蛋白作为负载对照。E，对于在 10％ FCS 中生长的 C1-C3 和七种抗性克隆在基线下（停药 2 周后）的 AR 途径活性评分（米色条）。对于用 10 μM MDV3100 处理 24h 的 C1-C3 同样计算评分作为参照（绿色条）。使用由雄激素上调的基因用于分析。

[0070] 图 2. 抗性克隆基于对 MDV3100 的 AR 途径敏感性而分离。A，左，显示用 10 μM MDV3 处理 24h 时在对照（棕色字体），弱（红色）和强（绿色）抗性系中基因的差异表达的热谱。显示了至少一个样品组（对照、弱抗性样品和强抗性样品）平均倍数变化至少为 2(MDV 与 DMSO) 的探针集。右部所列的罗马数字显示差异表达基因的大致类别。中部，显示来自类别 III 的基因的 GO 途径富集分析产生的表格。蓝色阴影突出显示来自“AR 激活”基因集的基因的显著富集。右部，显示由途径分析加到显著性分数上的 AR 调节基因（蓝色箭头）相对位置的类别 III 的放大图。所有数据显示为 MDV vs.DMSO 处理的 log2 比例。B，在对照（左）、弱（中）和强（右）抗性系中用 10 μM MDV3100 处理 24h 时与第一级基因相比较在 AR 基因标签之间的相关性。绿线表示路径活性的水平——与黑色对角线的偏差越强表示途径活性受 MDV3100 处理的抑制越强。C，用 DMSO 或 MDV3100 处理 24h 的十个谱系中

典型 AR 靶基因表达的 qPCR 分析。数据表示为用 MDV3100 处理的样品相对于 DMSO 的表达百分比（在 100％下任意设定）。D,DMSO ;M,10 μM MDV3100。使用 TBP 对表达进行标准化。数据表示平均值 ±SEM ;n = 3。*P<0.05(Student's t- 检验）。D,对照 (C1,棕色）和用 DMSO、10 μM M MDV3100(MDV) 或 0.1nM R1881(R1881) 处理 24h 的抗性克隆 (#1,绿色）中内源性 AR 表达的细胞核比细胞质比例的定量。补充的图 S3 中所示的 western 印迹数据通过 ImageJ 分析，以确定比例。

[0071] 图 3. 全转录组测序分析在强抗性谱系和异种移植肿瘤中的 AR 中鉴定出新的 F876L 突变。A,上部,对照（棕色字体）、弱抗性（红色字体）和强抗性（绿色字体）中检测的体细胞突变的无偏分级聚类。灰色的线表示缺少突变 ;橙色的线表示单个复发杂合突变 ;红色的线表示复发杂合突变 ;绿色的线表示 AR 中的复发突变,如绿色箭头所示。下部,人雄激素受体的示意图。NTD, N- 端结构域 ;DBD, DNA- 结合结构域 ;LBD,配体结合结构域。F876L 突变的位点通过绿色的线和绿色字体表示。B,左部,显示在强抗性克隆中 AR 的外显子 8 中 F876L 突变的杂合性质的 IGV 图（通过绿色箭头表示）。F876L 突变与 LNCaP 中先前存在的纯合 T877A 突变（橙色阴影）相邻。右部,强抗性抗体中野生型 (WT,红色阴影）和突变体 (Mut,绿色阴影）AR 等位基因的原始计数。C,两种载体处理过（红色曲线）和四种 MDV3100 处理过（绿色曲线）的 LNCaP 肿瘤的肿瘤生长动力学。D,显示在 MDV3100 抗性肿瘤中促进 F876L 的核苷酸置换的相对位置和频率的 IGV 图。C1-C2,载体处理过的肿瘤 ; R1-R4, MDV3100- 抗性肿瘤。E,来自 IGV 图的表格总结数据。红色阴影表示具有 WT AR 的肿瘤,而绿色阴影突出显示具有 F876L 突变体 AR 的肿瘤。F,显示 LNCaP 肿瘤中 AR 靶基因 KLK3 和 NKX3-1 的相对表达的柱状图。红色条,来自表达 AR-WT 的肿瘤的表达数据 ;绿色条,来自具有 AR-F876L 的肿瘤的表达数据。

[0072] 图 4.F876L 突变在功能上赋予拮抗剂到激动剂的转换。A,野生型 (WT)AR（左）失活状态下的 MDV3100 对接模型和与突变体 AR（右）激活状态结合的 MDV3100 推测模型的比较。B,显示的在将 293T（顶部）和 VCaP（底部）细胞用多种 AR 表达构建物 (AR^{WT}, AR^{T877A}, AR^{F876L}, $AR^{F876L/T877A}$) 转染以及随后用载体 (Veh)、0.1nM R1881(R)、10 μM MDV3100(MDV)、10 μM 比卡鲁胺 (Bic)、10 μM MDV3100+0.1nM R1881(M/R) 或 10 μM 比卡鲁胺 +0.1nM R1881(B/R) 处理 24h 之后,标准化的 AR 报道基因活性的柱状图。所有数据均标准化为 Renilla 荧光素酶 (R_{LUC}) 表达。数据表示平均值 ±SEM ;n = 3。*P<0.001(Student's t- 检验）。C,用载体 (V)、10％ CSS 中的 0.1nM R1881、0.1nM R1881+10 μM MDV3100(MDV) 和 0.1nM R1881+10 μM 比卡鲁胺 (Bic) 处理 24 小时之后的对照系 (C1)、弱抗性（红色字体）和强抗性（绿色字体）克隆中的 KLK3 表达的 qPCR 分析。使用 TBP 对表达进行标准化。数据表示平均值 ±SEM ;n = 3。*P<0.05,**P<0.01(Student's t- 检验）。

[0073] 图 5. 改造成超量表达 AR-F876L/T877A 的 PCa 细胞在遗传上和表显型上对 MDV3100 有抗性。A,在多种改造谱系（载体对照 (Vec) ;T877A ;F876L/T877A, F876L ; W741C/T877A,W741C) 中 KLK3（顶部）和 NKX3-1（底部）表达的 qPCR 分析。在用 10％ FCS 中 DMSO（左）或 10 μM MDV3100（右）处理 24h 之前,所有谱系均用载体 (-) 或强力霉素 (+) 进行预处理。使用 TBP 对表达进行标准化。数据表示平均值 ±SEM ;n = 3。*P<0.05, **P<0.01(Student's t- 检验）。B,自在补充有 10％ CSS 的培养基中用 DMSO(D) 或 10 μM MDV3100(M) 处理的多种改造谱系分离的胞质和核部分中外源性 AR(HA) 表达的 western 印

迹分析。在用DMSO或MDV3100处理24h之前，所有谱系均用Dox预处理3天。F876L，F876L/T877A；W741C，W741C/T877A。进行β-微管蛋白（β-tub）和组蛋白H3(H3)探测，以分别验证胞质和核部分的纯度。C，用DMSO、1μM MDV3100(MDV)或1μM比卡鲁胺(BIC)处理3-4周的多种改造谱系(Dox-/+)的集落形成测定。显示出来自三组独立实验的代表性的实验。D，顶部，用DMSO（左边的孔）或10μM MDV3100（右边的孔，MDV）处理～14d的改造成表达AR-T877A（左）或AR-F876L/T877A（右）(Dox-/+)的集落形成测定法。底部，通过ImageJ进行的集落形成数据的定量。E，用载体(Veh)或30mg/kg MDV3100(MDV)处理的对照(C1，红色）和抗性克隆#1(#1，绿色）肿瘤的肿瘤体积测量。红色和绿色的实心箭头分别表示对照(C1)和克隆#1(#1)小鼠中开始每日施用MDV3100的那天。绿色虚线箭头突出显示了在30只用克隆#1(#1，深绿色）注射的小鼠中的15只中的药物假期之前用MDV3100治疗的连续两天。除#1veh(n＝2)以外，对于所有的组，n＝7-8肿瘤。数据表示平均值±SEM。F，显示生长明显的肿瘤的小鼠的百分比的柱状图（柱之上的数字表示呈现肿瘤的小鼠的数目）。G，在用载体(Veh)或MDV3100(MDV)处理的对照(C1)和抗性(#1)肿瘤中TMPRSS2和SLC45A3表达的qPCR分析。使用TBP对表达进行标准化。数据表示平均值±SEM；除载体处理的C1n＝2以外，对于所有的组n＝3。*P<0.05，**P<0.01(Student’s t-检验）。

[0074] 图6. 靶向CDK4/6降低了MDV3100-抗性前列腺癌细胞系的增殖。A，用DMSO(D)、10μM MDV3100(M)，10μM LEE011(L)或10μM MDV3100和10μM LEE011(M+L)处理24h时，C1和克隆#1谱系中的E2F1靶DHFR和TK1的qPCR分析。B，3组对照（棕色线）和用PD033299（顶部）和LEE011（底部）处理的7个抗性克隆（绿色和红色）的平均生长抑制曲线。数据表示成通过CellTiter-Glo测定测量的相对于DMSO处理条件的百分比生长。C，来自用DMSO、10μM MDV3100(MDV)、10μM比卡鲁胺(Bic)或10μM LEE011(LEE)处理28天的AR-T877A和AR-F876L/T877A谱系的集落形成测定的数据的相对定量（通过Image J定量）。D，用DMSO、10μM MDV3100(MDV)、10μM LEE011(LEE)或10μM MDV3100和10μM LEE011(MDV+LEE)处理48h的不依赖于雄激素的22Rv1谱系中的E2F1靶DHFR和TK1的qPCR分析。E，用多种所示的化合物(DMSO、比卡鲁胺(Bic)、MDV3100(MDV)或LEE011(LEE))处理14天的22Rv1细胞的集落形成测定。

[0075] 图7. 可以应用于靶向AR-F876L的治疗策略图示。左，MDV3100（棕色圆圈）抑制结合Ar-WT时（红色椭圆）E2F1和标准的AR靶基因的表达。中，AR-F876L（绿色椭圆）利用MDV3100作为激动剂，因此保持了E2F1和标准的AR靶基因的表达。右，用结构上不同的抗雄激素靶向CDK4/6或AR可以通过分别抑制E2F1和标准的AR靶基因来阻碍增殖。灰色箭头的长度表示路径活性的相对水平。红色和蓝色圆圈分别表示CDK4/6抑制剂和比卡鲁胺。EBS，E2F1-结合位点；ARE，雄激素反应性元件。

[0076] 图8. 弱和强抗性克隆表现出对MDV3100的部分抗性。用多种浓度（以黄色字体表示，μM）的MDV3100处理的对照1(C1，左）、强抗性克隆#1（中）和弱抗性克隆#14（右）的长期集落形成测定。

[0077] 图9. 强抗性克隆在用MDV3100处理时不能表现出对AR路径活性的调节。A，使用雄激素诱导的基因标签对于对照（聚集体）和抗性谱系进行聚类分析。使用来自雄激素诱导的基因标签的所有探针集匹配基因。所有表达数据均表示成MDV3100-处理的相对于DMSO-处理的样品中的平均倍数变化。B，表现当用10μM MDV3100处理24h时在对照（左）、

弱抗性（中）和强抗性（右）谱系中AR路径活性变化的路径富集分析。在对照（左）、弱抗性（中）和强抗性（右）谱系中当用10μM MDV3100处理24h时与第一级基因相比较AR基因标签之间的相关性。绿线表示路径活性的水平——与黑色对角线的偏差越强表示通过MDV3100处理的路径活性抑制越强。

[0078] 图10. 分离自用DMSO、0.1nM R1881或10μM MDV3100(MDV)处理24h的对照(C1)和强抗性克隆(#1)的胞质和核部分中AR表达的western印迹分析。进行β-微管蛋白和组蛋白H3探测，以分别验证胞质和核部分的纯度。二者还用作负载对照。

[0079] 图11. 分离自强抗性（克隆#1）和弱抗性（克隆#10）克隆的基因组DNA的Sanger测序痕迹图。箭头表示克隆#1中存在两种核苷酸。

[0080] 图12.AR中的W741C和W741L突变赋予对比卡鲁胺有特异性的拮抗剂到激动剂的转换。A，显示HEK293T细胞中多种AR构建物的瞬时转染之后AR的表达水平的western印迹分析。B，显示不用AR（左）或者用W741L（中）或W741C（右）突变体AR共转染之后的AR报道基因活性的柱状图。细胞用载体(Veh)、0.1nM R1881、10μM MDV3100(MDV)、10μM比卡鲁胺(Bic)、10μM MDV3100+0.1nM R1881(M/R)或10μM Bic+0.1nM R1881(B/R)处理。所有数据均标准化至Renilla荧光素酶(R_{LUC})表达。数据表示平均值±SEM；n＝3。**P<0.01(Student’s t-检验)。

[0081] 图13. 单独或者与T877A结合的F876L突变在PC3细胞中赋予对于MDV3100有特异性的拮抗剂到激动剂的转换。显示在PC3中用WT AR（左）、T877A(2^{nd})、F876L(3^{rd})或者用F876L/T877A（右）突变体AR共转染之后的AR报道基因活性的柱状图。细胞用载体(Veh)、0.1nM R1881、10μM MDV3100(MDV)、10μM比卡鲁胺(Bic)、10μM MDV3100+0.1nM R1881(M/R)或10μM Bic+0.1nM R1881(B/R)处理。所有数据均标准化至Renilla荧光素酶(R_{LUC})表达。数据表示平均值±SEM；n＝3。**P<0.05(Student’s t-检验)。

[0082] 图14. 改造成可诱导表达T877A（红色柱）、F876L/T877A（绿色柱）或W741C/T877A（蓝色柱）AR的LNCaP表现出适度的超量表达，如通过qPCR（顶部）和western分析（底部）所评价。-/+，分别是未处理的或用Dox处理过的。对于qPCR和western分析，分别使用TBP和β-肌动蛋白作为负载对照。数据表示平均值±SEM。

[0083] 图15. 在MDV3100的存在下，F876L/T877A突变体AR可以有效地挽救AR信号传导。在补充有10％FCS的RPMI 1640中用DMSO(Veh)、10μM MDV3100(MDV)、10μM比卡鲁胺(Bic)或10μM羟基氟他胺(OH-F)处理之后在多种改造的谱系（载体-米黄色柱；T877A-红色柱；F876L/T877A-绿色柱；W741C/T877A-蓝色柱）中KLK3表达的qPCR分析。-/+，分别是未处理的或用Dox处理过的。使用TBP对表达进行标准化。数据表示平均值±SEM；n＝3。**P<0.05，**P<0.01(Student’s t-检验)。

[0084] 图16.F876L/T877A突变体AR在雄激素耗尽的培养基中使用MDV3100作为激动剂。A，用在10％CSS中的DMSO(Veh)、0.1nM R1881(R1881)或10μM MDV3100(MDV)处理的多种改造谱系（载体-米黄色柱；T877A-红色柱；F876L/T877A-绿色柱；W741C/T877A-蓝色柱）中KLK3和NKX3-1表达的qPCR分析。-/+，分别是未处理的或用Dox处理过的。使用TBP对表达进行标准化。数据表示平均值±SEM；n＝3。**P<0.05，**P<0.01(Student’s t-检验)。B，用DMSO(Veh)、0.1nM R1881(R1881)或10μM MDV3100(MDV)处理24h的T877A和F876L/T877A改造谱系的胞质和核部分中外源性AR表达水平（用HA探测）的western

分析。进行 β-微管蛋白（细胞质蛋白质）和组蛋白 H3（细胞核蛋白质）探测，以验证多个部分的纯度。处理之前，将改造的谱系在 Dox 的存在下在 10% CSS 中培养 3-4 天。

[0085] 图 17. AR 中的 F876L 突变在 MDV3100 的存在下促进核易位。A，分离自在补充有 10% FCS 的培养基中用 DMSO(D) 或 10 μM MDV3100(M) 处理的多种改造细胞的胞质和胞核部分中外源性 AR(HA) 表达的 western 印迹分析。在用 DMSO 或 MDV3100 处理 24h 之前，所有谱系均用 Dox 预处理 3 天。F876L，F876L/T877A ；W741C，W741C/T877A。探测 β-微管蛋白（β-tub）以验证胞质部分的纯度，并探测组蛋白 H3(H3) 以验证细胞核部分的纯度。B，用 DMSO 或 10 μM MDV3100(MDV) 处理 24h 的 T877A（红色柱）、F876L/T877A（绿色柱）和 W741C/T877A（蓝色柱）超量表达谱系中外源性 AR 表达 (HA- 标记的 AR) 的细胞核 :细胞质比例。将图 5B 和板块 A 中表示的 western 印迹数据通过 ImageJ 进行分析，以确定细胞核 : 细胞质比例。在所示的培养条件 (10% FCS 或 10% CSS) 下用 DMSO 或 MDV3100 处理之前，将细胞用强力霉素处理 3 天。

[0086] 图 18. F876L/T877A 和 W741C/T877A 突变体 AR 赋予对 MDV3100 的表型抗性。A，用多至 10 μM 的渐增浓度的 MDV3100 处理的改造谱系产生的生长抑制曲线。Dox-，红色 ；Dox+，绿色。数据表示为通过 CellTiter-Glo 测定所测量的相对于 DMSO 处理条件的百分比生长。B，处理 10 天之后来自 A 的经 MDV3100 处理过的细胞的相对比图。标尺，50 μm。

[0087] 图 19. LNCaP 细胞中的 AR-F876L 超量表达足以驱动对 MDV3100 的遗传和表型抗性。A，显示在 DMSO 和 MDV3100 处理条件下表达 AR-WT（红色柱）和 AR-F876L（绿色柱）的 LNCaP 细胞中 AR 的下游靶基因 (KLK3、NKX3-1、SLC45A3、TMPRSS2) 的相对表达的分析。在用 DMSO 或 MDV3100 处理 24h 之前将细胞用 Dox(+) 处理 2 天。数据表示平均值 ±SEM。*P<0.05(Student's t- 检验）。B，显示在多种 MDV3100 浓度（以黑色字体标注，μM) 下表达 AR-F876L 的 LNCaP 细胞 (Dox+) 的持续生长的集落形成测定。

[0088] 图 20. 在 AR 中稳定表达 F876L 突变的 VCaP 细胞对 MDV3100 部分地有抗性。表达 AR-T877A 的 VCaP 细胞保留对 MDV3100 的敏感性（左），而 AR-F876L/T877A 的表达在 MDV3100 处理条件下导致部分生长（右）。数据表示平均值 ±SEM。*P<0.05(Student's t- 检验）。

[0089] 图 21. 具有 AR-F876L 变体的克隆的 MDV3100 处理在体外在雄激素耗尽的培养基中不能促进细胞生长。线图表示的是渐增浓度的 R1881（红色）、MDV3100（绿色）和比卡鲁胺（蓝色）处理对在补充有 10% CSS 的 RPMI 1640 中培养的细胞中细胞生长的影响。应用的最大剂量为 10nM R1881，对于 MDV3100 和比卡鲁胺为 10 μM。数据表示成相对于 DMSO 处理条件的细胞数目的倍数变化（通过 CellTiter-Glo 测定测量）。在分析之前将细胞处理 13 天。

[0090] 图 22. 对照 1 和克隆 #1 异种移植物的体重测量。A，对照 1，B，克隆 #1，异种移植物体重每周测量一次。数据表示成平均值 +SD。

[0091] 发明详述

[0092] 本公开内容涉及雄激素受体 (AR)- 相关疾病。本公开内容涉及雄激素受体中位置 F876 处的新的临床相关突变，其赋予对药物 MDV3100 的抗性，并可用于患者分层。包括该突变的雄激素受体及其片段和变体 [AR(F876)] 还可用于设计新的靶向该突变体受体的治疗。此外，在位置 W741 和 T877 处的双突变 AR 以及包括该双突变的片段和变体 [AR(W741/

T877)]也对MDV3100有抗性，并可用于患者分层。本公开内容因此在AR-相关疾病的预测、诊断和治疗中具有应用，例如前列腺疾病，例如前列腺癌(PCa)，包括阉割抗性Pca(CRPC)，和乳腺癌，以及其他疾病，例如聚谷氨酸病、秃头症、良性前列腺增生、多毛症、痤疮、脊髓和肌肉萎缩症或肯尼迪病。

[0093] 尽管前列腺癌是世界上最常诊断出的癌症之一，但科学家仍困扰于知识、资源和分析方法有限，其妨碍了1)前列腺癌的可靠诊断，2)区分良性与威胁生命的疾病的能力，和3)有效治疗已在雄激素耗尽疗法上复发的患者的能力。雄激素耗尽疗法，包括化学和外科阉割，在治疗雄激素依赖性PCa时最初是有效的。但是，大多数肿瘤复发成为进攻性强得多的不可治愈的PCa形式，其称作阉割抗性PCa(CRPC)。CRPC的恶性本质已促进了攻击性的活动，以加速可用作提高CRPC患者存活率的二线疗法的有效治疗剂的开发。出于该目的，基于CRPC持续依赖于AR-信号传导得以存活的知识，已经开发出与雄激素竞争结合AR的拮抗剂。成功是微乎其微的，因为1)化合物缺少效力，2)通过促进拮抗剂到激动剂的转换而发生CRPC的适应，使得化合物自相矛盾地增强AR信号传导。为了绕过这些限制，最近FDA许可更有效力的拮抗剂MDV3100(恩杂鲁胺(enzalutamide))，用于治疗之前用多西紫杉醇治疗过的患有转移性CRPC的人。在一些情形中，可以使用MDV3100作为单一疗法，即使是对于阉割抗性的前列腺癌。尽管该化合物已经在临床上表现出极大的疗效，许多最初有反应的患者后来发展出了抗性。缺乏对抗性机制的理解，并且这一先验的知识对于设计替代的治疗策略是至关重要的。出于该目的，本公开内容呈现的是对AR——MDV3100的直接靶标中新的突变的鉴定和表征，所述突变在遗传上和表型上赋予对MDV3100的抗性。

[0094] 为了阐明抗性的机制，本公开内容使用LNCaPs——之前用于鉴定赋予对比卡鲁胺的抗性的临床相关的W741突变的模型——来建立对于MDV3100有特异性的自发抗性模型。鉴定出两大类抗性克隆；在用MDV3100治疗时表现出对AR路径调节的敏感性或抗性的那些。令人激动的是，RNA-seq分析在AR中鉴定出新的F876L/T877A突变，其与对MDV3100的路径调节的抗性相关。与遗传改造谱系分析结合的反式激活测定确认了该突变促进对于MDV3100的拮抗剂到激动剂的转化——最终转化为表型抗性。有趣的是，本公开内容发现，该突变对于MDV3100的选择性很高，当用较旧的抗雄激素比卡鲁胺治疗时，再次使细胞敏化。这些结果可能具有极大的临床影响，因为1)突变可以用作生物标志物以预测药物反应，和2)呈现F876L/T877A突变的患者可以很容易地用比卡鲁胺治疗，以得到临床上的益处。

[0095] 出人意料地，本公开内容还发现，之前鉴定的W741C/T877A突变(之前显示出赋予对比卡鲁胺的抗性)也可以部分地赋予对MDV3100的表型抗性。无意拘泥于任何具体理论，本公开内容推测，这可能是双突变体AR获得组成上的活性功能时的间接效果。无论如何，当呈现该突变的患者不太可能受益于抗雄激素疗法时，这一发现可能具有转化的影响。而且，我们的工作强调了筛选前列腺癌中其他表征充分的突变以确定其赋予对MDV3100抗性的可能性——例如H874Y、V715M和L701H/T877A的突变已经表现出具有广谱的配体反应性，并且羟基氟他胺之前已经显示作为这些突变体的激动剂而发挥作用。

[0096] 本公开内容的发现将有可能促成多种病理状态的驱动突变的加速发现，其最终将会影响到治疗策略的开发和实施。本公开内容作出以下贡献：1)通过将高通量RNA-seq技术与自发抗性模型相结合，本公开内容鉴定出AR中在遗传上和表型上赋予对MDV3100抗

性——但仍保留比卡鲁胺敏感性的新的突变。这将有助于患者分层以及开发替代的治疗策略。2) 我们的自发谱系代表至少两种独立的抗性模型——用于对抗性机制的进一步问询而对 PCa 群体将具有重大价值的资源。3) 本公开内容表明，AR 的配体结合袋中抗性突变的保守特性将会赋予拮抗剂到激动剂的转化，与其他类别的化合物不相似。包括 AR(876) 的组合物也可以用于产生该多肽的抗体，并可以用于产生靶向该多肽并可用于治疗雄激素受体相关疾病，包括，尤其是，前列腺癌和乳腺癌的新的治疗剂。

[0097] 靶向 CDK4/6 作为克服 MDV3100 抗性的治疗策略

[0098] 已经确立 AR-F876L 可以在体外和体内在多种遗传背景下促进对 MDV3100 的抗性，我们接下来致力于开发合理的策略，以拮抗突变体等位基因。作为开发继续靶向 AR 的高突变配体结合袋的新的抗雄激素的替代 [Balbas 等人，2013eLife 2:e00499]，我们致力于鉴定在临床上可以更加持久的治疗策略。出于该目的，在用 MDV3100 处理的强抗性克隆中，除“AR 激活”以外，我们还观察到属于“细胞周期”和“E2F1 激活”基因集的基因的显著富集，表明这些克隆可以在 MDV3100- 处理条件下通过 E2F1 靶基因的持续表达潜在地保持增殖。这是有吸引力的假说，因为 G1-S 过渡的关键调节物雄激素信号传导已知促进活性 CDK4/ 细胞周期因子 D1 组装，因此激活 E2F1 功能。Schiewer 等人，2012End. Relat. Cancer 9:1-12。与该观念一致，我们发现 MDV3100- 处理在对照谱系中抑制 E2F1 靶基因 DHFR 和 TK1 的表达，证实 AR 信号传导是 E2F1 功能的调节物。相反，与对照谱系相比较，具有 F876 的细胞能够在 MDV3100- 处理条件下保持较高的 DHFR 和 TK1 表达（图 6A)。基于这些数据，我们推论 E2F1 活性可以起到 AR 信号传导的下游效应器的作用，因此，当导向 AR 的疗法变得无效时，E2F1 功能调节物可以起到关键治疗节点的作用。与该假设相符，我们发现，强抗性克隆（图 14B) 和改造成表达 AR-F876L/T877A（图 6C) 的 LNCaP 谱系的生长对于 CDK4/6 抑制剂 LEE011[Rader 等人，2013CDK4/CDK6inhibition is potently active in a definable subset of human neuroblastomas American Association for Cancer Research ;Philadelphia,PA.] 以及 PD0332991，和比卡鲁胺一样敏感。有趣的是，对 CDK4/6 抑制的反应不仅限于具有 F876L 的细胞，因为不依赖于雄激素的 22Rv1 细胞——在 MDV3100 处理条件下表达 WT AR 并能够保持 AR 信号传导以及 DHFR 和 TK1 表达的 PCa 谱系（图 6D)——也表现出对 CDK4/6 抑制的强敏感性（图 6E)。这些数据累积地表明，靶向 CDK4/6 功能可以用作对于 MDV3100 的抗性的多种机制的有效治疗策略，并且通常可能是不依赖雄激素的。

[0099] 定义

[0100] 为方便起见，以下提供说明书、实施例和所附权利要求中使用的一些术语和短语的含义。如果本说明书其他部分中术语的用法和本部分中提供的其定义之间有明显差异，以本部分中的定义为准。

[0101] 雄激素受体

[0102] “雄激素受体”或“AR”是指这样的基因或基因产物（例如，多肽），其也称作 NR3C4（核受体亚族 3，C 组，成员 4) 并且也称作以下符号 :AR ;AIS ;DHTR ;HUMARA ;HYSP1 ;KD ;NR3C4 ;SBMA ;SMAX1 ;和 TFM ; ;以及 External IDs OMIM:313700MGI:88064HomoloGene:28IUPHAR:NR3C4ChEMBL:1871。实例 AR 的多肽和核苷酸序列分别如 SEQ ID NO:1 和 2 所示。实例 AR(F876) 多肽序列如 SEQ ID NO:54 所示。

[0103] 雄激素受体是一类核受体 [Lu 等人，2006Pharmacol. Rev. 58:782-97]，其通过以下方式激活：结合细胞质中的雄激素睾酮或二羟睾酮 [Roy 等人，Vitam. Horm. 55:309-52]，然后易位至核中。雄激素受体与孕酮受体最密切地相关，较高剂量的孕激素可以阻断雄激素受体。Bardin 等人，1983Pharm. Ther. 23:443-59；和 Raudrant 等人，2003Drugs 63:463-92。雄激素受体的主要功能是作为调节基因表达的 DNA- 结合转录因子 [Mooradian 等人，1987Endocr. Rev. 8:1-28]；但是，雄激素受体还有其他的功能 [Heinlein 等人，2002. Mol. Endocrinol. 16:2181-7]。受雄激素调节的基因对于雄性性别表型的发展和维持是至关重要的。

[0104] 雄激素与雄激素受体的结合诱导受体的构象变化，导致热休克蛋白的解离、二聚以及细胞质到细胞核的转运，其中雄激素受体二聚体与特定的 DNA 序列结合——其称作激素反应元件或雄激素反应元件 (ARE)。取决于与其他核蛋白质的相互作用，AR 控制基因表达，增加或降低特定基因的转录，例如胰岛素样生长因子 I(IGF-1)。

[0105] 尽管在细胞质中有信号转导蛋白质，雄激素受体还可以具有细胞质活性。与细胞质雄激素受体结合的雄激素可以不依赖于基因转录而导致细胞功能的迅速变化，例如离子转运，和对基因转录的间接影响，例如经由介导其他的信号转导途径，从而影响其他转录因子的活性。

[0106] 雄激素受体序列和突变

[0107] 实例 AR 的氨基酸序列如下所示：MEVQLGLGRVYPRPPSKTYRGAFQNLFQSVREVIQNPGPQHPEAASAAPPGASLLLLQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQETSPRQQQQQQGEDGSPQHHRRGPTGYLVLDEEQQPSQPQSALECHPERGCVPEPGAAVAASKGLPQQLPAPPDEDDSAAPSTLSLLGPTFPGLSSCSADLKDILSEASTMQLLQQQQQEAVSEGSSSGRAREASGAPTSSKDNYLGGTSTISDNAKELCKAVSVSMGLGVEALEHLSPGEQLRGDCMYAPLLGVPPAVRPTPCAPLAECKGSLLDDSAGKSTEDTAEYSPFKGGYTKGLEGESLGCSGSAAAGSSSTLELPSTLSLYKSGALDEAAAYQSRDYYNFPLALAGPPPPPPPPHPHARIKLENPLDYGSAWAAAAAQCRYGDLASLHGAGAAGPGSGSPSAAASSSWHTLFTAEEGQLYGPCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGEAGAVAPYGYTRPPQGLAGQEADFTAPDVWYPGGMVSRVPYPSPTCVKSEMGPWMDSYSGPYGDMRLETARDHVLPIDYYFPPQKTCLICGDEASGCHYGALTCGSCKVFFKRAAEGKQKYLCASRNDCTIDKFRRKNCPSCRLRKCYEAGMTLGARKLKKLGNLKLQEEGEASSTTSPTEETTQKLTVSHIEGYECQPIFLNVLEALEPGVVCAGHDNNQPDSFAALLSSLNELGERQLVHVVKWAKALPGFRNLHVDDQMAVIQYSWMGLMVFAMGWRSFTNVNSRMLYFAPDLVFNEYRMHKSRMYSQCVRMPHLSQEFGWLQITPQEFLCMKALLLFSIIPVDGLKNQKFFDELRMNYIKELDRIIACKRKNPTSCSRRFYQLTKLLDSVQPIARELHQFTFDLLIKSHMVSVDFPEMMAEIISVQVPKILSGKVKPIYFHTQ(SEQ ID NO:1)

[0108] 若干要注意的氨基酸加以下划线：

[0109] W741，在许多比卡鲁胺抗性肿瘤中突变为 W741C/L。

[0110] H 874，在许多前列腺肿瘤中突变为 H874Y。

[0111] F 876，在此显示成突变的，例如，突变为 F876L。F876L 单突变体和 F876L/T877A 双突变体 AR 对于 MDV3100 具有极大的反式激活反应，表明了对 MDV3100 具有敏锐特异性的拮抗剂到激动剂的转换。

[0112] T 877，在许多晚期、氟他胺抗性肿瘤中突变为 T877A。

[0113] 其他已知在 AR 中发生的突变包括 V715 和本文及本领域之所述的其他突变。

[0114] 当前的工作鉴定了 F876L 突变，其与 T877A 相邻。

[0115] 本公开内容还对 W741C/T877A 突变进行了测试，发现该蛋白质的异位表达赋予对 MDV3100 的非特异性抗性。

[0116] 如本文所公开，这些突变可用于患者分层以及开发新的治疗剂。

[0117] 实例 AR 的核苷酸序列如下所示：ATGGAAGTGCAGTTAGGGCTGGGAAGGGTCTACCCTCGGC
CGCCGTCCAAGACCTACCGAGGAGCTTTCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGCGCGAACTGATCCAGAACCCGGGCCCC
AGGCACCCAGAGGCCGCGAGCGCAGCACCTCCCGGCGCCAGTTTGCTGCTGCTGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCA
GCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAAGAGACTAGCCCCAGGCAGCAGCAGCAGC
AGGGTGAGGATGGTTCTCCCCAAGCCCATCGTAGAGGCCCCACAGGCTACCTGGTCCTGGATGAGGAACAGCAACCT
TCACAGCCGCAGTCGGCCCTGGAGTGCCACCCCGAGAGAGGTTGCGTCCCAGAGCCTGGAGCCGCCGTGGCCGCCAG
CAAGGGGCTGCCGCAGCAGCTGCCAGCACCTCCGGACGAGGATGACTCAGCTGCCCCATCCACGTTGTCCCTGCTGG
GCCCCACTTTCCCCGGCTTAAGCAGCTGCTCCGCTGACCTTAAAGACATCCTGAGCGAGGCCAGCACCATGCAACTC
CTTCAGCAACAGCAGCAGGAAGCAGTATCCGAAGGCAGCAGCAGCGGGAGAGCGAGGGAGGCCTCGGGGGCTCCCAC
TTCCTCCAAGGACAATTACTTAGGGGGCACTTCGACCATTTCTGACAACGCCAAGGAGTTGTGTAAGGCAGTGTCGG
TGTCCATGGGCCTGGGTGTGGAGGCGTTGGAGCATCTGAGTCCAGGGGAACGGCTTCGGGGGGATTGCATGTACGCC
CCACTTTTGGGAGTTCCACCCGCTGTGCGTCCCACTCCTTGTGCCCCATTGGCCGAATGCAAAGGTTCTCTGCTAGA
CGACAGCGCAGGCAAGAGCACTGAAGATACTGCTGAGTATTCCCCTTTCAAGGGAGGTTACACCAAAGGGCTAGAAG
GCGAGAGCCTAGGCTGCTCTGGCAGCGCTGCAGCAGGGAGCTCCGGGACACTTGAACTGCCGTCTACCCTGTCTCT
CTACAAGTCCGGAGCACTGGACGAGGCAGCTGCGTACCAGAGTCGCGACTACTACAACTTTCCACTGGCTCTGGCCG
GACCGCCGCCCCCTCCGCCGCCTCCCCATCCCCACGCTCGCATCAAGCTAAAGAACCCGCTGGACTACGGCAGCGC
CTGGGCGGCTGCGGCGGCGCAGTGCCGCTSTGGGGACCTGGCGAGCCTGCATGGCGCGGGTGCAGCGGGACCCGGTT
CTGGGTCACCCTCAGCCGCCGCTTCCTCATCCTGGCACACTCTCTTCACAGCCGAAGAAGGCCAGTTGTATGGACCG
TGTGGTGGTGGTGGGGGTGGTGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGAGGC
GGGAGCTGTAGCCCCCTACGGCTACACTCGGCCCCCTCAGGGGCTGGCGGGCCAGGAAAGCGACTTCACCGCACCTG
ATGTGTGGTACCCTGGCGGCATGGTGAGCAGAGTGCCCTATCCCAGTCCCACTTGTGTCAAAAGCGAAATGGGCCCC
TGGATGGATAGCTACTCCGGACCTTACGGGGACATGCGTTTGGAGACTGCCAGGGACCATGTTTTGCCCATTGACTA
TTACTTTCCACCCCAGAAGACCTGCCTGATCTGTGGAGATGAAGCTTCTGGGTGTCACTATGGAGCTCTCACATGTG
GAAGCTGCAAGGTCTTCTTCAAAAGAGCCGCTGAAGGGAAACAGAAGTACCTGTGCGCCAGCAGAAATGATTGCACT
ATTGATAAATTCCGAAGGAAAAATTGTCCATCTTGTCGTCTTCGGAAATGTTATGAAGCAGGGATGACTCTGGGAGC
CCGGAAGCTGAAGAAACTTGGTAATCTGAAACTACAGGAGGAAGGAGAGGCTTCCAGCACCACCAGCCCCACTGAGG
AGACAACCCAGAAGCTGACAGTGTCACACATTGAAGGCTATGAATGTCAGCCCATCTTTCTGAATGTCCTGGAAGCC
ATTGAGCCAGGTGTAGTGTGTGCTGGACACGACAACAACCAGCCCGACTCCTTTGCAGCCTTGCTCTCTAGCCTCAA
TGAACTGGGAGAGAGACAGCTTGTACACGTGGTCAAGTGGGCCAAGGCCTTGCCTGGCTTCCGCAACTTACACGTGG
ACGACCAGATGGCTGTCATTCAGTACTCCTGGATGGGGCTCATGGTGTTTGCCATGGGCTGGCGATCCTTCACCAAT
GTCAACTCCAGGATGCTCTACTTCGCCCCTGATCTGGTTTTCAATGAGTACCGCATGCACAAGTCCCGGATGTACAG
CCAGTGTGTCCGAATGAGGCACCTCTCTCAAGAGTTTGGATGGCTCCAAATCACCCCCCAGGAATTCCTGTGCATGA
AAGCACTGCTACTCTTCAGCATTATTCCAGTGGATGGGCTGAAAAATCAAAAATTCTTTGATGAAGTTCGAATGAAC
TACATCAAGGAACTCGATCGTATCATTGCATGCAAAAGAAAAAATCCCACATCCTGCTCAAGACGCTTCTACCAGCT
CACCAAGCTCCTGGACTCCGTGCAGCCTATTGCAGAGAAGCTGCATCAGTTCACTTTTGACCTGCTAATCAAGTCAC
ACATGGTGAGCGTGGACTTTCCGGAAATGATGGCAGAGATCATCTCTGTGCAAGTGCCCAAGATCCTTTCTGGGAAA

GTCAAGCCCATCTATTTCCACACCCAGTGA(SEQ ID NO:2)

[0118] 与上述要注意的氨基酸(W 741、H 874、F 876和 T 877)对应的密码子加以下划线。

[0119] 其中:

[0120] TTC,在所有我们的抗性克隆中突变为CTC。

[0121] ACT,在许多晚期和氟他胺抗性肿瘤中突变为GCT。

[0122] AR突变

[0123] 本公开内容涉及包括F876处的突变和/或W741和T877处的双突变的全长雄激素受体或其片段或变体,其中任选地AR或其片段或变体可以包括额外的突变。

[0124] 如本文所定义,“突变”(例如AR的突变)可以包括氨基酸的缺失或置换。

[0125] 如本文所定义,AR的“片段”或“变体”包括源自AR的多肽或其缩短的形式。如本文所定义,“全长”AR包括包含整个AR序列的多肽,例如,包括SEQ ID NO:1或54所示的整个序列的多肽。AR片段包括,但不限于,包含小于全长序列(例如,小于SEQ ID NO:1或54所示者)、但保留至少一种由AR或AR突变体[例如AR(F876)]介导的活性的AR。变体是经修饰的片段或全长AR。这些修饰包括,但不限于,翻译后修饰(聚乙二醇化、糖基化、甲基化等)。

[0126] AR或片段的修饰还包括AR或片段与额外组分的组合,所述额外组分可以共价或非共价地连接。这些其他组分可以包括融合配偶体(例如Fc,如FcLALA),其形成融合多肽或融合蛋白质。

[0127] AR的片段或变体可以包括多种同种型的AR,和/或包括AR的一个或多个结构域。AR已知以两种同种型存在:AR-A(87kDa),其为N-端截短的并缺少第一个187aa(氨基酸),由于体外蛋白质水解。同种型AR-B为100kDa,是全长的。参见:Wilson等人,1994Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:1234-8;和Gregory等人,20012001.J.Mol.Endocrinol.27:309-19。

[0128] 如本文所公开,片段还可以包括“跨越”F876位置者。

[0129] AR的多种结构域包括N-端调节结构域(包括激活功能1,AF-1;激活功能5,AF-5;和二聚表面)、DNA结合结构域(DBD)、铰链区、配体结合结构域(LBD)和C-端结构域。例如,AR(F876)和AR(W741/T877)可以具有一个和多个结构域,条件是AR(F876)和AR(W741/T877)的序列分别包括位置F876或位置741和877。

[0130] 另外要注意到,雄激素受体突变包括具体氨基酸的缺失和置换。因此,AR(F876)是片段或全长AR或变体,其可以具有F876处的缺失;因此,在通常对应于F876的位置处没有氨基酸(例如,如SEQ ID NO:54所示)。因此,AR(F876)可以包括在875位置处直接与对应于位置877的氨基酸连接的氨基酸,跳过F876。在许多实施方式中,位置875和877处的氨基酸也可以任选地是突变的。

[0131] 因此,术语“AR(F876)”和“AR(W741/T877)”是指包括AR的任意全长、片段、变体或其他形式,其保留至少一种由AR介导的活性,并且分别包括F876处的突变或W741和T877处的双突变,其任选地包括额外的突变。

[0132] 本公开内容还涉及包括AR(F876)和AR(W741/T877)“多肽”、“多肽部分”、“蛋白质”等的组合物。术语“多肽”、“多肽部分”、“蛋白质”等在此可互换地使用,是指任何任意

长度的氨基酸残基的聚合物。聚合物可以是线性的或非线性的（例如，支化的），其可以包括修饰的氨基酸或氨基酸类似物，并且其可以被氨基酸以外的化学部分打断。术语也可以包括已经天然地或通过干涉修饰的氨基酸聚合物；例如，通过形成二硫键、糖基化、脂化、酰基化、磷酸化或任何其他的操纵或修饰，例如与标记组分或生物活性组分缀合。

[0133] 因此，本公开内容涉及包括 F876 处的突变或 W741/T877 处的双突变、并任选地包括其他突变的 AR 或其片段或变体，其可用于患者分层和 / 或产生用于治疗雄激素受体相关疾病的新的治疗剂。

[0134] WT 或突变体 AR 的活性

[0135] 在多个方面，AR 片段和 / 或变体或者突变 AR（例如 AR(F876) 和 / 或 AR(W741/T877) 保留全长 WT 或突变体多肽（例如，SEQ ID NO:1 或 54 的多肽）的至少一种活性。这些活性包括，但不限于：雄激素、睾酮和 / 或二氢睾酮；不能结合 MDV3100；结合配体时构象变化；热休克蛋白的解离；从细胞质转运至细胞核内；二聚；结合 DNA 的能力；与 DNA 中 HRE（激素反应元件）序列的序列特异性结合；调节基因转录；其他受体磷酸化中的作用；与细胞质中信号转导蛋白质的相互作用；全配体激活的转录活性的激活功能 1(AF-1)；负责激动剂诱导的活性的激活功能 2(AF-2)；和 / 或与 AKT1、BAG1、β - 连环蛋白、BRCA1、C-jun、钙调蛋白 1、小窝蛋白 1、CDK9、COX5B、CREB- 结合蛋白质、细胞周期蛋白 D1、依赖于细胞周期蛋白的激酶 7、死亡相关蛋白 6、在结肠直肠癌中缺失、EFCAB6、表皮生长因子受体、FOXO1、GAPDH、凝溶胶蛋白、GNB2L1、GSK3B、HDAC1、HSP90AA1、HTATIP、MAGEA11、MED1、MYST2、NCOA1、NCOA2、NCOA3、NCOA4、NCOA6、NCOR2、NONO、PA2G4、PAK6、PATZ1、PIAS2、PRPF6、PTEN、RAD9A、RANBP9、RCHY1、成视网膜细胞瘤蛋白、RNF14、RNF4、SART3、SMAD3、小异二聚体配偶体、Src、SRY、STAT3、SVIL、睾丸受体 2、睾丸受体 4、TGFB1I1、TMF1、TRIM68、UBE2I、UXT 和 / 或 ZMIZ1 的相互作用或者介导特异性免疫原性 [例如，AR(F876) 片段可以是长度足以模拟免疫原性或者可用于产生或引起与 AR 或 AR(F876) 的对应片段或序列结合的任意片段]。因此，例如，AR(F876) 片段是保持能够引起对全 AR(F876) 或其跨越 AR(F876) 的片段的序列有特异性的免疫反应的活性的任意片段。

[0136] AR 的至少一种此类活性被 AR 突变体、片段或变体例如 AR(F876) 或 AR(W741/T877) 保留，在下文中对其加以详述。

[0137] AR(F876)

[0138] 如本文所详述，AR 中出现 F876 突变与治疗过程中 AR 对 MDV3100 的反应钝化以及保持的增殖有关。AR 基因中复发的 F876L 突变在四种强抗性克隆（本文所述）中是保守的，并未发现于弱抗性克隆或对照细胞系中。F876 突变使得 AR(F876L) 使用 MDV3100 作为激动剂，与此相符，具有 F876L 的细胞在体内生长需要存在有 MDV3100。

[0139] MDV3100 抑制 AR 信号传导的机制已部分归因于其阻碍 AR 核易位的能力。Tran 等人，2009Science 324:787-90。F876 突变位于 AR 的配体结合结构域。为了评价 F876L 突变对 MDV3100 反应的潜在影响，我们用计算机建模了 MDV3100 与野生型 (WT) 和突变体受体的结合。我们发现，在 WT AR 的拮抗态的对接模型中，MDV3100 与 AR(F876) 仅表现出弱相互作用。但是，在存在 F876L 突变的情况下，MDV3100 的苯甲酰胺基序可以延伸至由更小的亮氨酸残基所产生的接入通道内。这将潜在地防止化合物与激动剂模式中 AR 配体结合结构域的螺旋 -12 相冲突。因此，计算机建模表明，AR 中的 F876L 突变可以消除 MDV3100 的

拮抗活性，并可以潜在地允许激动剂活性。

[0140] 如本文所定义，“AR(F876)”或“AR-F876”是包括包含或跨越位置 876 的雄激素受体或其片段或变体的多肽等，其中位置 876 处的氨基酸被置换或缺失，或者不是苯丙氨酸 (F)（其中氨基酸的位置依据 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:54 的编号）。如本文所定义，“AR(F876L)”或“AR-F876L”是包括包含或跨越位置 876 的雄激素受体或其片段或变体的多肽等，其中位置 876 处的氨基酸被亮氨酸 (L) 置换（其中氨基酸的位置依据 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:54 的编号）。

[0141] 因此，“AR(F876)”包括以下 SEQ ID NO:54 的全部或片段（其与 SEQ ID NO:1 相同，除 F876 用“X”提示外，表示在该位置处可以置换成 F 以外的任意氨基酸，或者该氨基酸可以缺失）。因此，在 AR(F876) 中，位置 X 可以是缺失的，或者可以是 F 以外的任意氨基酸。

[0142] AR(F876) 多肽序列的非限定性实例如下所示：

[0143] MEVQLGLGEVYPEPPSKTYRGAFQNLFQSVREVIQNPGPRHPEAASAAPPGASLLLLQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQQETSPRQQQQQQGEDGSPQAHRRGPTGYLVLDEEQQPSQPQSALECHPEGRCVPEPGAAVAASKGLPQQLPAPPDEDDSAAPSTLSLLGPTFPGLSSCSADLKDILSEASTMQLLQQQQQEAVSEGSSSGRAPEASGAPTSSKDNYLGGTSTISDNAKELCKAVSVSMGLGVEALEHLSPGEQLRGDCMYAPLLGVPPAVRPTPCAPLAECKGSLLDDSAGKSTEDTAEYSPFKGGYTKGLEGESLGCSGSAAAGSSGTLELPSTLSLYKSGALDEAAAYQSRDYYNFPLALAGPPPPPPPPPHPHARIKLENPLDYGSAWAAAAAQCRYGDLASLHGAGAAGPGSGSPSAAASSSWHTLFTAEEGQLYGPCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGEAGAVAPYGYTRPPQGLAGQESDFTAPDVWYPGGMVSRVPYPSPTVVKSEMGPWMDSYSGPYGDMRLETARDHVLPIDYYFPPQKTCLICGDEASGCHYGALTCGSCKVFFKRAAEGKQKYLCASRNDCTIDKFRRKNCPSCRLRKCYEAGMTLGARKLKKLGNLKLQEEGEASSTTSPTEETTQKLTVSHIEGYECQPIFLNVLEAIEPGVVCAGHDNNQPDSFAALLSSLNELGERQLVHVVKWAKALPGFRNLHVDDQMAVIQYSWMGLMVFAMGWRSFTNVNSRMLYFAPDLVFNEYRMHKSRMYSQCVR,RHLSQEFGWLQITPQEFLCMKALLLFSIIPVDGLKNQKFFDELRMNYIKELDRIIACKRKNPTSCSRRFYQLTKLLDSVQPIARELHQXTFDLLIKSHMVSVDFPEMMAEIISVQVPKILSGKVKPIYFHTQ(SEQ ID NO:54)

[0144] 因此，实例 AF(F876) 多肽或其片段或变体可以包括 SEQ ID NO:54 的子集，例如 ELHQXTFDLL(SEQ ID NO:20)、LHQXTF(SEQ ID NO:21)、HQXTFD(SEQ ID NO:22)、QXTFD(SEQ ID NO:23) 等，其中 X 是缺失的，或者是 F 以外的任意氨基酸。AR(F876) 多肽的其他非限定性例子包括那些包括例如 SEQ ID NO:3-53 中任意者的多肽，如本文所示。在多个实施方式中，片段可以介导 AR 的任意活性。

[0145] 术语“AR(F876)”还明确地包括在 F876 处缺失的 AR。因此：“跨越”是指突变体 AR 包括序列，使得位置 F876 处的氨基酸不存在或缺失。例如，包括“跨越”F876 的序列的突变体 AR 可以包括以下氨基酸序列，所述氨基酸序列尤其在位置 875 和 877 处包括氨基酸但在 F876 处不包括。在另一非限定性例子中，包括“跨越”F876 的序列的突变体 AR 可以包含包括 F876 的 1、2、3 或 4 个氨基酸的空隙；例如，突变体 AR 可以具有以下序列，其在位置 875 和 878 处包括氨基酸（缺少之间那些，包括 876 和 F877），或者在位置 874 和 877 处包括氨基酸（缺少之间那些，包括 875 和 876）。因此，实例 AR(F876) 多肽或其片段或变体可以包括，例如，ELHQ_T(SEQ ID NO:24)、LHQ_TF(SEQ ID NO:25)、HQ_TFD(SEQ ID NO:26) 或 Q_TFDL(SEQ ID NO:27) 等，其中“_”表示位置 F876 处氨基酸的缺失。

[0146] AR(F876) 可以包括额外的突变，例如在位置 T877 处。具体的 AR(F876) 包括以下

名称的那些，例如，“F876L”（“F876L AR”）或“F876L/T877A”（“F876L/T877A AR”），提示其具有位置 876 处的 F 到 L 的置换，或者位置 876 处的 F 到 L 的置换以及位置 877 处的 T 到 A 的置换两者。

[0147] 因此，AR(F876) 多肽、片段或变体可以包括 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列的子集，其中子集包括位置 876，其表示成“X”以提示在位置 876 处是苯丙氨酸 (F) 以外的任意氨基酸。因此，AR(F876) 多肽、片段或变体可以包括，但不限于并且尤其是，例如：

[0148]

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)

[0149] 备选地，因此，AR(F876) 多肽、片段或变体可以包括跨越位置 876 的序列，其中该位置处的氨基酸被缺失，在下文中表示成“_”。因此，AR(F876) 多肽、片段或变体可以包括，但不限于并且尤其是，例如：

[0150]

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)

[0151] 在一些实施方式中，除 F876 处的突变以外，AR(F876) 多肽、片段或变体还可以在一个或多个其他位置处包括突变。

[0152] 因此，在一些实施方式中，AR(F876) 多肽、片段或变体可以在 F876（在序列“XX”中由第一个“X”表示）和 T877（在序列“XX”中用第二个“X”表示）处均包括突变，如下。因此，AR(F876) 多肽、片段或变体可以包括，但不限于并且尤其是，例如：

[0153]

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)

[0154] 在一些实施方式中，AR(F876) 多肽、片段或变体可以在以下位置处包括突变：H874(在序列“XQXX”中用“X”表示)；F876(在序列“XQXX”中用第二个“X”表示)和T877(在序列“XQXX”中用第三个“X”表示)，如下。因此，AR(F876) 多肽、片段或变体可以包括，但不限于并且尤其是，例如：

[0155]

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)
LXQXXFDLLIK (SEQ ID NO: 52)
XQXXFDLLIKS (SEQ ID NO: 53)

[0156] 在多个其他实施方式中，AR(F876) 多肽、片段或变体可以包括F876处的置换或缺失，以及一个或多个其他突变、修饰等。AR(F876) 多肽、片段或变体可以包括置换和缺失突变的混合变异。

[0157] 其他AR突变体

[0158] 其他AR突变之前已得以说明。

[0159] W741突变，例如W741C在许多种比卡鲁胺抗性肿瘤中发生。Hara等人，Cancer Res.63:149-153(2003)。Taplin等人，J.Clin.Oncol.21:2673-2678(2003)；Haapala等人，Labor.Invest.81:1647-1651(2001)。本公开内容表明，该突变与T877处的突变也可以部分地赋予对MDV3100的表型抗性。无意拘泥于任何具体理论，本公开内容推测，这可能是由于双突变体AR获得组成活性功能的间接作用。

[0160] 已知H874突变，例如H874Y在许多种前列腺肿瘤中发生。

[0161] F876突变，例如F876L在此表现出导致对MDV3100的抗性。但是，呈现F876L/T877A突变的患者可以容易地用缺少MDV3100的治疗例如比卡鲁胺治疗，以得到临床上的益处。

[0162] 但是，要注意到W741C/L单个突变体是敏感的(至少如报道基因测定所测定)；但是，W741C/T877A AR变得有组成活性，并表现出表型抗性。

[0163] 已知T877突变，例如T877A在许多种晚期氟他胺抗性中发生。Fenton等人，Clin.

Cancer Res.3:1383-1388(1997);Taplin等人,Cancer Res.59:2511-2515(1999)。本公开内容显示W741和T877处的双突变也造成对MDV3100的抗性。

[0164] 其他的AR突变包括,例如,以下位置处的突变:L701(例如L701H)、V715(例如V715M)、Q902(例如Q902R)和A721(例如A721T)。Fenton等人,Clin.Cancer Res.3:1383-1388(1997)。一些突变位点已知是临床上相关的。例如,H874Y、V715M和L701H/T877A已经表现出具有广谱的配体反应性,并且之前已经显示氟他胺作为这些突变的激动剂而发挥作用。Fenton等人,Clin.Cancer Res.3:1383-1388(1997);Hara等人,Cancer Res.63:149-153(2003);Veldscholte等人,Biochem.31:2393-2399(1992);等人,Nature Med.6:703-706(2000)。T877A、T877S和H874Y突变体已知对于雌二醇和孕酮二者均具有相对于WT AR增加的反应。H874Y和T877S AR可以被尼鲁米特(nilutamide)激活。参见:Fenton等人,Clin.Cancer Res.3:1383-1388(1997)以及其中引用的参考文献。

[0165] 已知易于发生突变的位点有时称作“热点”。

[0166] 在患者分层和药物方案设计中,应当考虑到多种已知AR突变的已知作用、药物敏感性以及拮抗剂到激动剂的转换。

[0167] 同时,在一些情形中,对于特定的位置仅仅描述了一种置换,本公开内容设想任何氨基酸(或者在缺失的情形中,根本没有氨基酸)均可以在该位点处用于突变。因此,本公开内容设想在AR(F876)中任何F以外的氨基酸(或者根本没有氨基酸)均可以在位置F876处。优选的置换是那些表现出对MDV3100有抗性的能力的置换(例如,如F876L所示)。类似地,在W741/T877双突变中可以置换任何氨基酸(或者位置缺失),特别是如果双突变(类似于W741C/T877A)也赋予对MDV3100的抗性。

[0168] 以下进行对AR(F876)突变和W741/T877双突变的额外的说明和讨论。在这些上下中,本公开内容讨论了:AR(F876)突变的F876L例子是预先存在的还是反应于MDV3100获得的;W741C/T877A突变间接地赋予对MDV-3100的抗性;拮抗剂到激动剂的转换;和对MDV3100抗性的备选机制。

[0169] AR中响应于MDV3100治疗的热点突变

[0170] 在体外选择过程中相对迅速出现的F876L突变(图3A、B)最初表明,该突变可能以低频率预先存在。但是,在体内选择过程中两种独立的核苷酸置换均导致F876L突变这一事实(图3D和E)提示该突变可能是在治疗过程中获得的。由于LNCaP细胞在错配修复(MMR)机制中具有缺陷,发现缺陷也存在于PCa的子集中[Chen等人,2001Cancer Res.61:4112-21],可以想到的是它们可以更容易地获得这一突变(经或者不经MDV3100治疗)。但是,Balbas和同事(2013)也报道了在延长处理的据信具有完整MMR机制的谱系CWR22PC细胞时自发地出现F876L[Balbas等人,2013eLife 2:e00499]的这一事实表明F876L可能确实是热点突变,其可以具有在前列腺肿瘤中赋予抗性的能力无论MMR状态如何。

[0171] W741C/T877A突变间接地赋予对MDV3100的抗性

[0172] 以上要注意到,除AR(F876)以外,双突变AR(W741/T877)也赋予对MDV3100的抗性。

[0173] 尽管出人意料,本公开内容一致地发现,表达W741C/T877A AR虽然表达水平

比 F876L/T877A 等位基因强得多，也赋予对 MDV3100 的抗性表型。这一现象可能是由于 W741C/T877A 突变体 AR 获得组成上活性的特征的间接效应，支持了早先的报道。Hara, T. 等人，Cancer research 63, 149-153(2003)。尽管基因表达分析表明，在存在 MDV3100 的情况下，该突变可以比 T877A 突变体 AR 更加有效地挽救 AR 途径活性（图 5a），这可能不依赖于 MDV3100，因为该等位基因的异位表达可以在基线显著增强 AR 信号传导（图 15 和 16a，数据未示出）。作为对这一点的支持，本公开内容观察到，在雄激素耗尽的条件下，在基线下 W741C/T877A 突变体 AR 相对于 T877A AR 的更大的核定位。尽管核定位保持对 MDV3100 敏感—因治疗显著降低定位—在 MDV3100 治疗之后核 W741C/T877A 蛋白质的水平保持比 T877A AR 高，翻译为抗性程度更大。尽管抗性机制对于上述原因可能是间接的，但这仍是一项值得注意的观察结果，因为其将意味着，MDV3100 或其他的抗雄激素可能完全无效，和使用其他类别 AR 拮抗剂的“组合雄激素阻断”治疗或者与也靶向其他关键信号传导路径的活性剂的组合疗法在治疗具有 W741C/T877A 突变的肿瘤中可能更有效。

[0174] W741C/T877A 等位基因可以赋予对 MDV3100 的部分抗性这一出人意料的结果提示了筛选临床前列腺癌样品中 AR 中其他有据可查的突变的功能的必要性。Taplin, M. E. 等人，The New England journal of medicine 332, 1393-1398(1995)；Marcelli, M. 等人，Cancer research 60, 944-949(2000)；和 Culig, Z. 等人，Molecular endocrinology 7, 1541-1550(1993)。已经显示，若干突变例如 H874Y、V715M 和 L701H/T877A 具有广谱的配体反应性，并且之前已经显示羟基氟他胺作为这些突变体的激动剂而发挥作用。Fenton, M. A. 等人，Clinical cancer research:an official journal of the American Association for Cancer Research 3, 1383-1388(1997)；Hara, T. 等人，Cancer research 63, 149-153(2003)；Veldscholte, J. 等人，Biochemistry31, 2393-2399(1992)；和 Zhao, X. Y. 等人，Nature medicine 6, 703-706(2000)。因此，测试任一之前鉴定的 AR 突变是否也可以赋予对 MDV3100 的抗性，并且如果是这样的话，将这些突变与 F876L 结合以在临床设定中预测药物敏感性，在临床上非常重要。

[0175] 因此，测试在 AR 中的位置 876 处存在或不存在突变（例如，AR(F876)）的患者样品的分析也可以任选地测试在位置 741 和 877 处存在或不存在双突变（例如，AR(W741/T877)）。如本文所示，这些突变的存在或不存在对于患者分层和药物方案设计具有启示。

[0176] 拮抗剂到激动剂的转换和替代治疗策略

[0177] 本公开内容表明，AR(F876) 突变不仅导致对 MDV3100 的抗性，而且导致拮抗剂到激动剂的转换，其中表达 AR(F876) 的细胞在 MDV3100 的存在下生长得更好或者仅在其存在下生长。

[0178] 获得的对抗雄激素的抗性中循环的主题是出现可以最终利用小分子抑制剂作为激动剂的突变。T877A/S、W741C/L 和（本文所示的）F876L（图 15）分别促进了羟基氟他胺、比卡鲁胺和 MDV3100 的拮抗剂到激动剂的转换。这一点与其他类别的抑制剂例如靶向 BCR-ABL 的抑制剂观察到的抗性形成鲜明对比 [Gorre, M. E. 等人，Science 293, 876-880(2001)]，其中突变使得分子标对于治疗剂变得无反应。该转换对于抗雄激素是这样常见的特性这一事实表明，1) 要开发具有更好治疗指标的更强力的化合物，或者 2) 要寻求替代的治疗策略。为了解决第一点，Sawyers 和 Jung 最近开发出新一代抗雄激素 AFN-509，其表现得更强力，具有更高的治疗指数和更长的半寿期，所有这些均应翻译为

抗性更低。Clegg 等人，Cancer Res. 72:1494-1503(2012)。尽管治疗指数高，如果未来的研究鉴定出对 AFN-509 有特异性的赋予抗性的突变，则最可能应当寻求靶向 AR 的替代策略—由于 AR 中的突变不太经得起抗性的策略。一种这样的策略可以包括组合两种抗雄激素（组合或依序），以希望对二者均赋予抗性的突变的可能性大大降低。第二，例如开发 AR 特异性肽拮抗剂的策略可以用作可行的选择，所述策略 1) 阻断激活功能 2(AF2) 功能 [Gao, W. Current pharmaceutical design 16, 1106-1113(2010)]，或者 2) 以类似于表现出抑制 N- 端结构域激活的报道基因转录的 EPI-001 的方式，靶向 N- 端结构域。Gao, W. Current pharmaceutical design 16, 1106-1113(2010)；和 Andersen, R. J. 等人，Cancer cell 17, 535-546(2010)。备选地，也可以考虑使 AR 不稳定 / 降解的化合物而非妥协在 AR 中个别结构域的功能。

[0179] 已经显示 MDV3100 可以用作具有 F876L 突变的克隆中 AR 路径的激动剂，本公开内容接下来探讨该激动剂转换是否可以在雄激素耗尽的条件下增强细胞生长。有趣的是，尽管转换不能在体外驱动具有 F876L 的克隆的增殖，本公开内容观察到值得注意的依赖于 MDV 的体内生长。尽管 C1（对照 1）肿瘤在用 MDV3100 处理时表现出即刻的停滞，克隆 #1 肿瘤 [AR(F876)] 的生长实际上被 MDV3100 刺激，用 MDV 处理的 15 只小鼠中有 11 只呈现肿瘤，与之相比较，载体组中 15 只小鼠中 2 只呈现肿瘤。而且，克隆 #1[AR(F876)] 肿瘤在 MDV3100 的存在下持续生长，与较早的观察一致。总之，这些数据表明，F876L 突变可能通过允许突变体 AR 利用 MDV3100 作为激动剂而介导对 MDV3100 的遗传和表型抗性。在本文所述的多个实验中，载体是 DMSO。

[0180] 此外，我们在此显示 F876L 突变在遗传改造的 LNCaP 细胞中足以诱导对 MDV3100 的遗传和表型抗性。

[0181] AR(F876) 赋予抗性的作用可广泛适用于若干前列腺癌细胞系。人 VCaP（具有 TMPRSS2-ERG 融合和 AR 扩增）和小鼠 Myc-CaP（超量表达 Myc）谱系被转导成稳定地表达突变体 AR。与 LNCaP 细胞中观察到的抗性表型一致，两种谱系均也呈现对 MDV3100 的部分抗性。

[0182] 此外，我们显示，具有 AR(F876) 的细胞在体内阉割情形中对 MDV3100 有抗性。当具有 F876L 的细胞植入阉割的雄性小鼠中时，我们观察到体内生长对 MDV3100 的显著依赖。

[0183] 我们还显示，使用 CDK4/6 抑制剂 LEE011 和 PD033299，靶向 CDK4/6 是克服 MDV3100 抗性的治疗策略。

[0184] 本公开内容表明，LEE011 和 PD0332991 可以用作 AR 相关疾病的治疗剂。这包括其中 AR 包括 F876 突变的 AR 相关疾病。此外，PD0332991、LEE011 和其他的 CDK4/6 抑制剂可以用作针对其中 AR 是野生型的 AR 相关疾病的治疗剂。例如，如本文所示，在 MDV3100 处理条件下表达 WT（野生型）AR 并且能够保持 AR 信号传导和 DHFr 和 TK1 表达的 PCa 谱系也表现出对 CDK4/6 抑制的强敏感性。

[0185] 对 MDV3100 抗性的替代机制

[0186] 对于 MDV3100 已经提出两种抗性机制—导致不依赖于组成型配体的 AR 激活的剪接变体的表达 [Li, Y. 等人，Cancer research 73, 483-489(2013)]，和 PI3K 信号传导路径的激活。Mulholland, D. J. 等人，Cancer cell 19, 792-804(2011)；和 Carver, B. S. 等人，Cancer cell 19, 575-586(2011)。但是，在我们的工作中，弱抗性克隆（无 F876L）并

未表达截短的AR同种型（数据未示出），并持续表现出基线PI3K活性（数据未示出），表明无一是这些克隆中抗性的重要机制。对此支持的是，在LNCaP细胞中变体V7——在CRPC患者中高度表达的AR的临床相关同种型——的异位表达不能赋予对MDV3100的表型抗性，尽管在AR信号传导方面有强的援救（数据未示出），支持了早期的研究。Watson,P.A. 等人，Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 107,16759-16765(2010)。考虑到本文所示的数据，但无意拘泥于任何具体理论，本公开内容与以下观念一致，即缺少F876L等位基因的克隆采用的抗性机制有可能驱动对抗雄激素的普遍抗性（基于对MDV3100的特异性的缺乏）。可能的是，这些克隆独特的突变，例如之前显示出在前列腺癌中驱动阉割抗性生长的激酶酪氨酸激酶BMX中的突变[Dai,B. 等人，Cancer research 70,5587-5596(2010)]，可以潜在地起到普遍抗性驱动器的作用。探讨通过RNA-seq分析鉴定的其他突变的潜在作用的后续工作正在进行中。

[0187] 概括起来，本公开内容牢牢确立了F876L/T877A等位基因作为保持对比卡鲁胺的敏感性的MDV3100遗传和表型抗性的驱动器。临床意义是很深远的；1）突变可以用作预测患者中药物敏感性的生物标记物，和2）呈现该突变的患者可以备选地用比卡鲁胺治疗，以实现临床上的益处（图7）。

[0188] 因此，本公开内容表明，AR(F876)突变和AR(W741/T877)双突变二者都是临床上相关的，赋予对MDV3100的抗性，在多种AR-相关疾病的治疗过程中可以用于患者分层和药物方案设计，在下文中将对此加以更详尽的讨论。

[0189] 雄激素受体相关疾病

[0190] 在若干种疾病中已经提示雄激素受体的超量表达和/或更多变异，例如癌症，包括前列腺癌和乳腺癌，以及其他疾病，例如聚谷氨酸病、秃头症（例如，雄激素源性脱发）、良性前列腺增生、多毛症、痤疮、脊髓和肌肉萎缩症或肯尼迪病。参见：Sawaya 等人，J.Cutaneous Med.Surg.3:9-15(1998)；Schmidt 等人，Gyn.Obstet.Invest.22:206-211(1986)；Giovannucci 等人，Prostate 39:130-134(1999)；Amato 等人，Neurology 43:4791(1993)；Ferlini 等人，Am.J.Med.Gen.55:105-111(2005)；Monks 等人，PNAS November 2 2007；Hillmer Am.J.H.Genet.77:140-148(2005)；WO2012/065051 和US 2010/0022632以及其中引用的参考文献。

[0191] 以下对AR-相关疾病例如前列腺疾病和乳腺癌进行更详尽的说明。

[0192] 雄激素受体相关疾病：前列腺疾病

[0193] “前列腺”是指在膀胱根部围绕雄性尿道的肌肉腺体组织。前列腺是非必要的器官。前列腺有助于产生并贮存精液。在成年男性中，通常前列腺为大约3厘米长，大约20克重。其位于骨盆中，在膀胱下，直肠前。前列腺围绕着部分尿道，在排尿时从膀胱运送尿以及在射精时运送精液的管道。前列腺含有许多小的腺体，其产生构成精液的液体的大约20％。

[0194] “前列腺”疾病是指任何影响前列腺的疾病，例如，良性前列腺增生(BPH)、前列腺炎和前列腺癌(PCa)，包括阉割抗性PCa(CRPC)。前列腺疾病有时会造成例如尿频、夜尿（夜间排尿增多）、难以开始和保持稳定的尿流、血尿（尿中的血）和排尿困难（尿痛）的症状。许多前列腺疾病的受害者不表现出症状。

[0195] 前列腺疾病包括良性前列腺增生(BPH)，尽管AR在BPH中的确切作用尚未

解 决。Chatterjee Mol.Cell.Biochem.253:89-101(2003)；和 Ho 等 人，Nat.Rev.Urol.8:29-41(2011) 以及其中引用的参考文献。BPH 是前列腺的大小增加，引起尿路梗阻，导致尿失禁。其发生于几乎 80％到 80 岁的男性中。BPH 常常用前列腺经尿道切除术 (TURP) 手术治疗。这一方法非常常见：在美国每年进行 500,000 例 TURP，BPH 是男性手术的第二大常见原因。不幸的是，TURP 的副作用是射精管和阴茎神经束的消除，在 90％的患者中导致阳痿。治疗 BPH 的药物疗法目前目标在于放松前列腺平滑肌（α_1阻断）和减小前列腺体积（雄激素抑制）。已进行了临床试验，对用于治疗 BPH 的 α_1阻断剂、抗雄激素和 5-α 还原酶抑制剂进行评价。5-α 还原酶抑制剂非那雄胺 (finasteride) 已经在大多数患者中表现出导致增殖的前列腺消退的能力。Mocellini 等人，(1993)Prostate 22:291；和 Marberger(1998)Urology 51:677-86。

[0196] 另一种前列腺疾病是前列腺炎。前列腺炎是前列腺炎症。术语前列腺炎是指前列腺组织的组织学炎症。与所有形式的炎症类似，它可以与身体对感染的适当反应有关，但其也在不存在感染的情况下发生。

[0197] “前列腺癌”或“PCa”等是指在前列腺中发生的癌症形式。雄激素受体与前列腺癌有关联。“癌症”是指表现出相对自治生长的细胞的异常存在，使得其表现出异常生长表型，特征在于细胞增殖控制的重大丧失。一种 PCa 是阉割抗性 PCa(CRPC)。

[0198] 本发明一实施方式包括治疗前列腺癌的方法。

[0199] 尽管有一些病例是攻击性的，多数前列腺癌是生长缓慢的。癌细胞可以从前列腺转移至身体的其他部分，例如骨头或淋巴结。前列腺癌可以导致疼痛、排尿困难、性交过程中的问题和 / 或勃起功能障碍。

[0200] 前列腺癌的存在可以通过症状、体格检查、前列腺特异性抗原 (PSA) 或活组织检查指出。

[0201] 前列腺癌中已经指示出许多不同的基因，包括雄激素受体、BRCA1 和 BRCA2、HPC1、维生素 D 受体和 TMPRSS2-ERG 和 TMPRSS2-ETV1/4。涉及的肿瘤抑制基因包括 P53、PTEN 和 KAI1、E- 钙粘着蛋白和 CD44。

[0202] 前列腺癌是腺癌或腺体癌，其始于分泌正常精液的前列腺细胞突变成癌细胞时。最常见腺癌的前列腺区域是外周区。最初，小丛的癌细胞保持局限于否则正常的前列腺，这一情况称作原位癌或前列腺上皮内瘤 (PIN)。随着时间推移，这些癌细胞开始繁殖，并扩散至环绕前列腺组织（基质），形成肿瘤。最终，肿瘤可以生长得足够大，侵入附近的器官例如精囊或直肠，或者肿瘤细胞可以发展出在血流和淋巴系统中行进的能力。前列腺癌被视作是恶性肿瘤，因为它是可以侵入身体其他部分的大量细胞。这种器官的侵入称作转移。前列腺癌最常见地转移至骨、淋巴结，并且可以侵入直肠、膀胱和输尿管下段。

[0203] 在若干种其他疾病包括乳腺癌中指示有雄激素受体的超量表达和 / 或突变。

[0204] 雄激素受体相关疾病：乳腺癌

[0205] 雄激素受体频繁地表达于原发性乳腺癌中；取决于乳腺癌的研究和同种型，表达推测在大约 50％至 90％。参见：Birrell 等人，J.Steroid Biochem.Mol.Biol.52:459-467(1995)；Moinfar 等 人，Cancer 98:703-711(2003)；Buchanan 等人，Cancer Res.65:8487-8496(2005)；Doane 等 人，Oncogene25:3994-4008(2006)；和 Gonzalez-Angulo 等人，Clin.Cancer Res.15:2472-2478(2009)。但是，AR 是否起到肿瘤

抑制剂或致癌基因的作用尚不清楚。这种多功能作用可以部分地用 AR 已经报道与之相干的多种路径解释，但也可以从以下代谢的观点解释，即雄激素处于可以具有相反功能的孕激素和雌激素合成路径之间。Iacopetta 等人，Drug Disc. Today:Disease Mech. (2012)。

[0206] 若干信号传导机制均有助于乳腺癌中的 AR 功能。据报道 AR 通过三种方式施加其影响：(i) 基因组信号传导，其中 AR 相互作用并直接控制 DNA 中编码的基因的表达；(ii) 非基因组信号传导，其中核受体经由与其他蛋白质的相互作用传导信号，并且存在有两种信号传导机制之间的串扰，但尚未对此有充分理解；和 (iii) 经由与生长因子和细胞因子串扰而传导信号。参见：Rahman 等人，Trends Endocrin. Metab. 18:371-378(2007)；和 Iacopetta 等人，Drug Disc. Today:Disease Mech. (2012)。

[0207] AR 在雌激素受体 (ER) 阳性和阴性肿瘤中均具有潜在的临床益处。与 ER 相比较，AR 含有与在人乳腺癌中其变更作用相关的独特的功能结构域。大多数 ER- 阳性肿瘤表达 AR，而且相当大百分含量的 ER- 阴性肿瘤可以受益于 AR 和 ErbB2/HER2 致癌基因的组合靶向。AR 的信号传导下游也可以影响许多临床上重要的路径，所述路径也是乳腺癌中出现的临床靶标。AR 表达也可以在肿瘤发展到转移性疾病的过程中发挥作用。综述请参见 Iacopetta 等人，2012. Drug Disc. Today:Disease Mech。

[0208] 在一些研究中，雄激素受体在 60％至 85％的乳腺癌中表达，并且在一些情形中，它比雌激素受体 (ER) 或孕酮受体 (PR) 得到更高的表达。此外，流行病学研究发现，高循环雄激素水平与发生乳腺癌风险增加有关，特别是在绝经后妇女当中。雄激素在乳腺中的生物作用没有得到完全理解，因为尚不清楚雄激素对乳腺细胞的作用主要是增殖性的还是抗增殖性的。最近，已经探讨了雄激素对乳腺癌细胞系的影响以及雄激素受体路径在乳腺癌中的潜在作用。结果提示雄激素受体刺激和路径激活在乳腺癌中有可能的抗增殖作用。

[0209] 最近有关注于评价雄激素受体在浸润性乳腺癌的分子上界定的类别之间的表达，特别是在三阴性（或基底样）和 HER2 组之间，其被视为是激素受体阴性的。但是，对与分子表型相关的或者是原位导管癌妇女之间的雄激素受体表达进行考察的基于大规模人群的研究是缺乏的。因此，本公开内容的目的是使用充分表征的大规模乳腺癌妇女人群检查与肿瘤阶段、病理学特征和分子表型有关的雄激素受体表达。参见 Collins 等人，2011Mod. Pathol. 24:924-931 以及其中引用的参考文献。

[0210] Collins 等人，2011 Mod. Pathol. 24:924-931 还发现，总体上 77％的浸润性乳腺癌是雄激素受体阳性的。在 2,171 浸润性癌当中，64％是腔 (luminal)A，15％是腔 B，6％是 HER2，11％是基底样。雄激素受体表达的频率在分子表型之间变化显著 ($p<0.0001$)。特别地，雄激素受体表达通常在腔 A(91％) 和 B(68％) 癌症中观察到，但在 HER2 癌症 (59％) 中较不频繁。尽管定义为不存在雌激素和孕酮受体表达并视作是无激素反应的，32％的基底样癌表达雄激素受体。在 246 例原位导管癌当中，86％是雄激素受体阳性的，但是雄激素受体表达的频率在分子表型之间显著不同 ($p = 0.001$)，与级别较低的损伤相比较，高核级别损伤不太可能是雄激素受体阳性的。

[0211] 已经提出将 MDV3100 作为至少一些类型的乳腺癌的可能的治疗剂。Naderi 等人，Breast Cancer Res. 13:R36(2011)。因此，本公开内容暗示有可能将该药物用于治疗该类型的 AR- 相关疾病，因为具有表达 AR(F876) 或双突变 AR(W741/T877) 的样品的乳腺癌患者可能对 MDV3100 有抗性。

[0212] 因此，在若干种疾病中已经指示雄激素受体的超量表达和/或更多变异，例如癌症，包括前列腺癌和乳腺癌，以及其他疾病，例如聚谷氨酸病、秃头症（例如，雄激素源性脱发）、良性前列腺增生、多毛症、痤疮、脊髓和肌肉萎缩症或肯尼迪病。

[0213] 因此，本公开内容涉及包括F876处的突变或W741/T877处的双突变，任选地包括其他突变的AR或其片段或变体，其可用于患者分层和/或产生新的用于治疗雄激素受体相关疾病例如上文所列者的治疗剂。这些突变在患者分层和治疗中的应用在下文中加以详述。

[0214] 雄激素受体相关疾病的治疗

[0215] 本公开内容涉及雄激素受体中的突变，其可用于诊断、预后和治疗AR-相关疾病。这些突变的存在或不存在可以用于在许多种不同类型的疾病治疗中进行决定。

[0216] 这些治疗可用于抑制细胞的增殖并减轻个体的疾病。治疗可以有效量或治疗量递送。

[0217] 如本文所用，“治疗”是用于获得有益或所需的临床结果的方法，包括，但不限于，抑制前列腺细胞的增殖。出于本发明的目的，有益或所需的临床结果包括，但不限于，减轻症状，减少疾病的程度，疾病状态的稳定（即不恶化），防止疾病扩散（即转移），延迟或减缓疾病进展，改善或减轻疾病状态，提高生活质量，和缓解（无论是部分或全部），无论是可检测的还是不可检测的。“治疗”还可以意为与如果不接受治疗的预期存活相比延长存活。例如，治疗可以是，能够抑制细胞的增殖或者减轻疾病。

[0218] “抑制细胞增殖”是指细胞，例如前列腺、前列腺产生的肿瘤细胞，包括转移瘤细胞或者任何表达PSA的细胞的增殖；或者是乳腺组织，特别是乳腺癌细胞的增殖得到抑制。

[0219] “减轻”疾病是指与不施用本发明的聚胺类似物缀合物相比较，疾病的程度和/或不理想的临床表现得以减少和/或发展的时间进程变慢或延长。

[0220] 本公开内容还涉及使用有效量或治疗量的治疗对个体进行治疗。

[0221] “个体”是脊椎动物，优选哺乳动物，更优选为人。哺乳动物包括，但不限于，农场动物、运动动物、啮齿动物、灵长动物和宠物。优选地，个体已知或疑似患有前列腺疾病，例如BPH、前列腺炎和/或前列腺癌。

[0222] “有效量”或“治疗量”是足以产生有益的或所需的临床结果的量。有效量可以在一次或多次施用中施用。出于本发明的目的，聚胺类似物缀合物的有效量是足以减轻、改善、稳定、逆转、延缓或延迟疾病状态发展的量。本发明的聚胺类似物缀合物的治疗量是足以抑制前列腺细胞增殖的量。聚胺类似物缀合物被认为是治疗前列腺疾病的有效药剂如果其针对，例如，至少一种类型的前列腺癌细胞系有效，即使其针对不同的前列腺细胞系无效。

[0223] 雄激素受体相关疾病的治疗：不同的疗法和治疗

[0224] 对于AR-相关疾病已经使用了许多种不同的治疗。本公开内容涉及AR中的特定突变，其可用于患者分层，以及在可能的疾病治疗之间决定。

[0225] 例如，如果患者呈现AR(F876)，包括MDV3100的治疗将不会有用，但可以使用不包括MDV3100的治疗（例如比卡鲁胺、LEE011、治疗性核酸或其他治疗）。如果患者呈现AR(W741/T877)，包括MDV3100或比卡鲁胺的治疗将不会有用，但可以使用不包括这些组分中任一种（例如，CDK4/6抑制剂如LEE011或PD0332991、治疗性核酸或其他治疗）的治疗。

[0226] 已经使用了许多种不包括MDV3100和/或比卡鲁胺的用于AR-相关疾病的其他

治疗。这些包括手术（例如根治性前列腺切除术）、多种形式的放射疗法（例如短距离放射治疗和体外放射治疗）、高能聚焦超声 (HIFU)、冷冻手术和激素疗法和 / 或化学治疗药。AR- 相关疾病的其他疗法包括，但不限于，雄激素耗尽疗法，包括化学和手术阉割，甘氨酰细胞周期素、苄基羟吲哚嘧啶、噻吩并吡啶衍生物、脱噻唑基利托那韦 (desthiazolyl ritonavir)、二氢吲哚 -2- 酮和氮杂 - 二氢吲哚 -2- 酮、异黄酮衍生物、腈衍生物、stat5 抑制剂、质子泵抑制剂、环丙基二甲酰胺和类似物、3- 脱氧 -2- 亚甲基 -19-nor- 维生素 -D 类似物和核酸疗法。US 2012/0329761 ;US2012/0329771 ;US 2012/329774 ;US 2012/0329841 ;US 2012/0321639 ;US2012/0322820 ;US 2012/0322834 ;USPN 8,338,422 ; USPN 8,338,624 ;USPN8,338,454 ;WO 2012/174095。在本领域中治疗雄激素受体 (AR)- 相关疾病的其他方法是已知的，上述疾病例如前列腺疾病，例如前列腺癌 (PCa)，包括阉割抗性 PCa(CRPC) 和乳腺癌以及其他的 AR- 相关疾病，例如聚谷氨酸病、秃头症、良性前列腺增生、多毛症、痤疮、脊髓和肌肉萎缩症或肯尼迪病。

[0227] 在下文中对 MDV3100、比卡鲁胺、CDK4/6 抑制剂例如 LEE011 或 PD0332991 以及治疗性核酸的治疗进行更详尽的说明。

[0228] 用于雄激素受体相关疾病的治疗 :MDV3100

[0229] “MDV3100”、“MDV-3100”、“恩杂鲁胺 (Enzalutamide)”、“XTANDI”® （商品名）、**“XTANDI®胶囊”**等是指 Astellas Pharma US,Inc.,Northbrook,IL 和 Medivation Inc.,San Francisco,CA 出售的雄激素受体抑制剂，其化学名称为 4-{3-[4- 氰基 -3-（三氟甲基）苯基]-5,5- 二甲基 -4- 氧代 -2- 亚磺酰基咪唑烷 -1- 基 }-2- 氟 -N- 甲基苯甲酰胺。**XTANDI®**的活性成份是恩杂鲁胺；非活性成份是 :辛酰己酰聚氧甘油酯 (caprylocaproyl polyoxylglycerides)、丁基化羟基茴香醚、丁基化羟基甲苯、明胶、山梨糖醇山梨聚糖溶液、甘油、纯净水、二氧化钛、黑氧化铁。MDV3100 是强力的抗雄激素，并缺少激动剂活性。Tran 等人 , Science 324:787-790(2009)。提示 MDV3100 用于治疗之前接受过多西紫杉醇的转移性阉割抗性前列腺癌患者。出于参考，请参见 :Scher 等人 , N.Engl. J.Med.2012 ;367:1187-1197 ;和美国专利第 7,709,517 和 8,183,274 号。

[0230] 基于雄激素受体超量表达的前列腺癌模型中的活性，MDV3100 由 Astellas Pharma 和 Medivation Inc. 选出用于临床开发。恩杂鲁胺与目前可得到的抗雄激素剂的不同之处在于它抑制雄激素受体的核易位、DNA 结合和共激活剂招募。它还具有较强的受体亲和力，在异种移植模型中诱导肿瘤收缩（其中常规药剂仅仅延缓生长），并且没有已知的激动剂作用。在临床前研究中，MDV3100 在胰腺癌细胞内发挥作用，诱导细胞死亡，降低增殖并减小肿瘤体积。MDV3100 竞争性地抑制雄激素与雄激素受体结合，抑制雄激素受体核易位，抑制雄激素受体与 DNA 相互作用，并诱导细胞死亡，降低前列腺癌细胞增殖并减小肿瘤体积。

[0231] 对于 MDV3100 有若干禁忌、警告和防范。基于其作用机制，当施用给怀孕的女性时，MDV3100 可以导致对胎儿的伤害。MDV3100 不指示用于女性。怀孕或可能怀孕的女性忌用 MDV3100。

[0232] 在随机临床试验中，0.9％的 XTANDI 患者癫痫发作。安慰剂组没有患者经历癫痫。经历癫痫的患者永久性停止治疗。所有癫痫均得以解决。具有癫痫史、服用已知降低癫痫阈值的药物或者具有其他癫痫风险因子的患者均从临床试验中排除。由于与 XTANDI 应用

有关的癫痫风险，患者应当被告知从事其中突然丧失意识会导致对自身或他人的严重损害的任何活动的风险。

[0233] 在随机临床试验中接受XTANDI的患者中报道的最常见的不利药物反应（≥5%）是无力/疲劳、背痛、腹泻、关节痛、热潮红、外周性水肿、肌肉骨骼痛、头痛、上呼吸道感染、肌无力、头晕、失眠、下呼吸道感染、脊髓压迫和马尾综合征、血尿、感觉异常、焦虑和高血压。

[0234] MDV3100的药物相互作用。MDV3100在人体中是强CYP3A4诱导剂和中等CYP2C9和CYP2C19诱导剂。施用强CYP2C8抑制剂可以增加对MDV3100的血浆暴露。如果可能的话，应当避免MDV3100和强CYP2C8的同时施用。如果不能避免同时施用MDV3100，则降低MDV3100的剂量。MDV3100与强或中等CYP3A4和CYP2C8诱导剂的同时施用可以改变MDV3100的血浆暴露，并且如果可能的话应当避免。避免治疗指数狭窄的CYP3A4、CYP2C9和CYP2C19底物，因为MDV3100会降低这些药物的血浆暴露。如果将MDV3100与华法令(warfarin)(CYP2C9底物）同时施用，则进行额外的INR监测。

[0235] 恩杂鲁胺的推荐剂量和时间表为每日一次，口服160mg。

[0236] 尽管MDV3100已得到许可用于前列腺疾病患者，MDV3100也已经断定是至少一些类型的乳腺癌的潜在治疗剂。Naderi等人，Breast Cancer Res.13:R36(2011)

[0237] 尽管MDV3100已经在临床试验中表现出巨大的功效，许多最初进行有利反应者后来发展出对该二代抗雄激素的抗性。Kim等人，Curr.Treat.Opt.Oncol.13:189-200(2012)。本公开内容显示在体外使用MDV3100的延长的治疗之后，产生在LNCaP细胞中自发抗性的模型。对这些谱系的检查揭示，在AR的配体结合袋中高度复发的F876L/T877A突变，其赋予了对MDV3100有高度特异性的拮抗剂到激动剂的转换。这一新的突变特异性地驱动对MDV3100的遗传和表型抗性，同时保持对比卡鲁胺的细胞抑制影响敏感。

[0238] 因此，本公开内容显示AR中F876处的突变或W741/T877处的双突变产生对MDV3100的抗性。F876突变实际上可以造成MDV3100拮抗剂到激动剂的转换。表现出AR(F876)突变的细胞因此不能用MDV3100治疗，但是保持对不包括MDV3100的其他治疗例如比卡鲁胺易感。

[0239] 雄激素受体相关疾病的其他治疗：比卡鲁胺

[0240] “比卡鲁胺”及其商品名“CASODEX”、“SANDOZ BICALUTAMIDE”、“COSUDEX”、“CALUTIDE”、“KALUMID”等是指化学名称为N-[4-氰基-3-(三氟甲基)苯基]-3-[(4-氟苯基)磺酰基]-2-羟基-2-甲基丙酰胺的非甾体抗雄激素。参见：Furr.Eur.Urol.29Suppl 2:83-95(1996)；Furr.Urology 47(1A Suppl):13-25；discussion 29-32(1996)；Schellhammer等人，Urology 50(3):330-6(1997)；Waller等人，J.Mol.Endocrinol.24(3):339-51(2000)；Müderris等人，Gynecol.Endocrinol.16(1):63-6(2002)；Schellhammer.Expert Opin Pharmacother 3(9):1313-28(2002)；Fradet等人，Expert Rev Anticancer Ther 4(1):37-48(2004)；Chen等人，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 132Suppl 1:S7-16(2006)；和Levine等人，Cancer 110(11):2448-56(2007)。

[0241] 比卡鲁胺属于称作非甾体抗雄激素的一类药物。另一种非甾体抗雄激素是氟他

胺。非甾体抗雄激素例如比卡鲁胺阻断雄性激素睾酮在身体内的作用。

[0242] 比卡鲁胺与降低身体内睾酮的量的另一治疗（与称作黄体化激素释放激素类似物(LHRH)的药物或者与除去睾丸的手术）结合使用，用于治疗晚期（转移性）前列腺癌。比卡鲁胺属于称作非甾体抗雄激素的一类药物。

[0243] 另一种非甾体抗雄激素是氟他胺。非甾体抗雄激素例如比卡鲁胺阻断雄性激素睾酮在身体内的作用。

[0244] 比卡鲁胺与另一降低身体内睾酮的量的另一治疗（与称作黄体化激素释放激素类似物(LHRH)的药物或者与除去睾丸的手术）结合使用，用于治疗晚期（转移性）前列腺癌。

[0245] 尽管它在激素敏感的前列腺癌中对AR有抑制作用，当癌症变得激素难治时它不能抑制AR。目前的抗雄激素有两个弱点被诟病：不能防止前列腺癌从激素敏感阶段发展成激素难治疾病，和不能有效地治疗激素难治的前列腺癌。当AR在激素难治的前列腺癌中超量表达时，一是其拮抗剂活性弱，另一是其激动剂活性强。因此，需要有更强的拮抗剂活性、最小的激动剂活性的更好的AR抑制剂，以延缓疾病进展，并治疗致命的激素难治性前列腺癌。

[0246] 对于前列腺癌来说，非甾体抗雄激素例如比卡鲁胺已优选于甾体化合物，因为它们的选择性更高，副作用更小。这类化合物已经在许多专利中得到说明，例如美国专利第4,097,578号、美国专利第5,411,981号、美国专利第5,705,654号、PCT国际申请WO 97/00071和WO 00/17163以及美国公开专利申请第2004/0009969号，在此将其均并入作为参考。

[0247] 比卡鲁胺作为单一疗法或者与阉割结合已经在临床上使用多年，以阻断雄激素作用。但是，在CRPC的情形中，比卡鲁胺经历拮抗剂到激动剂的转换，自相矛盾地增强AR信号传导活性。Culig等人，Brit.J.Cancer 81:242-251(1999)。

[0248] 已知AR中的W741/T877双突变使细胞对比卡鲁胺有抗性。本公开内容还表明，该双突变使细胞对MDV3100有抗性。

[0249] 本公开内容还表明，AR中的F876突变使细胞对MDV3100有抗性，但对比卡鲁胺没有抗性。因此，比卡鲁胺可用作针对具有AR(F876)突变的细胞的治疗剂。

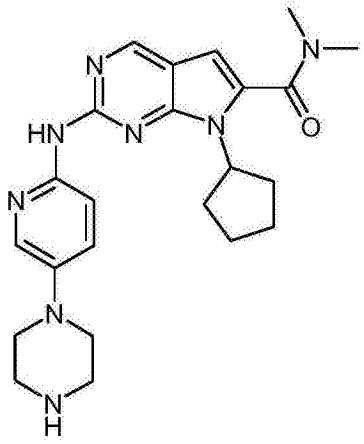
[0250] 除比卡鲁胺以外，还存在不包括MDV3100的用于雄激素受体相关疾病的其他治疗，下文对此进行说明。

[0251] 用于雄激素受体相关疾病的其他治疗：LEE011

[0252] LEE011(也称作Lee 011、Lee011、LEE-011和LEE 011)(Novartis and Astex Pharmaceuticals)是设计成抑制CDK4/6活性的新的口服药物。参见：PCT/US2007/069595；WO 2010/020675；和WO2011/130232。

[0253] LEE011的化学名称是7-环戊基-2-(5-哌嗪-1-基-吡啶-2-基氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-羧酸二甲基酰胺。LEE011的结构如下：

[0254]



[0255] LEE011 诱导癌细胞中 Rb 的完全去磷酸化和 G1 停滞。CDK4/6 在允许正常细胞和癌细胞均分裂和繁殖的过程中涉及。癌细胞常常被增加 CDK4 活性的异常驱动分裂和繁殖。因此，有希望的是，阻断 CDK4 的活性可以减缓一些癌症包括乳腺癌和前列腺癌的生长。

[0256] 本公开内容显示 AR 中的 F876 突变使细胞对 MDV3100 有抗性。W741/T877 双突变已知使细胞对比卡鲁胺有抗性，并在此显示使细胞对 MDV3100 有抗性。但是，如本文所示，在 AR 中具有 F876 突变或 W741/T877 双突变的细胞保持对不相关的细胞生长抑制剂 LEE011 的敏感性。

[0257] 此外，LEE011、PD0332991 和其他 CDK4/6 抑制剂可用作针对其中 AR 是野生型的 AR- 相关疾病的治疗剂。例如，如本文所示，表达 WT（野生型）AR 并在 MDV3100 处理条件下能够保持 AR 信号传导以及 DHFr 和 TK1 的表达的 PCa 谱系也表现出对 CDK4/6 抑制的强敏感性。

[0258] LEE011 还可以在治疗 AR- 相关疾病的方法中用作与一种或多种其他疗法和 / 或治疗的组合疗法的一部分。

[0259] 雄激素受体相关疾病的其他治疗 :PD0332991

[0260] CDK4/6 抑制剂 PD-0332991[或 PD0332991 或 PD033299] 是在多种恶性肿瘤包括乳腺癌的 II 期临床试验中有效的细胞生长抑制剂。Finn 等人，2009 Breast Cancer Res. 11:R77 ;Thangavel 等人，2011End. Relat. Cancer18:333-45 ;Dean 等人，2010 Oncogene 29:4018-32 ;和 Dean 等人，2012 Cell Cycle 11:2756-2761。

[0261] 本公开内容显示 PD0332991 可以用作 AR- 相关疾病的治疗剂。这包括其中 AR 包括 F876 突变的 AR- 相关疾病。此外，PD0332991、LEE011 和其他 CDK4/6 可以用作针对其中 AR 是野生型的 AR- 相关疾病的治疗剂。例如，如本文所示，表达 WT（野生型）AR 并在 MDV3100 处理条件下能够保持 AR 信号传导和 DHFr 和 TK1 的表达的 PCa 谱系也表现出对 CDK4/6 抑制的强敏感性。

[0262] 雄激素受体相关疾病的其他治疗 :治疗性核酸和衍生物

[0263] 若干组已经表明治疗性核酸可用于治疗雄激素受体相关疾病。这些包括反义核酸、吗啉代、siRNA 等。

[0264] W097/1 1 170 报道了治疗诊断为患有良性前列腺增生或前列腺癌的患者的方法，其包括施用与雄激素受体 mRNA 选择性杂交的反义核苷酸。公开了三种 27-29 个核苷酸之间的反义寡核苷酸序列。US 6,733,776 和 EP 0692 972 报道了通过应用包括与雄激素抗体

基因杂交的反义核酸的脂质体来治疗雄激素性脱发的方法。没有提供具有具体序列并靶向雄激素受体的反义分子。US 2005/0164970 报道了使用靶向雄激素受体 mRNA 的 siRNA 复合物治疗前列腺癌的方法。WO 2005/027833 报道了治疗前列腺癌的方法，其包括对患者施用长度为 12-40 个吗啉代亚基之间的吗啉代寡核苷酸。WO 2001/083740 报道了具有 18-20 个连续单元的不带电荷的吗啉代骨架的反义化合物，其靶向人雄激素受体。吗啉代反义化合物经由与核酸靶标结合而发挥作用，以阻断其他分子接近 mRNA，例如涉及 mRNA 剪接或翻译启动的分子。US 7,067,256 报道了明显地介导雄激素受体失活的核酶。提供了与雄激素受体 mRNA 的对应区域反义的 19 个核苷酸的 RNA 分子。WO 2012/065051 描述了雄激素受体的 siRNA。

[0265] 本公开内容表明，在 AR 中具有 F876 突变或 W741/877 双突变的细胞对 MDV3100 有抗性。但是，无意拘泥于任何具体理论，本公开内容指出不包括 MDV3100 的治疗剂例如治疗性核酸（例如 siRNA）针对这些细胞可以是有效的，条件是治疗剂可以足量递送至细胞。

[0266] 此外，我们在此显示使用 CDK4/6 抑制剂 LEE011 和 PD033299，靶向 CDK4/6 是用于克服 MDV3100 抗性的治疗策略。

[0267] 由于我们进一步阐明 F876L 变体保持对比卡鲁胺的敏感性，结构上不同的抗雄激素平行或顺序地与雄激素剥夺一起的结合疗法可以提供与临床中 AR 抗性机制斗争的有吸引力的治疗策略。

[0268] 此外，无论 AR 是 WT 或具有突变例如 F876，用 CDK4/6 抑制剂靶向 CDK4/6 是雄激素受体相关疾病的有效治疗策略。

[0269] AR(F876) 多核苷酸

[0270] 另一方面，本公开内容提供多核苷酸或反义多核苷酸，其包括具有以下序列和 / 或能够可检测地与以下序列杂交的至少 15 个连续核苷酸（包括 0、1、2 或 3 个错配），所述序列编码包括位置 876 的 SEQ ID NO:54 的至少 5 个连续氨基酸，其中位置 876 处的氨基酸是苯丙氨酸 (F) 以外的氨基酸，其中杂交是在包括在 50℃下在 0.1×SSC 和 0.1% SDS 中洗涤 15 分钟的条件下。这样的多核苷酸可用于检测细胞或组织或患者内 AR(F876) 多核苷酸的存在，或者用于制造针对 AR(F876) 的治疗性核酸。在多个方面，治疗性核酸是 RNA、DNA、siRNA（小或短的干扰 RNA，有或没有多种修饰和 / 或端帽）、RNA-DNA 杂交体、DNA-RNA 嵌合物（其与 siRNA 类似，不同之处在于一部分 dsRNA 被 dsDNA 取代）、LNA（锁核酸）、TNA（苏糖核酸）、GNA（乙二醇核酸）、吗啉代、反义寡核苷酸、shRNA、sisiRNA（小的内分段 RNA）、aiRNA（非对称干扰 RNA）或以上的任意组合（例如，其中核酸组分包括一种或多种上述物质，例如一些核苷酸被 RNA、GNA、LNA、吗啉代等置换的 RNA）等。在多个实施方式中，多核苷酸和 / 或反义核苷酸是单链或双链的，和 / 或修饰的，例如，通过 2'-OMe、2'-F 和 / 或 2'-MOE 修饰，和 / 或通过磷酸修饰和 / 或取代（例如，通过甲基化磷酸、亚砷酸、硒等）。另外提供包括任意上述多核苷酸的表达载体，以及用这些表达载体转化或转染的宿主细胞。

[0271] 简言之，因此，本公开内容涉及 AR 中的特定突变，其可用于 AR- 相关疾病患者的诊断、预后和治疗（例如，设计疗程）。

[0272] 下文中对检测特定 AR 的方法和患者分层的方法进行更详尽的描述。

[0273] 患者分层方法和检测 AR(F876) 和对患者进行分层的方法

[0274] 在进一步的方面内，本公开内容提供检测患者中或获自患者（例如，患有、罹患或

表现出至少一种 AR- 相关疾病的临床征兆或症状，或者处于 AR- 相关疾病的风险中或易于发展或疑似具有 Ar- 相关疾病的患者）的样品（例如，细胞或组织样品）中 AR 中位置 876 处的突变的存在或不存在的方法。AR 中 F876 处的突变是临床相关的，因为呈现该突变 AR 的患者不应用 MDV3100 治疗，而是应该用不包括 MDV3100 的治疗（例如，比卡鲁胺或 CDK4/6 抑制剂，例如 LEE011 或 PD0332991）来治疗。

[0275] 要注意到，样品内的细胞可以是异质的；一些可以表达 AR(F876)，而其他可以表达 WT（野生型）AR 和 / 或其他突变体 AR。在本文所述的多个方面，本公开内容涉及检测在可以包括 AR(F876)、WT AR 和 / 或其他突变体 AR 的混合物的样品中的 AR 中位置 F876 处的突变的方法。在一些方面，该方法能够确定 AR(F876)、WT AR 和 / 或其他突变体 AR 的混合物的比例。在一些样品中，AR(F876) 可以在少数表达 AR 的细胞中。

[0276] 在多个方面，本公开内容提供检测样品中（例如来自患者）AR 多核苷酸或者多肽中位置 F876 处的突变的方法，该方法包括以下步骤：(a) 自患者取得包括 AR 的样品（例如，生物样品、组织样品、细胞样品等）；和 (b) 测定 AR 多核苷酸或多肽或其一部分的序列，以确定 AR 是否在位置 F876 处包括突变（其中氨基酸的位置依据 SEQ ID NO:54 的编号）。在多个方面，样品仍然在患者内和 / 或是患者的一部分。在多个方面，患者患有、罹患或表现出至少一种 AR- 相关疾病的临床征兆或症状，和 / 或处于 AR- 相关疾病的风险中或易于发展或疑似具有 Ar- 相关疾病。上述方法任选地涉及诊断、预后和 / 或治疗患者的方法，并且任选地进一步包括额外的步骤：(c) 如果 AR 在位置 F876 处不包括突变，施用或推荐施用包括 MDV3100 的治疗组合物；或者如果 AR 在 F876 处包括突变，施用或推荐施用不包括 MDV3100 的治疗组合物。在多个方面，不包括 MDV3100 的治疗组合物是比卡鲁胺或 CDK4/6 抑制剂，例如 LEE011 或 PD0332991，或者治疗性核酸。在多个方面，如果测定样品包括表达 Ar(F876)、WT AR 和 / 或其他突变体 AR 的细胞的混合物，则若干步骤可能是必需的，以攻击混合物内不同类型的细胞。

[0277] 此外，随着细胞亚群被治疗剂杀灭或可能激活，WT 和呈现多种突变体 AR 的细胞的比例可以变化，并且出现抗性克隆。因此，可以重复步骤 (a)、(b) 和 (c)。

[0278] 例如，确定 AR 中位置 876 处的氨基酸是否是苯丙氨酸和对患者进行分层的方法可以在 1 或更多轮的治疗之后进行。肿瘤或其他疾病组织可以是异质的，包括多种类型的 AR[例如，WT AR 和 / 或 AR(F876) 和 / 或其他突变体]。这些细胞亚群的比例可以随着一些细胞被治疗剂杀灭或激活而变化。本文公开的实验显示，将 LNCaP 细胞延长暴露于 MDV3100 产生对 MDV3100 有抗性的克隆群体。其他研究已经显示对 MDV3100 或其他疾病治疗剂的抗性，或者突变体、抗性细胞的富集。要注意到，尚未清楚抗性是之前存在的（例如，在细胞的少数亚群中）还是反应于治疗而获得的。因此，在一轮或多轮治疗之后，可以重复步骤 (a) 和 (b)，以确定剩余细胞的特征，并且可以修改步骤 (c) 以选择适于攻击剩余细胞的治疗剂。

[0279] 在多个方面，确定 AR 中位置 876 处的氨基酸是否是苯丙氨酸 (F) 的方法包括但不限于，尤其是，使用核酸测序（例如，DNA 测序方法、RNA-seq、蛋白质测序、全转录组测序或本领域已知的其他方法），或者使用对 AF(F876) 特异性的抗体或核酸。

[0280] 在多个方面，核酸测序涉及对以下核酸的测序，所述核酸可以编码包括或跨越位置 F876 的 AR 或其一部分，或者与编码 AR 或其一部分的核酸互补。

[0281] 在多个方面，确定 AR 中位置 876 处的氨基酸是否是苯丙氨酸 (F) 的方法包括但不限于，尤其是，使用对 AR(F876) 有特异性的抗体或其片段或变体 [例如，其结合或识别 AR(F876)，但不结合或识别 WT AR]。在多个方面，本公开内容提供检测样品中 AR(F876) 表达的方法，该方法包括以下步骤 :(a) 在足以允许形成抗体 /AR(F876) 复合物的条件下和时间使样品与上述抗体或其抗原结合片段接触 ;和 (b) 检测抗体 /AR(F876) 复合物的水平。

[0282] 在多个方面，确定 AR 中位置 876 处的氨基酸是否是苯丙氨酸 (F) 的方法包括但不限于，尤其是，使用 AR(F876) 特异性的核酸 [例如，其结合或识别 AR(F876)，但不结合或识别 WT AR]。

[0283] 在再其他的方面内，本公开内容提供检测样品中 AR(F876) 表达的方法，其包括 (a) 在足以允许核酸与样品中的核酸杂交的条件下和时间使样品与 AR(F876) 特异性的核酸或其片段或变体接触 ;和 (b) 检测杂交水平。

[0284] 与多核苷酸或反义多核苷酸杂交的样品中 AR(F876) 反义多核苷酸或多核苷酸的量可以使用，例如，测序、聚合酶链式反应或杂交测定法测定。

[0285] 也提供调节细胞中增殖反应的方法，其包括使细胞与调节 AR(F876) 活性的活性剂接触的步骤。

[0286] 在进一步的方面内，提供调节细胞分化的方法，其包括使细胞与调节 AR(F876) 活性的活性剂接触的步骤。

[0287] 本公开内容进一步提供调节细胞存活的方法，其包括使细胞与调节 AR(F876) 活性的活性剂接触的步骤。

[0288] 因此，在多个方面，本公开内容涉及检测 AR(F876) 或者对表达或不表达该多肽的患者进行分层的多种方法。

[0289] 在多个方面，确定 AR 中位置 876 处的氨基酸是否是苯丙氨酸 (F) 的方法包括但不限于，尤其是，使用核酸测序 (例如，DNA 测序方法、RNA-seq、蛋白质测序、全转录组测序或本领域已知的其他方法)，或者使用 AF(F876) 特异性的抗体或核酸。对于多种有关测序的参考文献，参见 :Morin 等人，Nature 476:298-303(2011) ;Kridel 等人，Blood 119:1963-1971(2012) ;Ren 等人，Cell Res. 22:806-821(2012) 以及其中引用的参考文献。

[0290] 简言之，有许多种方法可用于确定来自患者的样品是否包括具有特定突变的 AR。这些多种突变可用于患者分层以及用于设计治疗方案。

[0291] F876 处的新的和临床相关的 AR 突变的可用之处还在于，包括该突变的 AR 多肽、这些多肽的抗体和编码其的多核苷酸可以用于产生或筛选新的治疗剂。

[0292] 使用 AR(F876) 产生和筛选新的治疗剂

[0293] 位置 F876 处的突变允许 AR 对 MDV3100 有抗性，甚至导致对该药物的从拮抗剂到激动剂的转换。因此，需要有与 AR(F876) 相互作用并可用于治疗在 AR 中具有该突变的 AR- 相关疾病患者的新治疗剂。

[0294] 在其他方面内，本公开内容进一步提供就与 AR(F876) 相互作用的能力筛选分子 (例如，潜在的治疗剂) 的方法，其包括以下步骤 :(a) 在足以允许候选分子和多肽相互作用的条件下和时间使候选分子与 AR(F876) 多肽接触 ;和 (b) 检测存在或不存在候选分子与多肽的结合和 / 或干扰或降低多肽的至少一种活性的能力。检测步骤可以，例如，包括使用 AR(F876) 和 AR 报道基因，例如，包括 ARE[WT 或 AT(F876) 结合的 DNA 序列]、启动子和报道

基因的多核苷酸（例如，荧光素酶）。检测步骤可以包括，例如，确定候选分子是否干扰或降低 AR(F876) 驱动 AR 报道基因表达的能力。检测步骤可以包括，例如，亲和纯化步骤、酵母双杂交筛选或噬菌体展示文库筛选。

[0295] 在一些方面，新治疗剂的筛选方法涉及使用 AR(F876) 多肽或其包括或跨越位置 876 处的氨基酸的片段或变体。该多肽可以本领域已知的任何方法产生，包括从编码多肽的多核苷酸表达。

[0296] 本公开内容包括制造 AR(F876) 多肽的方法。

[0297] 本公开内容进一步在其他方面内包括制造 AR(F876) 多肽的方法，其包括以下步骤：(a) 在允许表达 AR(F876) 多肽的条件下培养上述的宿主细胞；和 (b) 从宿主细胞培养物中分离 AR(F876) 多肽。

[0298] 可以很容易地设计许多方法，用于将突变体 AR(F876) 用于筛选对该突变体 AR 敏感的药物。

[0299] 本公开内容应用的两种方法包括 1) 反式激活和 2) 基因表达分析，以确定靶向 AR 路径的化合物是否可以用作突变体 AR 功能的抑制剂。两种方法均在方法部分中加以清楚概括。一种方法在实施例 7 中详述。

[0300] 简言之，对于反式激活检验，在用对照溶剂（例如 DMSO）、目标激动剂或拮抗剂处理之前，将 AR 报道基因、对照质粒和 WT 或突变体 AR(F876) 共转染。AR 报道基因包括，例如，ARE（结合 AR 的雄激素受体反应元件序列）、启动子和报道基因例如荧光素酶。在处理之后，对报道基因的产物（例如生物发光）进行定量。预计 WT AR 将会在激动剂（例如 R1881）的存在下激活 AR 报道基因，并且信号应当在拮抗剂例如 MDV3100 的存在下被充分抑制。但是，对于 AR(F876)，预计在激动剂和拮抗剂例如 MDV3100 的存在下会有 AR- 报道基因活性的充分激活。理想的新的拮抗剂将会以类似于比卡鲁胺的方式充分阻断 AR(F876) 功能。

[0301] 除反式激活检验以外，也可以监测典型 AR 基因例如 KLK3、TMPRSS2、NKX3-1 和 SLC45A3 的基因表达分析。该实验与本文别处所概述的实验类似，不同之处在于可以将 MDV3100 替换成新的化合物。预期尽管 MDV3100 可以用作激动剂来挽救信号传导，新的化合物可以有效地保持具有 F876L-AR 的细胞中信号传导活性的抑制。

[0302] 因此，AR(F876) 已经并可以用于筛选影响该突变体 AR 的新的药物和治疗剂。

[0303] AR(F876) 的抗体

[0304] 可以开发与 AR(F876) 特异性结合但不与在 F876 处缺少突变的 AR（由此，在位置 876 处具有苯丙氨酸 AR，片段或变体）结合的抗体。

[0305] 术语“抗体”是指包括至少一个免疫球蛋白可变区或免疫球蛋白可变结构域序列的蛋白质。例如，抗体可以包括重 (H) 链可变区（在此简称为 VH) 和轻 (L) 链可变区（在此简称为 VL)。在另一例子中，抗体包括两个重 (H) 链可变区和两个轻 (L) 链可变区。术语“抗体”包括抗体的抗原结合片段（例如，单链抗体、Fab 和 sFab 片段、$F(ab')_2$、Fd 片段、Fv 片段、scFv 和结构域抗体 (dAb) 片段 (de Wildt 等人，Eur J. Immunol. 1996；26(3):629-39)) 以及完整的抗体。抗体可以具有结构上的特征 IgA、IgG、IgE、IgD、IgM（及其同种型）。抗体可以来自任何来源，但是优选哺乳动物（人和非人哺乳动物）和灵长类。

[0306] VH 和 VL 区可以进一步细分为高变区，其称作“互补性决定区”（“CDR”），散布有更加保守的称作“框架区”（“FR”）的区。框架区和 CDR 的程度已经加以精确定义（参见，

Kabat,E.A. 等人,(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fifth Edition,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242;和Chothia,C. 等人,(1987)J.Mol.Biol.196:901-917,也参见www.hgmp.mrc.ac.uk)。本文使用Kabat定义。每个VH和VL通常由3个CDR和4个FR组成,其以如下顺序从氨基端到羧基端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0307] 抗体的VH或VL链可以进一步包括所有或部分重链或轻链恒定区,从而分别形成重或轻免疫球蛋白链。在一实施方式中,抗体是两个重免疫球蛋白链和两个轻免疫球蛋白链的四聚体,其中重和轻免疫球蛋白链通过例如二硫键互相连接。在IgG中,重链恒定区包括三个免疫球蛋白结构域CH1、CH2和CH3。轻链恒定区包括CL结构域。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区通常介导抗体与宿主组织或因子的结合,包括免疫系统的多种细胞(例如,效应细胞)和经典补体系统的第一组分(Clq)。免疫球蛋白的轻链可以是κ或λ类型的。在一实施方式中,抗体是糖基化的。对于抗体依赖性细胞毒性和/或补体介导的细胞毒性,抗体可以是功能性的。

[0308] 抗体的一个或多个区可以是人的或者实际上是人的。例如,一个或多个可变区可以是人的或实际上是人的。例如,一个或多个CDR可以是人的,例如,HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2和LC CDR3。每个轻链CDR可以是人的。HC CDR3可以是人的。一个或多个框架区可以是人的,例如,HC或LC的FR1、FR2、FR3和FR4。在一实施方式中,所有框架区是的人的,例如,来自人的体细胞,例如,产生免疫球蛋白的造血细胞或非造血细胞。在一实施方式中,人序列是种系序列,例如,由种系核酸编码。在一实施方式中,所选择Fab的框架(FR)残基可以转化成最相似的哺乳动物种系基因,特别是人种系基因中对应残基的氨基酸类型。一个或多个恒定区可以是人的,或者实际上是人的。例如,至少70%、75%、80%、85%、90%、92%、95%、98%或100%的免疫球蛋白可变结构域、恒定区、恒定结构域(CH1、CH2、CH3、CL1)或整个抗体可以是人的或者实际上是人的。

[0309] 所有或部分抗体可以由免疫球蛋白基因或其区段编码。示意性的人免疫球蛋白基因包括κ、λ、α(IgA1和IgA2)、γ(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、Δ、ε和μ恒定区基因以及许多免疫球蛋白可变区基因。全长免疫球蛋白"轻链"(大约25KDa或大约214个氨基酸)由NH2-端(大约110个氨基酸)和COOH-端的κ或λ恒定区基因编码。全长免疫球蛋白"重链"(大约50KDa或大约446个氨基酸)类似地由可变区基因(大约116个氨基酸)和其他上述恒定区基因之一例如γ(编码大约330个氨基酸)编码。人HC的长度变化相当大,因为HC CDR3从3个氨基酸残基到多于35个氨基酸残基不同。

[0310] 因此,可以使用AR(F876)设计特异性靶向AR(F876)的抗体、小分子、siRNA。

[0311] AR(F876)多核苷酸

[0312] 本公开内容涉及AR(F876)多核苷酸。这些核苷酸可以用于编码(例如表达)AR(F876)多肽,或者并入到治疗性核酸[例如,AR(F876)的siRNA等]中。

[0313] 在一方面,本公开内容提供多核苷酸或反义多核苷酸,其包括具有以下序列和/或能够可检测地与以下序列杂交的至少15个连续核苷酸(包括0、1、2或3个错配),所述序列编码包括位置876的SEQ ID NO:54的至少5个连续氨基酸的序列,其中位置876处的氨基酸是苯丙氨酸(F)以外的氨基酸,其中杂交在包括洗涤的条件下。这样的多核苷酸可以用于检测细胞或组织或患者内AR(F876)多核苷酸的存在,或者用于制造AR(F876)的治

疗性核酸。另外提供包括任意前述多核苷酸的表达载体，以及用该表达载体转化或转染的宿主细胞。

[0314] 本公开内容的另一实施方式提供分离的雄激素受体多核苷酸，其中分离的多核苷酸或其互补序列编码 SEQ ID NO:2 的至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 个连续氨基酸，其中至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 个连续氨基酸包括或跨域 SEQ ID NO:2 的位置 876，并且其中位置 876 处的氨基酸不是苯丙氨酸，并且其中，任选地，位置 877 处的氨基酸不是苏氨酸 (T)，位置 874 处的氨基酸不是组氨酸 (H)，位置 715 处的氨基酸不是缬氨酸 (V)，并且 / 或者位置 741 处的氨基酸不是色氨酸 (W)。

[0315] 本公开内容的另一实施方式提供包括上述分离的雄激素受体多核苷酸的表达构建物 (或载体)。

[0316] 本公开内容的另一实施方式提供包括上述分离的雄激素受体多核苷酸的宿主细胞。

[0317] 本公开内容的另一实施方式提供包括构建物的宿主细胞，所述构建物包括启动子 ；和上述分离的雄激素受体多核苷酸。

[0318] 本公开内容的另一实施方式提供编码突变体雄激素受体的多核苷酸，所述突变体雄激素受体包括 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列除了编码的突变体雄激素受体蛋白质在 SEQ ID NO:2 的位置 876 处含有亮氨酸 (L) 之外。

[0319] 本公开内容的另一实施方式提供构建物，其包括 ：启动子 ；和编码突变体雄激素受体或其片段的多核苷酸区段，其中雄激素受体的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示，其中所述序列在 SEQ ID NO:2 的位置 876 处含有突变，使得位置 876 处的氨基酸不是苯丙氨酸 (F)，并且其中，任选地，位置 877 处的氨基酸不是苏氨酸 (T)，位置 874 处的氨基酸不是组氨酸 (H)，位置 715 处的氨基酸不是缬氨酸 (V)，并且 / 或者位置 741 处的氨基酸不是色氨酸 (W)，并且其中片段的序列包括 SEQ ID NO:2 的至少 5 个连续氨基酸并包括位置 876，其中多核苷酸区段位于启动子的下游，其中多核苷酸区段的转录在启动子处起始。

[0320] 本公开内容的另一实施方式提供分离的多核苷酸，其中分离的多核苷酸或其互补序列编码 SEQ ID NO:54 的至少 10 个连续氨基酸，其中至少 10 个连续氨基酸包括 SEQ ID NO:54 的位置 876，并且其中位置 876 处的氨基酸被置换或缺失或者不是苯丙氨酸 (F)。

[0321] 本公开内容的另一实施方式提供分离的多核苷酸，其中分离的多核苷酸或其互补序列编码 SEQ ID NO:54 的至少 15 个连续氨基酸，其中至少 15 个连续氨基酸包括 SEQ ID NO:54 的位置 876，并且其中位置 876 处的氨基酸被置换或缺失或者不是苯丙氨酸 (F)。

[0322] 本公开内容的另一实施方式提供分离的多核苷酸，其中分离的多核苷酸或其互补序列编码 SEQ ID NO:54 的至少 20 个连续氨基酸，其中至少 20 个连续氨基酸包括 SEQ ID NO:54 的位置 876，并且其中位置 876 处的氨基酸被置换或缺失或者不是苯丙氨酸 (F)。

[0323] 本公开内容的另一实施方式提供表达构建物，其包括任意本文所述的分离的多核苷酸。

[0324] 本公开内容的另一实施方式提供宿主细胞，其包括任意本文所述的分离的多核苷酸。

[0325] 本公开内容的另一实施方式提供宿主细胞，其包括包含启动子 ；和本文所述任意多核苷酸的构建物。

[0326] 本公开内容的另一实施方式提供分离的多核苷酸，其编码：突变体雄激素受体多肽或其片段，其中雄激素受体的氨基酸序列如 SEQ ID NO:54 所示，其中所述序列在 SEQ ID NO:54 的氨基酸位置 876 处含有突变，使得氨基酸在位置 876 处被置换或确实或者不是苯丙氨酸 (F)，并且其中片段的序列包括至少 5 个连续氨基酸并包括位置 876。

[0327] 本公开内容另一实施方式提供了编码突变体雄激素受体蛋白的多核苷酸，所述突变体雄激素受体蛋白包括 SEQ ID NO:54 的氨基酸序列除了编码的突变体雄激素受体蛋白在 SEQ ID NO:54 的位置 876 处含有亮氨酸 (L) 之外。

[0328] 因此，在多个方面，本公开内容涉及编码 AR(F876) 或其片段或变体的的多核苷酸。以下在涉及该突变的进一步详细的实验数据中呈现本公开内容。

[0329] 具有 F876 突变的雄激素受体

[0330] 本公开内容的目标是提供用于诊断、预后和治疗前列腺疾病例如前列腺癌 (PCa) 包括阉割抗性 PCa(CRPC) 的工具和方法。本公开内容的该目的和其他目的通过下述的一个或多个实施方式提供。

[0331] 在多个方面，本公开内容涉及 AR(F876)，其是包括包含位置 876 的雄激素受体的多肽等或其片段，其中位置 876 处的氨基酸是苯丙氨酸 (F) 以外的氨基酸。在一些方面，位置 876 处的氨基酸是亮氨酸 (L)。在多个方面，AR(F876) 多肽任选地在其他位置具有突变，使得位置 877 处的氨基酸不是苏氨酸 (T)，位置 874 处的氨基酸不是组氨酸 (H)，位置 715 处的氨基酸不是缬氨酸 (V)，并且 / 或者位置 741 处的氨基酸不是色氨酸 (W)。在另外的方面，本公开内容涉及 AR(W741/T877)，其是包括包含位置 741 和 877 的雄激素受体的多肽等或其片段，其中 741 位置处的氨基酸不是色氨酸 (W)，并且位置 877 处的氨基酸不是苏氨酸 (T)。

[0332] 在多个方面，本公开内容提供检测患者中 AR(W741/T877) 表达的方法，该方法包括以下步骤：确定患者中雄激素受体或其片段在位置 741 和 877 处的氨基酸是否分别是色氨酸 (W) 和苏氨酸 (T)。在多个方面，该方法还包括步骤为：(a) 如果位置 741 和 877 处的氨基酸分别是色氨酸 (W) 和苏氨酸 (T)，对患者推荐施用和 / 或施用比卡鲁胺或 MDV3100；或者 (b) 如果位置 741 和 877 处的氨基酸不分别是色氨酸 (W) 和苏氨酸 (T)，对患者推荐施用和 / 或施用比卡鲁胺或 MDV3100 以外的前列腺疾病治疗。

[0333] 本公开内容采用 LNCaP 模型——之前用于鉴定赋予对比卡鲁胺抗性的临床相关的 W741C 突变的模型 [Hara 等人，Cancer Res.63:149-153(2003)]—以鉴定并在功能上确认 AR 中的 F876L/T877A 突变作为 MDV3100 的拮抗剂到激动剂转换的作用。通过基因表达和表型分析，本公开内容显示 F876L/T877A 突变体 AR 赋予的激动剂转换对于 MDV3100 具有高度的选择性，因为保持对比卡鲁胺的敏感性。这将意味着呈现该突变的患者—无论之前存在的还是响应于治疗而获得的—将在用 MDV3100 治疗的过程中表现出疾病的迅速临床发展，但可以有利地响应于比卡鲁胺或潜在地其他类别的抗雄激素 (图 7)。在治疗之前或者在抗性发生以后，对患者进行筛选以鉴定该突变，将有助于预测药物敏感性，并指导备选的临床管理策略。

实施例

[0334] 实施例 1. 材料和方法

[0335] 方法

[0336] 细胞培养

[0337] 将 LNCaP-FGC 和 PC3 细胞在补充有 10 % FCS(Hyclone) 或 10 % CSS(Omega, cat#fb-04) 的 RPMI 1640 培养基中培养,如所示。将 22Rv1 细胞在具有 10% FCS 的 RPMI 1640 培养基中培养。将 VCaP 细胞在具有 10% FCS 或 10% CSS 的 DMEM 培养基中培养。将 Myc-CaP 细胞在具有 10% FCS 的 DMEM 培养基中培养。将 293FT 细胞在补充有 10% FCS 和 1xNEAA 的 DMEM 培养基中培养。除 Myc-CaP 细胞以外,所有细胞均获自美国模式培养物保藏所,并且通过单核苷酸多态性指纹分析测试并鉴定细胞。细胞由 Dr. Charles Sawyers 友情提供,并未经进一步测试或鉴定。

[0338] 体外产生自发性 MDV3100 抗性的 LNCaP 克隆

[0339] 将 2 百万 LNCaP 细胞在补充有 10% FCS 的不含酚红的 RPMI 1640 培养基中接种在 4 个 150cm^2组织培养皿中。次日,将 DMSO 和乙醇 (对照 1, C1)、DMSO 和 1.0nM R1881(对照 2, C2)、1 μM MDV+1.0nM R1881(对照 3, C3) 和 1 μM MDV3100 分别加入至皿 1-4 中。每周一次将细胞再接种在补充有适当处理剂的 150cm^2皿中。每周一次替换皿 4 的培养基和化合物。一旦产生抗性克隆,从皿 4 抽出培养基。使用浸有胰蛋白酶的 3mm 无菌克隆盘 (Scienceware, cat#17-2.X),覆盖抗性克隆,孵育 1-2 分钟之后,将克隆盘转移至具有补充有 10% FCS 和 MDV3100 的不含酚红的 RPMI 1640 培养基的 24 孔板。培养来自对照盘 1-3 的细胞,直至抗性克隆低温保藏以对于对照和实验谱系保持恒定的培养时间。

[0340] 产生稳定转导的谱系

[0341] 合成编码 WT 或突变体 AR 的密码子优化的 cDNA(DNA2.0),将其亚克隆到 pLKO-TREX-HA-Neo(Invitrogen) 中。通过将 293FT 细胞用 VSVG:deltaR8.9:cDNA 构建物以 1:2.5:1.25 的比例转染,产生慢病毒。转染后 2-3 天收获病毒,过滤,并用于在 8 μg ml-1 聚凝胺的存在下感染 LNCaP、MyC-CaP 和 VCaP 细胞培养物。将感染的细胞在新霉素中培养 3 周。在所有情形中,合并至少 1000 个独立的克隆,以产生稳定的细胞系,以避免克隆变化。平行地产生用对照载体感染的稳定细胞系,以用作实验对照。

[0342] 微阵列

[0343] 在用 DMSO 或 10 μM MDV3100 处理 24h 之前 2-3 天,将细胞接种在 6 孔板中。使用 Qiagen RNeasy 试剂盒从细胞中分离总 RNA。用 RNA 6000Nano LabChip 系统在生物分析仪 (Agilent Technologies) 上评价 RNA 完整性和纯度。有标记的 cDNA 的产生和与 Affymetrix GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0Array(Affymetrix Inc.) 的杂交使用之前所述的标准方案进行 (8)。

[0344] 表达分析

[0345] 使用 MAS5 以截尾均值目标 150 对来自 Affymetrix 基因表达数据集中的探针集进行标准化,并 log2- 转化。然后仅如果不同样品的最大值为至少 5 时将探针集过滤以纳入。使用 0-1 指标变量作为协变量进行普通最小二乘法 ;使用一指标表示每个克隆的基线 (未处理的样品),三个指标变量表示每个类别的样品 (对照、弱抗性和强抗性克隆) 用 MDV3100 处理。该回归用于产生标称的 p- 值和回归系数 (即倍数变化)。如果其倍数变化 > = 1.5,标称的 p- 值 < = 0.05,单个探针集被视作显著性差别表达的。

[0346] 基因集富集分析

[0347] AR 基因标签 (30) 之间的相关性与用 MDV-3100 处理时的第一级 (top-ranked) 基因进行比较。蓝线表示表达的探针集位置，并通过平均倍数变化评级；仅仅包括在至少 1 个样品中以至少 32 的 MAS5-150 水平表达的那些探针集。红线表示在我们的数据集中映射 AR 基因标签中的基因的探针集出现的地方；灰线是没有通过标称显著性的探针集，较高的红线表示倍数变化为至少 1.5、和标称 p- 值小于 0.05 的探针集。黑色曲线表示 AR 基因标签中探针集的累计总和，并且虚线表示未富集的基因随机列表的假设累计总和。

[0348] 路径富集分数

[0349] 对于候选标签 (30)，使用双尾 fisher 确切测试 (two-tailed fisher's exact test) 来确定，与表达但是非差异性表达的探针集相比较，被上调或下调至少 1.5 倍的探针集的集合中，代表那些标签中的基因的探针集是否被过低或过高呈现，标称 p- 值为 0.05 或更低。对于无偏性方法，使用与阵列上呈现的所有基因相比较变化 1.5 倍或更多、标称 p- 值为 0.05 或更低的基因，经由单尾插值的 fisher 确切测试 (one-tailed interpolated fisher's exact test) 对源自 GO 方面和转录因子网络的路径进行超量呈现进行分析；然后对这些 p- 值进行 Benjamini-Hochberg(BH) 校正。

[0350] Sanger 测序

[0351] 使用血液和组织 DNAesy 试剂盒 (Qiagen，cat#69581) 根据制造商的说明自多种 1μM MDV 抗性克隆和适当的对照谱系分离基因组 DNA。使用引物扩增外显子 8(F876L 突变位点)(正向：5'-ATTGCGAGAGAGCTGCATCA-3'(SEQ ID NO:55)；反向：5'-TTCTCGTCACTATTGGCCTC-3'(SEQ ID NO:56))，并且扩增的 cDNA 通过 Genewiz 使用相同的引物测序。对跟踪文件进行分析，确认 F876L 突变的存在。

[0352] 定量实时 PCR

[0353] 对于自发性克隆：在用多种化合物处理 24h 之前，在补充有 10％ FCS 的 RPMI 1640 中将 200k 细胞接种在 6 孔板中 2 天。备选地，对于涉及雄激素耗尽的实验，将 200k 细胞在补充有 10％ FCS 的无酚 RPMI 1640 中在 6 孔板中接种并生长 2 天。在用多种化合物处理 24h 之前，吸出培养基，用补充有 10％ CSS 的无酚红 RPMI 1640 替代 3-4 天。对于遗传改造的谱系，应用类似的方案，不同之处在于，在用多种化合物处理之前，将细胞用 Dox 预处理至少 2 天，以允许充分的转基因表达。使用 RNeasy plus mini 试剂盒 (Qiagen，cat#74136) 根据制造商说明书，提取总 RNA。使用高容量 cDNA 逆转录试剂盒 (Applied Biosystems，cat#4368813) 使用 1-2μg 总 RNA 用于 cDNA 合成。将来自各个样品的 cDNA 稀释 15-20 倍，使用基因特异性引物和 FastStart Universal Probe Master(Rox)(Roche Applied Science) 在 ABI 7900HT 系列 PCR 机上实时进行。表达水平标准化为 TBP 表达。所有分析均使用 SDS2.3 软件进行。使用以下基因特异性引物 (Invitrogen)：AR(Hs00171172_m1)、KLK3(Hs02576345_m1)、NKX3-1(Hs00171834_m1)、TMPRSS2(Hs01120965_m1)、SLC45A3(Hs00263832_m1)、TBP(Hs00427620_m1)、DHFR(Hs00758822_s1) 和 TK1(Hs01062125_m1)。

[0354] 体内肿瘤发生测定

[0355] 将 1:1 混合有基质胶 (matrigel) 的 1 千万 LNCaP 细胞 (C1，克隆 #1) 皮下注射到阉割的 7-8 周龄雄性 nu/nu 小鼠的侧腹中。每天将具有肿瘤的小鼠 (肿瘤体积＝ 150-300mm^3) 用载体或 30mg/kg MDV3100 处理。使用卡尺测量肿瘤，肿瘤体积使用长度 x 宽度 ^{2}/2 计算。

数据表示成 +SEM 平均值。所有动物实验均遵照 Novartis Biomedical Research Animal Care and Use Committee 协议和规定的指导进行。

[0356] 统计分析

[0357] 数据报告为平均值 ±SEM(平均值的标准误差)。进行无假设方差相等的双边独立 student's t-检验,分析基因表达水平和体外荧光素酶测定的终点。对于基因集富集分析,显示的 p-值基于双尾 Fisher 确切测试,其对通过显著性的基因标签中的探针集与未通过者进行比较,相对于所有其他探针集的显著性/非显著性。对于动物实验,进行双尾 Fisher 确切测试,以确定每组中生长明显的肿瘤的小鼠的百分比的显著性。

[0358] 登记编号

[0359] 用于分析在自发和改造谱系中用 MDV3100 vs. DMSO 处理时的差异基因表达的基因表达微阵列数据已经保藏于 NCBI Gene Expression Omnibus,登记编号分别为 GSE44924 和 GSE44927。

[0360] 其他的实验方法列于补充方法中。

[0361] 补充方法

[0362] RNA-seq 分析

[0363] RNA-seq 比对由以下组成 :fastq 预处理、生成要比对的联合基因组/转录组 fasta 文件,和与 bowtie2 和改进版本的 tophat1.3 比对 ;细节参见下文。

[0364] FASTQ 预处理 :对成对读出进行预处理,以修剪 3'端的低质量碱基以及接头序列。首先,使用 BWA 算法从 3'端除去低质量碱基(即,读出修剪成使 phread 比例的质量分数之和减去 20* 产生的读取长度最大化)。除去在质量修剪之后长度读出小于 50bp 的读出对。接下来,检查读出对的互补性。导致 3'突出端匹配 Illumina 接头序列之一的互补性已修剪了突出端。如果互补性指示插入片段大小小于 67bp,则除去该读出对。

[0365] 生成联合基因组/转录组文件 :为了竞争性地比对针对基因组(来自 DNA 污染、随机转录或 pre-mRNA) 和转录组二者的读出,生成许多个合并的 FASTA 文件。此外,在合并的 FASTA 文件中包括表示 phiX、rRNA 的、源自 1000 基因组的"decoy"序列和来自 RefSeq(1) 的病毒 (TaxID10239) 核酸序列。使用的基因组是 NCBI GRCh37.5 ;但是,如果根据 dbSNP137 该等位基因在至少 75%的注释的种群中更加常见,将参考文献中所有的单核苷酸多态性交换成替代的等位基因。转录组序列使用 UCSC knownGene 生成。生成添加至上述序列的 3 个转录组 FASTA 文件 :

[0366] (1) 由于使用的最长读取长度为 101 核苷酸,包括 100 个位于每个注释的接合点侧翼的碱基对,其中侧翼跟在长度小于 100bp 的其他外显子接合点后。在第一步 Tophat 中使用该版本,其进行单端比对。

[0367] (2) 通常,第 99 个百分位的片段大小长度小于 500 个碱基对。因此,也产生跟在每个注释的接合点侧翼的 500 个碱基对后的版本,其中侧翼跟在其他注释的接合点后,用于所关注的转录。将重叠的接合点合并,以使目标 FASTA 比对文件最小化 ;例如,仅有一种其中每个外显子长度 <500bp 的同种型的基因,将仅有单个含有整个 cDNA 序列的 FASTA 记录。具有 2 个同种型的基因,一个包括备选地剪接的外显子,将会含有 2 个 FASTA 记录 ;一个具有含有备选地剪接的外显子的整个 cDNA,而一个长度 1000 核苷酸,含有位于剪接出所述外显子的接合点侧翼的 500bp。这一版本使用 Bowtie 2 用于双端对比。

[0368] (3) 对于片段大小较长的那些样品，与 (2) 相同，但用 1000bp 侧翼代替 500bp 侧翼。

[0369] 每个接合点的序列名称表示在参考基因组上包括的核苷酸的位置，以允许容易地逆向映射至基因组坐标。将这 3 个版本中每一个串联至参考基因组 + 其他上述序列，使用 Bowtie 2.0.0-β7 以及 bowtie 0.12.8 索引。

[0370] FASTQ 文件的比对：首先使用 bowtie2.0.0-β7(2) 对 FASTQ 文件进行比对，使用以下参数：

[0371] bowtie2-D 18-R 0-L 28-N 1-i L,0,.32--mp 40,30

[0372] --score-min C,-132,0--gbar 3--rdg 80,2--rfg 80,5-k 10

[0373] -x GRCh37c_knownGene_pe500.juncs

[0374] -1read1.fastq.trimmed.txt-1 read2.fastq.trimmed.txt

[0375] --no-mixed-X 1000-p 4 - reorder

[0376] 以及 rg-id 和多种 rg 参数以鉴定样品，其中文件 GRCh37c_knownGene_pe500.juncs 是指上述基因组 / 转录组合并文件中的 (2)。

[0377] 没有映射、映射独立的 10 次（允许的最大值）或者在第 1 个或最后 2 个 bp 中具有错配的读出被视作是未对齐的，并再指向 FASTQ 文件，以使用 Tophat 再映射。所有其他读出均具有其编辑成使用基因组坐标的 BAM 文件，并除去合并的基因组 / 转录组文件导致的冗余映射。

[0378] 将通过最初的 Bowtie2 比对未对齐的读数与修改版本的 Tophat 版本 1.3 进行比对 (3)。修改主要是允许指出的杂交基因组 / 转录组 fasta 文件 ((1) 来自以上）作为输入，并将转录组映射的读数逆向转化成其在 tophat 内部的基因组位置。在迭代过程中还对从可能的单个 2 比对选择最佳成对比对的决策树过程进行修改，在降低碱基对错配数目方面加以最优化。最小修改包括对全长读数的分割和用于映射区段的侧翼序列的量进行修改。使用以下的示例变元以及适当的读出组参数调用 Tophat：

[0379] tophat--num-threads = 4-r-34--mate-std-dev 126

[0380] --bwt-idx-prefix = GRCh37c

[0381] --with-transcriptome-prefix = GRCh37c_knownGene_se.juncs

[0382] -G knownGene.refFlat.gtf--library-type fr-unstranded

[0383] --segment-length = 25--max-insertion-length 10

[0384] --max-deletion-length 10

[0385] -F 0.05-a 12--microexon-search--no-coverage-search--bowtie-e 45

[0386] --segment-mismatches 2--max-multihits 25

[0387] bowtie2_unaligned.1.fq.gz bowtie2_unaligned.2.fq.gz

[0388] 其中插入片段参数 (-r 和 --mate-std-dev) 根据经验从对合并的基因组 / 转录组的初始 bowtie2 映射推测。修改的 tophat 内的初始单端 bowtie 映射调用如下：

[0389] bowtie-q-e 45--nomaqround--sam--sam-nohead-p 4-k 25-m 25

[0390] GRCh37c_knownGene_se.juncs-<zcat left_kept_reads.fq.gz

[0391] 然后将来自 tophat 的 bam 输出 (accepted_hits.bam) 与来自初始 bowtie2 比对的输出合并，生成单个比对文件。然后仅仅将具有与人基因组 / 转录组的独特最佳比对的

读数对保留在最终的输出比对文件中（即，多映射读出、rRNA 读出和病毒读数从后续的分析中排除在外）。

[0392] RNA-Seq 抗性相关突变的发现

[0393] 使用获自 Picard 的 MarkDuplicates 工具将比对的 bam 文件标记用于复制读出。接下来，使用 GATK v1.5(4) 用于碱基质量再校准，使用 dbSNP137 作为已知位点和标准协变量和选项。使用 UnifiedGenotyper 从 GATK v1.5 调用变量，并注释用于标准质量度量，存在于 dbSNP137 中，NHLBI 外显子组测序项目 (ESP6500，Exome Variant Server，NHLBI GO 外显子组测序项目 (ESP)，Seattle，WA. 和 COSMIC v58(5)，以及函数使用 SnpEFF(6) 和全体转录数据库 GRCh37.68，获自 SnpEFF。然后滤出跨所有样品均一致的突变。对于每种变体的每种基因型（纯合子参考、杂合子和纯合子交替），所有样品将来自 UnifiedGenotyper 的后验似然分数输出相加；三个相加的分数的最小值表示每个变体 phred 比例的不一致度量；不一致小于 100 的那些变体从进一步的分析中排除在外，因为是在纯合性运行中发生的变体，在称作纯合子参考的样品中表现出交互等位基因的证据 (>10％)，或者在称作杂合子或纯合子交替的样品中具有平均小于 20％的来自交互等位基因的读数。如果变体不导致蛋白质编码基因的预测的变化，也将其除去。

[0394] 免疫印迹分析

[0395] 全细胞裂解物：将细胞在含有 Halt 蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物 (Thermo Scientific，cat#78440) 的 TPER 缓冲液 (Thermo Scientific，cat#78510) 中裂解，随后煮沸 5 分钟。每个道负载大约 20g 蛋白质，通过 SDS 聚丙烯酰胺电泳解析。将蛋白质转移到硝基纤维素膜上，在 5％低脂牛奶中封闭，并用 AR N-20(1:1000 稀释，Santa Cruz，cat#Sc-816)、组蛋白 H3(1:2000 稀释，Cell signaling，cat#9715s)、β-微管蛋白 (1:1000 稀释，Abcam，cat#ab6046)、HA-HRP(1:500，Roche，cat#12 013 819001)、β-肌动蛋白 (1:3000 稀释，Sigma，cat#A-2228) 和 p-AKT(1:1000 稀释，Cell signaling，cat#4060) 的抗体进行探测。将膜与辣根过氧化物酶 (HRP)-缀合的抗小鼠二级抗体 (1:4000 稀释，Millipore cat#12-348) 或抗兔二级抗体 (1:4000 稀释，Pierce，cat#31430) 孵育 1h，并使用 ECL 方法 (GE Healthcare) 使信号显影。

[0396] 核和胞质蛋白质分级：对于自发抗性克隆，将 1 百万 C1 和克隆 #1 细胞接种在 T75 瓶中补充有 10％ FCS 的 RPMI 1640 培养基中，并在用 DMSO、0.1nM R1881 或 10μM MDV3100 处理 24h 之前，使其生长 2 天。对于遗传改造的谱系，将 1 百万源自 LNCaP 的谱系接种在 T75 瓶中补充有 10％ FCShe 100ng ml-1Dox(Sigma，44577-1G) 的 RPM1 1640 培养基中，并在用 DMSO、0.1nM R1881 或 10μM MDV3100 处理 24h 之前，静置 2 天。备选地，抽出培养基，并用含有 10％ CSS 和 100ng ml-1Dox 的无酚红 RPMI 1640 培养基替换。在 10％ CSS 中生长 4 天之后，向瓶中加入 DMSO 或 10μM MDV3100，并放置过夜。次日，用胰蛋白酶收获细胞，以 500x g 离心 5 分钟，用 PBS 洗涤，转移至 1.5ml 微量离心管，通过以 500x g 离心 2-3 分钟沉淀。根据制造商说明书进行细胞质和细胞核蛋白质提取 (Thermo Scientific，cat#78833)。简言之，将沉淀再悬浮在 500μl 冰冷的 Cer I 缓冲液中，并在冰上孵育 10 分钟。孵育之后，加入 27.5μl 冰冷的 Cer II 缓冲液，涡旋并在冰上孵育 1 分钟。将裂解物 /Cer I/II 混合物再次涡旋，以 14000x g 离心 5 分钟，将胞质提取物（上清液）转移至预冷却的管中。将含有核的不溶性沉淀再悬浮在冰冷的 250μl NER 缓冲液中，涡旋，并置于冰上。样品每 10

分钟涡旋 15s，共计 40 分钟。孵育之后，将样品以 14000x g 离心 10 分钟。将含有核提取物的上清液转移至预冷却的管。对这些样品进行处理，用于上述的免疫印迹分析。

[0397] QuickChange 诱变

[0398] 将通过 PCR 扩增的 AR 编码区插入到 pcDNA3.1 中。使用 QuickChange XL 定点诱变试剂盒 (Agilent，cat#200517-5) 通过定点诱变，使用以下引物组产生单突变体 T877A、W741C、W741L、F876L 和双突变体 F876L/T877A 表达质粒：

[0399] (5'-GAGAGCTGCATCAGTTCGCTTTTGACCTGCTAATC-3'(SEQ ID NO:58) 和 5'-GATTAGCAGGTCAAAAGCGAACTGATGCAGCTCTC-3'(SEQ IDNO:59)，5'-CATTCAGTACTCCTGCATGGGGCTCATGGTG-3'(SEQ ID NO:60) 和 5'-CACCATGAGCCCCATGCAGGAGTACTGAATG-3'(SEQ ID NO:61)，5'-GTCATTCAGTACTCCCTGATGGGGCTCATGG-3'(SEQ ID NO:62) 和 5'-CCATGAGCCCCATCAGGGAGTACTGAATGAC-3'(SEQ ID NO:63)，5'-GAGAGCTGCATCAGCTCACTTTTGACCTG-3'(SEQ ID NO:64) 和 5'-CAGGTCAAAAGTGAGCTGATGCAGCTCTC-3'(SEQ ID NO:65)，5'-GAGAGCTGCATCAGCTCGCTTTTGACCTG-3'(SEQ ID NO:66) 和 5'-CAGGTCAAAAGCGAGCTGATGCAGCTCTC-3'(SEQ ID NO:67)。

[0400] 荧光素酶报道基因测定

[0401] 报道基因测定法如下进行：转染之前 24 小时，将 $3x10^5$HEK293T 细胞在补充有 10％ FCS 和 1x NEAA 的 DMEM 中接种在 6 孔板中。备选地，转染之前 24 小时，将 $1x10^6$VCaP 细胞或 $3x10^5$PC3 细胞在补充有 10％ CSS 的适当培养基中接种在 6 孔板中。次日，使用 Lipofectamine 2000(Invitrogen，cat#11668027) 对上述 400ng AR firefly 报道基因质粒 (4xARE-荧光素酶)、100ng 对照质粒 (组成型 renilla-荧光素酶表达质粒) 和 200ng AR 超量表达 pcDNA 质粒进行共转染。转染后 6 小时，将培养基用含有 DMSO、0.1nM R1881、10μM MDV3100、10μM 比卡鲁胺、10μM MDV3100+0.1nM R1881 和 10μM 比卡鲁胺 +0.1nM R1881 的新鲜培养基置换。处理之后～ 16 小时，收集细胞，使用 Glomax 96 微板光度计 (Promega) 进行荧光素酶活性测定。使用双荧光素酶测定试剂 (Promega，E1910) 将 Firefly 活性标准化至 Renilla。所有实验均进行至少 3 次。

[0402] 细胞生长测定

[0403] LNCaP 细胞

[0404] 短期微滴定板测定：将 1000 个细胞 (自发抗性或改造谱系) 接种在补充有 10％ FCS 的培养基中。对于自发抗性克隆，在接种日加入浓度增加的化合物，而对于改造谱系，在用强力霉素处理 2 天后加入化合物。在所有情形中，在化合物处理后 7 天，使用 CellTiter-Glo 发光细胞生存力测定试剂 (Promega，cat#G7573) 进行生长测定。

[0405] 长期集落形成测定：将 5000-7500 个细胞 (自发抗性或改造谱系) 在补充有 10％ FCS 的培养基中接种在 6 孔板中。对于自发抗性克隆，在接种日向板中加入 MdV3100，每周置换培养基 / 化合物。对于改造谱系，在接种日加入强力霉素，2 天之后加入多种浓度的化合物 (MDV3100/ 比卡鲁胺)。与自发抗性克隆类似，每周置换一次培养基 /dox/ 化合物。培养 3-4 周之后对活的集落进行染色。抽出培养基之后，向孔中加入 0.5％结晶紫并放置过夜。次日早晨，除去结晶紫溶液，将孔用 ddH_2O 小心洗涤以除去残余的染色溶液。在成像之前，将板风干过夜。

[0406] VCaP 细胞

[0407] 将表达 AR-T877A 或 -F876L/T877A 的 VCaP 细胞在补充有 10％ FCS 的 DMEM 中以

500,000 细胞 / 孔接种在 6 孔板中。在加入 DMSO 或 10 μM MDV3100 之前 2 天,使用强力霉素诱导 AR 质粒的表达。化合物处理之后 8 天,使用 CellTiter-Glo 发光细胞生存力测定试剂 (Promega, cat#G7573) 进行生长检验。数据与第 0 天比较 (施用化合物那天)。

[0408] Myc-CaP 细胞

[0409] 将携有 AR-T877A 或 -F876L/T877A 的 Myc-CaP 细胞在补充有 10% FCS 的 DMEM 中以 100 细胞 / 孔接种在 6 孔板中。向培养基中加入 0.2 μg/ml 强力霉素,以诱导 AR 的表达。每 3 天更换培养基,直至形成集落 (～ 2 周)。使用 0.1%结晶紫对集落进行染色。

[0410] 22RV1 细胞

[0411] 将 22Rv1 细胞在补充有 10% FCS 的 DMEM 中以 5000 细胞 / 孔接种在 6 孔板中。在用 0.1%结晶紫染色之前,将细胞用多种化合物处理 14 天。

[0412] 产生自发 MDV3100 抗性的 LNCaP 异种移植物

[0413] 将 10x 10^6LNCaP 细胞皮下植入到雄性阉割小鼠的侧腹中。肿瘤一旦达到 200-300mm^3,开始用载体或 30mg/kg MDV3100 进行处理。每天处理 3-4 个月之后,若干肿瘤自发获得在 MDV3100 的存在下生长的能力。当这些肿瘤达到～ 1000-1500mm^3时,将小鼠处死,收集肿瘤。随后将来自两种 MdV3100- 抗性肿瘤的肿瘤片段 (1 个片段来自小鼠 1,3 个片段来自小鼠 2) 再植入到第二受体中,再次开始用 MDV3100 治疗 (R1-R4)。此外,将来自小鼠 1 和 2 二者的单个肿瘤片段植入到待用载体 (C1-C2) 治疗的第二受体中。一旦其达到 1000-1500mm^3,自所有肿瘤收集 RNA,并如前文所述进行全转录组测序。

[0414] 参考文献

[0415] 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(Database issue):D130-5.Epub2011/11/29.

[0416] 2.Langmead B,Salzberg SL.Fast gapped-read alignment with Bowtie2. Nature methods.2012;9(4):357-9.Epub 2012/03/06.

[0417] 3.Trapnell C,Pachter L,Salzberg SL.TopHat:discovering splice junctions with RNA-Seq.Bioinformatics.2009;25(9):1105-11.Epub2009/03/18.

[0418] 4.DePristo MA,Banks E,Poplin R,Garimella KV,Maguire JR,Hartl C,等人.A framework for variation discovery and genotyping using next-generation DNA sequencing data.Nature genetics.2011;43(5):491-8.Epub 2011/04/12.

[0419] 5.Forbes SA,Bindal N,Bamford S,Cole C,Kok CY,Beare D,等人.COSMIC:mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer.Nucleic acids research.2011;39(Database issue):D945-50.Epub 2010/10/19.

[0420] 6.Cingolani P,Platts A,Wang le L,Coon M,Nguyen T,Wang L,等人.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.Epub 2012/06/26.

[0421] 实施例 2. 自发 MDV3100 抗性模型的开发和表征

[0422] 为了阐明 MDV3100 抗性的内源性机制,本公开内容描述了 LNCaP 细胞中自发抗性

的模型（图 1b）。尽管用 MDV3100 短期培养（<1.5 月）诱导群体范围的停滞（图 1a，FCS+MDV 相对于 FCS），用 1 μM MDV3100 长期培养使得一些细胞避开导致产生抗性克隆（图 1b）。选择表现出与对照群体（C1-C3，图 1b）类似的生长特性的抗性克隆进行进一步的表征。短期的基于 CTG（图 1c）和长期的集落形成测定证实了部分抗性表型。进一步的表征揭示，7 种抗性克隆中的 4 种（克隆 #1、15、19、24，强抗性，绿色曲线和字体）表现出显著更高的 MDV3100 抗性—聚集 IC_{50}>10 μM 与其余 3 种克隆（克隆 #9、10 和 14，弱抗性，红色曲线和字体）<10 μM 以及对照为 0.2 μM（图 1c）相比较。相反地，弱抗性克隆表现出较高的比卡鲁胺抗性（IC_{50}>10 μM vs 强抗性为 5 μM，对照为 1 μM）（图 1c），两组克隆对于不相关的细胞生长抑制剂 Lee011 均表现出与对照群体类似的敏感性（图 6b）。这些数据全体说明，分离的抗性克隆优先表现出对抗雄激素的抗性—强抗性克隆中的抗性机制微调成特异性地促进对 MDV3100 的抗性。

[0423] 为了阐明抗性机制，首先分析 AR 表达水平；之前已经显示 AR 的超量表达促进对阉割水平雄激素，和抗雄激素比卡鲁胺的抗性。Chen 等人，Nature Med. 10:33-39(2004)；和 Kawata 等人，Prostate 70:745-754(2010)。出乎意料地，本公开内容没有观察到 RNA（数据未示出）和蛋白质水平（图 1d）上 AR 表达的显著性变化。而且，AR 路径活性的全局分析显示在基线上几乎没有变化（图 1e），除了少数下游靶基因以外，累积地说明在基线上缺少 AR 路径的显著调节。

[0424] 实施例 3. 强抗性克隆抵抗通过 MDV3100 的 AR 路径调节

[0425] 为了进一步探讨驱动抗性的分子机制，本公开内容在用 DMSO 或 MDV3100 处理 24 小时的 3 个对照和 7 个抗性克隆上进行阵列分析。如预期，本公开内容发现了在用 MDV3100 处理时在三个对照中独特地差异性表达的许多基因（～ 101）—对于与细胞周期和 DNA 损伤修复有关的功能压倒性富集的基因—证实了其对 MDV3100 的细胞生长抑制作用的敏感性。本公开内容还发现了～ 191 个仅在对照和弱抗性克隆中表现显著差异表达的基因，其中下调的基因被富集用于细胞周期 /DNA 损伤和出乎意料地，雄激素受体核信号传导路径（$P = 2.01e^{-2}$）。这一发现提供了对通过 MDV3100 的雄激素路径的差异调节的最初一瞥，其中强抗性克隆明显表现出对调节的抗性。作为支持，聚类（图 6a）和 GSEA 分析（图 2b 和图 9b）均验证了用 MDV3100 处理时，对照和弱抗性谱系中 AR 路径活性降低，在强抗性克隆中观察到不显著的变化。这通过 qPCR 分析验证，其也证实了 MDV3100 对强抗性克隆中特异性的 AR 靶基因 KLK3、NKX3-1 和 SLC45A3 的表达的钝化作用（图 2c）。

[0426] 为了评价对 MDV3100 的差异路径响应是否平行于多种克隆中 AR 定位的变化，本公开内容从用 DMSO 或 MDV3100 处理的对照（C1）和强抗性克隆（克隆 #1）分离出胞质和核蛋白质级分。核 AR 定位在用 MDV3100 处理过的对照谱系中被显著损害，而在强抗性克隆中 AR 定位没有显著变化，为强抗性谱系中保持的 AR 路径活性提供了解释。总的来说，对多种克隆的分析揭示了两组之间的清楚的区别—一组在表型上更加敏感，在用 MDV3100 处理时表现出显著的 AR 路径途径损害，第二组在表型上和遗传上对 MDV3100 均更加有抗性。

[0427] 实施例 4. RNA-seq 分析发现了 AR 中与抗性有关的高复发突变

[0428] 尽管很清楚 AR 路径活性在强抗性克隆中对通过 MDV3100 的调节有抗性，但尚未清楚 1）该路径在 MDV3100 的存在下如何保持活性，和 2）保持的 AR 路径活性是否是强抗性克隆中观察到的抗性表型的原因。由于阵列分析没有鉴定出可以合理地解释保持的 AR 路

径活性的相关基因 / 路径，无意拘泥于任何具体理论，本公开内容推论可能 AR 路径组份中的突变可以使强抗性克隆对 MDV3100 脱敏。为了探讨这一可能性，本公开内容对上述谱系进行了 RNA-seq 分析，并包括了变得对 10 μM MDV3100 中的长期培养有自发抗性的若干谱系—类似于弱抗性克隆的这些克隆响应于 MDV3100 而持续显示 AR 路径调节。有趣的是，本公开内容发现了在大多数抗性克隆中共享、在对照群体中检测不到并且反之亦然的若干复发突变。该数据暗示，亲代 LNCaP 中至少两个种群的存在—大部分在表型上对 MDV3100 高度敏感，少数亚群有可能在许多代之前分支，累积了许多新的突变，在表型上对 MDV3100 抗性更强。基于每个克隆的突变谱的无监督聚类分析导致两种聚类——一种含有三个对照谱系和强抗性克隆 #19，第二种聚类所有其余的克隆。大多数克隆聚类在一起这一事实使得在没有先验知识的情况下鉴定驱动突变非常困难——但是，我们知晓的强抗性克隆中钝化的 AR 路径调节允许我们将我们的搜寻集中于这些克隆独特的突变。令人激动的是，本公开内容鉴定出所有四种共享的单个、复发的突变—AR 中的突变，MDV3100 的直接靶标。新的 F876L 突变位于 AR 的配体结合结构域中，是杂合的（图 11），并且与 LNCaP 细胞中之前存在的纯合型 T877A 突变——已知赋予氟他胺抗性的突变 (Fenton 等人，1997 ；and Hara et al. 2003) 相邻。突变体对野生型等位基因频率为大约 40％，克隆 #15 例外，其表现出 20％的最低频率。基因组 DNA 中 F876L 突变的存在通过 Sanger 测序得以证实（图 11）。

[0429] 实施例 5. 拮抗剂到激动剂转换的计算机建模和实验验证

[0430] 为了在功能上测试计算机建模产生的假设，本公开内容在反式激活测定中评价了野生型 ；单突变体 T877A、W741C、W741L 和 F876L ；和双突变体 F876L/T876A AR 对激动剂和抗雄激素比卡鲁胺和 MDV3100 的转录反应。作为对建模数据的支持，本公开内容发现，仅有 F876L 单突变体和 F876L/T877A 双突变体 AR 对 MDV3100 具有实质的反式激活反应 - 可与 0.1nM R1881 相比较 - 表明了对 MDV3100 有精妙特异性的拮抗剂到激动剂的转换。但是，这些数据与响应于 MDV3100 在强抗性克隆中观察到的路径调节的缺乏（图 2b-c）形成鲜明对比。这些表面上矛盾的结果可能部分因实验条件所致—尽管反式激活实验测定了不表达 AR 的谱系中单个等位基因的影响，强抗性克隆以杂合的方式具有 F876L 突变。为了测试 MDV3100 的拮抗剂到激动剂的转换是否也在强抗性克隆中观察到，本公开内容在剥夺了内源性雄激素的培养基中评价了转录反应—使基础 AR 路径活性最小并降低内源性 AR 对 MDV3100 的反应。与基于报道基因的测定法得到的观察结果同义，单独的或者与激动剂结合的 MDV3100 处理显著增强了强抗性克隆中的 KLK3 表达。这些数据总体上强烈暗示 F876L/T877A 突变允许突变体 AR 利用 MDV3100 作为激动剂—对 MDV1300 具有特异性的转换，因为保持对比卡鲁胺的敏感性。

[0431] 实施例 6.F876L/T877A 突变体 AR 在遗传改造的 LNCaP 中赋予对 MDV3100 的表型抗性

[0432] 尽管 F876L 和 F876L/T877A 等位基因可以在 MDV3100 的存在下有力地再激活 AR 路径，仍不清楚这一路径活性的挽救是否足以翻译成表型抗性—特别是在具有若干其他突变的强抗性克隆中。为了充分解决该问题，本公开内容将 LNCaP 细胞改造成诱导性表达 T877A、F876L/T877A 和 W741C/T877A 突变体 AR。如 qPCR 和 western 印迹分析所评价的，F876L/T877A AR 的表达水平显著低于 T877A 和 W41C/T877A 突变 AR 的表达水平。作为对之前报道的支持，所有具有 T877A 的突变体等位基因和 W741C/T877A 等位基因的表达分别促

进了羟基氟他胺 (Fenton 等人，1997；和 Hara 等人，2003)；和比卡鲁胺 (Hara 等人，2003) 特异性的拮抗剂到激动剂的转换 (图 15)。与之相对比，尽管 F876L/T877A 等位基因的表达弱，在 MDV3100 的存在下特异性地观察到 AR 路径活性的显著挽救，证实了拮抗剂到激动剂的转换 (图 5a 和图 15)。此外，T877A 和 W741C/T877A 等位基因的异位表达在 MDV3100 的存在下仅仅微弱地挽救 AR 信号传导，再一次确认了新的 F876L 突变的特异性和有力 (图 51 和图 15)。与基因表达数据相一致，当用 MDV3100 处理时在表达 T877A 的谱系中 AR 的核定位受到显著损伤，而在 F876L/T877A 谱系中 AR 的定位不受影响，证实了 F876L 谱系中保留的 AR 活性 (图 5b)。

[0433] 当在雄激素耗尽的条件下进行类似的实验时，实现了 F876L/T877A 突变体 AR 使用 MDV3100 作为激动剂的全部潜力。尽管 T877A 和 W741C/T877A 等位基因的表达最少地挽救路径活性，F876L/T877A 等位基因的表达在 MDV- 处理条件下将 KLK3 和 NKX3-1 增强 3-4 倍 (图 16a)。有趣的是，W741C/T877A AR 表现出组成型活性功能，在基线条件下驱动 KLK3 和 NKX3-1 的表达 (图 16)。以上观察到的表达水平的变化如实地平行于 AR 定位的变化——在用 MDV3100 处理之后 F876L/T877A AR 变得越来越多地核定位 (图 16b 和 5b)。再一次，W741C/T877A AR 表现出组成活性，因为在基线观察到增强的核定位 (图 5b)。

[0434] 已经牢牢确立了 F876L/T877A 突变体等位基因可以使用 MDV3100 作为激动剂，本公开内容接下来测试了 F876L/T877A AR 的异位表达是否可以赋予表型抗性。尽管 T877A 等位基因的表达没有挽救生长，F876L/T877A 等位基因的表达在 MDV3100 条件下显著地挽救了生长 (图 5c 和图 18a、b)。与较早的观察一致 (图 15)，F876L/T877A 超量表达谱系保持对比卡鲁胺敏感 (图 5c)。有趣的是，W741C/T877A 的异位表达还在 MDV3100 和比卡鲁胺处理条件下显著地挽救生长—对 MDV3100 的抗性可能是间接的，部分地由于其组成型活性 (图 5b，图 16)。

[0435] 实施例 7. 使用突变体 AR(F876) 筛选敏化突变体 AR 的药物：

[0436] 本公开内容应用的两种方法包括 1) 反式激活和 2) 基因表达分析以确定靶向 AR 路径的化合物是否可以用作突变体 AR 功能的抑制剂。两种方法均在方法部分中加以清楚的概述。

[0437] 简言之，对于反式激活测定法，在用 DMSO、所关注的激动剂或拮抗剂处理之前 4 小时，将 AR 报道基因、对照质粒和 WT 或突变体 AR 质粒共转染。AR 报道基因包括 ARE(AR 结合的雄激素反应元件序列)、启动子和报道基因，在该情形中为荧光素酶。处理之后 16h，对生物发光进行定量。本公开内容预计，WT AR 将会在 R1881(激动剂) 的存在下激活 AR 报道基因，在 MDV3100 或其他拮抗剂的存在下信号应当受到充分抑制。但是，对于 F876L AR，本公开内容预计在激动剂和 MDV3100 的存在下应有 AR- 报道基因活性的充分激活。我们的希望在于，新的拮抗剂将会以类似于比卡鲁胺的方式充分阻断 F876L AR 功能。

[0438] 除反式激活测定法以外，还可以对标准的 AR 基因例如 KLK3、TMPRSS2、NKX3-1 和 SLC45A3 的基因表达分析进行监测。该实验与图 5b 中概述的实验类似除了 MDV3100 可以置换成新的化合物之外。本公开内容预计，尽管 MDV3100 可以用作挽救信号传导的激动剂，新的化合物也可以在具有 F876-AR 的细胞中有效地保持信号传导活性的抑制。

[0439] 实施例 8：F876L 突变在遗传改造的 LNCaP 中足以诱导对 MDV3100 的遗传和表型抗性

[0440] 考虑到除 F876L 突变以外强抗性克隆还具有若干序列变体，我们想要正式测试 AF-F876L 变体是否足以促进 MDV3100- 抗性生长表型。出于该目的，将 LNCaP 细胞改造成诱导性地表达 T877A、F876L/T877A 和 W741C/T877A 突变体 AR。作为对之前报道的支持，所有具有 T877A 突变体等位基因和 W741C/T877A 等位基因的表达均分别促进羟基氟他胺 (Tan 等人，1997Mol. Endocrin. 11:450-9 ;Fenton 等人，1997Clin. Cancer Res. 3:1383-8 ; 和 Veldscholte 等人，1990Biochem. Biophys. Res. Comm. 173:534-40) 和比卡鲁胺 (Hara 等人，2003Cancer Res. 63:149-53) 特异性的拮抗剂到激动剂的转换，基于 AR 靶基因 KLK3(PSA) 的调节。

[0441] 尽管 AR-F876L/T877A 的表达略微较低，在 10％ FCS 培养条件下观察到显著的 AR 路径活性挽救，并在 10％ CSS 培养条件下观察到显著的激动剂作用。AR-F876L/T877A 对路径活性的影响紧密平行于 AR 定位的变化，因为在 10％ FCS 和 10％ CSS 两种培养条件下 AR-F876L/T877A 相对于 T877A 谱系均表现出更高的核流入 (MDV3100vs. DMSO)。出人意料地，我们还在 W741C/T877A 谱系中观察到显著的路径活性挽救，可能是由于双突变赋予的组成型活性功能如之前所报道 (Hara 等人，2003Cancer Res. 63:149-53)。已经确立 AR-F876L/T877A 可以使用 MDV3100 作为激动剂，我们接下来测试 AR-F876L/T877A 的异位表达是否足以赋予表型抗性。尽管在短期增殖测定中仅仅观察到生长的中等挽救，在长期集落形成测定中响应于 MDV3100 观察到强健的挽救，但响应于比卡鲁胺则没有。值得注意的是，W741C/T877A 谱系也在 MDV3100 的存在下表现出显著生长，与较早观察到的路径活性挽救相符。

[0442] 为了评价 T877A 突变对于抗性表型是否是必需的，对 LNCaP 细胞进行改造，以稳定地表达单突变体 AR-F876L。

[0443] 与反式激活数据相符，ARF876L 赋予对 MDV3100 的遗传和表型抗性，说明 F876L- 单独或者与 T877A 结合 - 同样能够赋予激动剂转换。

[0444] 实施例 9. AR-F876L 的抗性赋予作用可广泛应用于若干胰腺癌系

[0445] 考虑到 AR 中的 F876L 突变可以在 PTENnull LNCaP 细胞中促进对 MDV3100 的抗性，我们接下来探讨该突变是否足以在多种遗传背景的 PCa 系中广泛地赋予抗性。出于该目的，将人 VCaP (具有 TMPRSS2-ERG 融合和 AR 扩增) 和鼠 Myc-CaP (超量表达 Myc) 谱系转导成稳定地表达突变体 AR。

[0446] 与 LNCaP 细胞中观察到的抗性表型相一致，两种谱系也呈现出对 MDV3100 的部分抗性，说明 AR 中的 F876L 突变在多种遗传背景中具有赋予 MDV3100 抗性的潜力。

[0447] 总之，我们的数据说明了 AR-F876L、AR-F876L/T877A 和潜在组成型活性 AR 变体例如 W741C/T877A，作为 MDV3100 抗性驱动器的直接作用。尽管组成型活性变体可以混杂地促进对多种类别的抗雄激素的抗性，我们表明 AR 中的 F876L 突变选择性地促进 MDV3100 抗性。

[0448] 实施例 10. 具有 AR-F876L 的细胞在体内在阉割情形中对 MDV3100 有抗性

[0449] 已经显示 AR 中的 F876L 突变赋予可以促进抗性的 MDV3100 的激动剂转换，我们接下来探讨具有 F876L 的细胞在雄激素耗尽条件下是否变得细胞生长依赖于该转换，在临床上对于其他抗雄激素例如氟他胺已经观察到的依赖性 (Suzuki 等人，1996 Prostate 29:153-8)。有趣的是，尽管该转换在体外不驱动具有 F876L 的克隆的增殖，将具有 F876L

的细胞植入到阉割的雄性小鼠中时，我们观察到体内生长对 MDV3100 的显著依赖。尽管对照 (C1) 肿瘤在 MDV3100 处理时表现出即刻的停滞，抗性肿瘤 (克隆 #1) 未能生长直到由 MDV3100 刺激。具体地，在长期停滞之后，与载体组 15 只中的 2 只相比较，用 MDV3100 处理的 15 只小鼠中的 10 只发展出迅速生长的肿瘤 (P = 0.0078，Fisher 确切 t- 检验，双尾)，而评级为对照细胞 (C1) 的肿瘤是不可区分的 (15 只中 9 只 vs. 15 只中 10 只)。而且，抗性肿瘤在 MDV3100 的存在下继续生长，与较早的体外观察结果相符合，累积地表明具有 AR-F876L 的细胞在体内生长需要 MDV3100。在所有 4 组中在治疗期间没有观察到显著的体重损失。终点分子分析确认了在体内与 F876L 突变相关的 MDV3100 的拮抗剂转换，因为如 AR 靶基因表达所示，用 MDV3100 处理的抗性肿瘤相对于载体处理的抗性肿瘤表现出中等较高的 AR 路径活性，并且相对于载体处理的对照肿瘤表现出显著更高的活性。这些数据累积地突出了在雄激素耗尽的条件下具有 F876L 的细胞体内生长对 MDV3100 的依赖。

[0450] 实施例 11. 靶向 CDK4/6 作为克服 MDV3100 抗性的治疗策略

[0451] 已经确立 AR-F876L 在体内和体外在多种遗传背景下均可以促进 MDV3100 抗性，我们接下来致力于发展拮抗突变体等位基因的合理策略。作为开发继续靶向 AR 的高可突变的配体结合袋的新的抗雄激素的替代 (Balbas 等人，2013 eLife 2:e00499)，我们的目标在于鉴定可在临床上更加持久的治疗策略。出于该目的，在用 MDV3100 处理的强抗性克隆中，除“AR 激活”以外，我们还观察到属于“细胞周期”和“E2F1 激活”基因集的基因的显著富集，说明这些克隆在 MDV3100- 处理下通过 E2F1 靶基因的持续的表达可以潜在地保持增殖。这一假设是非常有吸引力的，因为 G1-S 过渡的关键调节物雄激素信号传导已知促进活性 CDK4/ 细胞周期蛋白 D1 组装，从而促进 E2F1 功能的激活 (Schiewer 等人，End. Relat. Cancer 19:1-12)。与这一概念相符合，我们在对照谱系中观察到 E2F1 靶基因 DHFR 和 TK1 的受 MDV3100- 处理抑制的表达，确认了 AR 信号传导是 E2F1 功能的调节物。与此相反，相对于对照谱系，具有 F876L 的细胞能够在 MDV3100- 处理条件下保持较高的 DHFR 和 TK1 表达 (图 6A)。基于这些数据，我们推论 E2F1 活性可以用作 AR 信号传导的下游效应器，并且如此，当导向 AR 的治疗变得无效时，E2F1 功能的调节物可以用作关键的治疗节点。与该假设相符合，我们发现，强抗性克隆 (图 6B) 和改造成表达 AR-F876L/T877A 的 LNCaP 谱系 (图 6C) 的生长对于 CDK4/6 抑制剂 LEE011 和 PD033299 与对比卡鲁胺同样敏感。有趣的是，对 CDK4/6 抑制的反应不仅限于具有 F876L 的细胞，因为不依赖于雄激素的 22Rv1 细胞—表达 WT AR 并在 MDV3100 处理条件下能保持 AR 信号传导以及 DHFR 和 TK1 的表达的 PCa 谱系 (图 6D)—也表现出对 CDK4/6 抑制的强敏感性 (图 6E)。这些数据累积地说明靶向 CDK4/6 功能可以作为治疗 MDV3100 抗性的多种机制的有效策略，并且可能一般是不依赖于雄激素的。

[0452] 实施方式

[0453] 1. 组合物，其包括包含雄激素受体的多肽或其片段或变体，所述多肽或其片段或变体包括或跨越位置 876，其中位置 876 处的氨基酸被置换或缺失或者不是苯丙氨酸 (F) (其中氨基酸的位置依据 SEQ ID NO:54 的编号)。

[0454] 2. 实施方式 1 的组合物，其中位置 876 处的氨基酸缺失。

[0455] 3. 实施方式 1 的组合物，其中位置 876 处的氨基酸是亮氨酸 (L)。

[0456] 4. 组合物，其包括包含雄激素受体的多肽或其片段或变体，所述多肽或其片段或变体包括或跨越位置 876，其中位置 876 处的氨基酸被置换或缺失或者不是苯丙氨酸 (F)

（其中氨基酸的位置依据 SEQ ID NO:54 的编号）；并且

[0457] 其中多肽或其片段或变体任选地在其他位置处包括一个或多个突变。

[0458] 5. 实施方式 4 的组合物，其中位置 877 处的氨基酸不是苏氨酸 (T)，位置 874 处的氨基酸不是组氨酸 (H)，位置 715 处的氨基酸不是缬氨酸 (V)，并且 / 或者位置 741 处的氨基酸不是色氨酸 (W)。

[0459] 6. 实施方式 4 的组合物，其中片段为至少 5 个、至少 6 个、至少 7 个、至少 8 个、至少 9 个、至少 10 个、至少 15 个、至少 20 个、至少 25 个、至少 30 个、至少 35 个、至少 40 个、至少 50 个、至少 60 个、至少 75 个、至少 100 个，或者至少 150 个、至少 200 个、至少 250 个、至少 300 个、至少 350 个、至少 400 个、至少 450 个、至少 500 个、至少 550 个、至少 600 个、至少 650 个、至少 700 个、至少 750 个、至少 800 个、至少 850 和 / 或至少 900 个氨基酸长。

[0460] 7. 实施方式 1 或 4 的组合物，其中片段或变体保留在 F876 或 F876 处缺少突变的野生型 AR 的至少一种活性。

[0461] 8. 组合物，其包括多肽，或其片段或变体，所述多肽或其片段或变体具有 SEQ ID NO:54 所示的序列，或者其不同之处在于 SEQ ID NO:54 中不多于 50％的残基处的一个或多个氨基酸缺失、添加、插入或置换的变体，使得多肽保留 SEQ ID NO:54 的多肽的至少一种活性。

[0462] 9. 组合物，其包括多肽，或其片段或变体，所述多肽或其片段或变体具有 SEQ ID NO:54 所示的序列，或者其不同之处在于 SEQ ID NO:54 中不多于 1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％或 50％的残基处的一个或多个氨基酸缺失、添加、插入或置换的变体，使得所述多肽保留 SEQ ID NO:54 的多肽的至少一种活性。

[0463] 10. 实施方式 9 的组合物，其中片段包括 SEQ ID NO:54 的至少 10 个连续氨基酸。

[0464] 11. 实施方式 9 的组合物，其中片段包括 SEQ ID NO:54 的至少 15 个连续氨基酸。

[0465] 12. 组合物，其包括多肽，或其片段或变体，其中多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO:54 所示，其中所述序列在 SEQ ID NO:54 的氨基酸位置 876 处含有突变或者跨越 SEQ ID NO:54 的氨基酸位置 876 使得位置 876 处的氨基酸被置换或缺失或者不是苯丙氨酸 (F)，其中任选地位置 877 处的氨基酸不是苏氨酸 (T)，位置 874 处的氨基酸不是组氨酸 (H)，位置 715 处的氨基酸不是缬氨酸 (V)，并且 / 或者位置 741 处的氨基酸不是色氨酸 (W)，并且其中片段的序列包括 SEQ ID NO:54 的至少 5、10 或 15 个连续氨基酸，并包括位置 876。

[0466] 13. 包括多肽的组合物，所述多肽包括包含 SEQ ID NO:3 至 53 中任意者的序列。

[0467] 14. 检测来自患者的样品中 AR 多核苷酸或者多肽中位置 F876 处的突变的方法，该方法包括以下步骤：(a) 自患者取得包括 AR 的样品；和 (b) 测定 AR 多核苷酸或多肽或其部分的序列，以确定 AR 是否在位置 F876 处包括突变。

[0468] 15. 诊断、预后和 / 或治疗患者的方法，该方法包括以下步骤：(a) 自患者取得包括 AR 的样品；(b) 测定 AR 多核苷酸或多肽或其部分的序列，以确定 AR 是否在位置 F876 处包括突变；和 (c) 如果 AR 在 F876 处不包括突变，施用或推荐施用包括 MDV3100 的治疗组合物；或者如果 AR 在 F876 处包括突变，施用或推荐施用不包括 MDV3100 的治疗组合物。

[0469] 16. 实施方式 15 的方法，其中不包括 MDV3100 的治疗组合物包括比卡鲁胺或 CDK4/6 抑制剂例如 LEE011 或 PD0332991，或者治疗性核酸。

[0470] 17. 诊断、预后和/或治疗患者的方法，该方法包括以下步骤：(a) 确定患者中雄激素受体或其片段的位置 741 和 877 处的氨基酸是否分别是色氨酸 (W) 和苏氨酸 (T)；(b) 对患者推荐施用和/或施用 (1) 比卡鲁胺或 MDV3100 如果位置 741 和 877 处的氨基酸分别是色氨酸 (W) 和苏氨酸 (T)；或者 (2) 不是比卡鲁胺或 MDV3100 的前列腺疾病治疗如果位置 741 和 877 处的氨基酸不分别是色氨酸 (W) 和苏氨酸 (T)。18. 实施方式 17 的方法，其中不包括比卡鲁胺或 MDV3100 的治疗包括 CDK4/6 抑制剂例如 LEE011 或 PD0332991 或者治疗性核酸。

[0471] 18. 多核苷酸或反义多核苷酸，其包括至少 15 个连续核苷酸，所述至少 15 个连续核苷酸包括 0、1、2 或 3 个错配，具有以下序列和/或具有与以下序列互补的序列：编码包括位置 876 的 SEQ ID NO:54 的至少 5 个连续氨基酸的第一序列，其中位置 876 处的氨基酸被置换或缺失并且是苯丙氨酸 (F) 以外的氨基酸。

[0472] 19. 实施方式 18 的多核苷酸，其中第一序列编码 SEQ ID NO:2 的至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 个连续氨基酸，其中至少 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14 或 15 个连续氨基酸包括或跨越 SEQ ID NO:2 的位置 876，并且其中位置 876 处的氨基酸不是苯丙氨酸 (F)，并且其中任选地，位置 877 处的氨基酸不是苏氨酸 (T)，位置 874 处的氨基酸不是组氨酸 (H)，位置 715 处的氨基酸不是缬氨酸 (V)，并且/或者位置 741 处的氨基酸不是色氨酸 (W)。

[0473] 20. 表达构建物或载体，其包括实施方式 18 或 19 的多核苷酸。

[0474] 21. 宿主细胞，其包括实施方式 20 的表达构建物或载体。

[0475] 22. 多核苷酸，其编码包括 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的突变体雄激素受体，除了编码的突变体雄激素受体蛋白在 SEQ ID NO:2 的位置 876 处含有亮氨酸 (L) 之外。

[0476] 23. 表达构建物或载体，其包括：启动子；和编码突变体雄激素受体或其片段的多核苷酸区段，其中雄激素受体的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示，其中所述序列在 SEQ ID NO:2 的氨基酸位置 876 处含有突变，使得位置 876 处的氨基酸不是苯丙氨酸 (F)，并且其中，任选地，位置 877 处的氨基酸不是苏氨酸 (T)，874 处的氨基酸不是组氨酸 (H)，位置 715 处的氨基酸不是缬氨酸 (V)，并且/或者位置 741 处的氨基酸不是色氨酸 (W)，并且其中片段的序列包括 SEQ ID NO:2 的至少 5 个连续氨基酸并包括位置 876，其中多核苷酸区段位于启动子的下游，其中多核苷酸区段的转录在启动子处起始。

[0477] 24. 分离的多核苷酸，其中分离的多核苷酸或其互补序列编码 SEQ ID NO:54 的至少 10、15 或 20 个连续氨基酸，其中至少 10 个连续氨基酸包括或跨越 SEQ ID NO:54 的位置 876，并且其中位置 876 处的氨基酸被置换或缺失或者不是苯丙氨酸 (F)。

[0478] 25. 宿主细胞，其包括包含启动子；和实施方式 22 或 24 的多核苷酸的构建物。

[0479] 26. 测定细胞对 MDV3100 的敏感性的方法，该方法包括：

[0480] (a) 若有的话，确定细胞中雄激素受体中位置 876 处的氨基酸，其中位置 876 根据 SEQ ID NO:54 的编号确定；

[0481] (b) 若有的话，将位置 876 处的氨基酸与野生型雄激素受体比较，其中不存在氨基酸或存在苯丙氨酸以外的氨基酸提示细胞对 MDV3100 不敏感。

[0482] 27. 实施方式 26 的方法，其中细胞是前列腺癌细胞、乳腺癌细胞或其他的 AR-相关疾病细胞。

[0483] 28. 实施方式 27 的方法，其中 AR- 相关疾病是聚谷氨酸病、秃头症、良性前列腺增生、多毛症、痤疮、脊髓和肌肉萎缩症或肯尼迪病。

[0484] 29. 预测 AR- 相关疾病的患者对使用 MDV3100 的治疗的敏感性的方法，该方法包括：

[0485] (a) 若有的话，确定患者中或获自患者的样品中雄激素受体中位置 876 处的氨基酸，其中位置 876 根据 SEQ ID NO:54 的编号确定；

[0486] (b) 若有的话，将位置 876 处的氨基酸与野生型雄激素受体比较，其中不存在氨基酸或存在苯丙氨酸以外的氨基酸提示患者对 MDV3100 不敏感。

[0487] 30. 实施方式 29 的方法，其中 AR- 相关疾病是前列腺癌或乳腺癌。

[0488] 31. 实施方式 29 的方法，其中 AR- 相关疾病是聚谷氨酸病、秃头症、良性前列腺增生、多毛症、痤疮、脊髓和肌肉萎缩症或肯尼迪病。

[0489] 32. 治疗具有 AR- 相关疾病的患者的方法，该方法包括：

[0490] (a) 若有的话，确定患者中或获自患者的样品中雄激素受体中位置 876 处的氨基酸，其中位置 876 根据 SEQ ID NO:54 的编号确定；

[0491] (b) 若有的话，将位置 876 处的氨基酸与野生型雄激素受体比较，其中不存在氨基酸或存在苯丙氨酸以外的氨基酸提示患者对 MDV3100 不敏感；

[0492] (c) 如果 876 处的氨基酸不是苯丙氨酸，施用不包括 MDV3100 的治疗；或者如果 876 处的氨基酸是苯丙氨酸，施用包括 MDV3100 的治疗；和

[0493] (d) 测定疾病进展或缓解。

[0494] 33. 实施方式 32 的方法，其中 AR- 相关疾病是前列腺癌或乳腺癌。

[0495] 34. 实施方式 32 的方法，其中 AR- 相关疾病是聚谷氨酸病、秃头症、良性前列腺增生、多毛症、痤疮、脊髓和肌肉萎缩症或肯尼迪病。

[0496] 35. 测定细胞对 MDV3100 的敏感性的方法，该方法包括：

[0497] (a) 若有的话，确定细胞中雄激素受体中位置 741 和 877 处的氨基酸，其中位置 741 和 877 根据 SEQ ID NO:54 的编号确定；

[0498] (b) 若有的话，将位置 741 和 877 处的氨基酸与野生型雄激素受体比较，其中在位置 741 处不存在氨基酸或存在色氨酸 (W) 以外的氨基酸和在位置 877 处不存在氨基酸或存在苏氨酸 (T) 以外的氨基酸共同提示细胞对 MDV3100 不敏感。

[0499] 36. 实施方式 35 的方法，其中细胞是前列腺癌细胞、乳腺癌细胞或其他 AR- 相关疾病细胞。

[0500] 37. 实施方式 35 的方法，其中 AR- 相关疾病是聚谷氨酸病、秃头症、良性前列腺增生、多毛症、痤疮、脊髓和肌肉萎缩症或肯尼迪病。

[0501] 38. 预测 AR- 相关疾病的患者对使用 MDV3100 的治疗的敏感性的方法，该方法包括：

[0502] (a) 若有的话，确定患者中或获自患者的样品中雄激素受体中位置 741 和 877 处的氨基酸，其中位置 741 和 877 根据 SEQ ID NO:54 的编号确定；

[0503] (b) 若有的话，将位置 741 和 877 处的氨基酸与野生型雄激素受体比较，其中在位置 741 处不存在氨基酸或存在色氨酸 (W) 以外的氨基酸和在位置 877 处不存在氨基酸或存在苏氨酸 (T) 以外的氨基酸共同提示患者对 MDV3100 不敏感。

[0504] 39. 实施方式 38 的方法，其中 AR- 相关疾病是前列腺癌或乳腺癌。

[0505] 40. 实施方式 38 的方法，其中 AR- 相关疾病是聚谷氨酸病、秃头症、良性前列腺增生、多毛症、痤疮、脊髓和肌肉萎缩症或肯尼迪病。

[0506] 41. 治疗具有 AR- 相关疾病的患者的方法，该方法包括 ：

[0507] (a) 若有的话，确定患者中或获自患者的样品中雄激素受体中位置 741 和 877 处的氨基酸，其中位置 741 和 877 根据 SEQ ID NO:54 的编号确定 ；

[0508] (b) 若有的话，将位置 741 和 877 处的氨基酸与野生型雄激素受体比较，其中在位置 741 处不存在氨基酸或存在色氨酸 (W) 以外的氨基酸和在位置 877 处不存在氨基酸或存在苏氨酸 (T) 以外的氨基酸共同提示患者对 MDV3100 不敏感 ；

[0509] (c) 如果位置 876 处的氨基酸不是苯丙氨酸，施用不包括 MDV3100 的治疗 ；或者如果位置 741 和 877 处的氨基酸是苯丙氨酸，施用包括 MDV3100 的治疗 ；和

[0510] (d) 测定疾病进展或缓解。

[0511] 42. 实施方式 41 的方法，其中 AR- 相关疾病是前列腺癌或乳腺癌。

[0512] 43. 实施方式 41 的方法，其中 AR- 相关疾病是聚谷氨酸病、秃头症、良性前列腺增生、多毛症、痤疮、脊髓和肌肉萎缩症或肯尼迪病。

[0513] 44. 治疗具有雄激素受体 (AR)- 相关疾病的患者的方法，其中 AR 的位置 876 处的氨基酸不存在或者不是苯丙氨酸，并且其中方法包括施用不包含 MDV3100 的治疗组合物的步骤。

[0514] 45. 实施方式 44 的方法，其中不包括 MDV3100 的治疗组合物包括比卡鲁胺或 CDK4/6 抑制剂例如 LEE011 或 PD0332991，或者治疗性核酸。

[0515] 46. 实施方式 41 的方法，其中 AR- 相关疾病是前列腺癌或乳腺癌。

[0516] 47. 实施方式 41 的方法，其中 AR- 相关疾病是聚谷氨酸病、秃头症、良性前列腺增生、多毛症、痤疮、脊髓和肌肉萎缩症或肯尼迪病。

[0517] 48. 治疗具有雄激素受体 (AR)- 相关疾病的患者的方法，其中 AR 的位置 741 和 877 处的氨基酸是苯丙氨酸，并且其中方法包括施用包括 MDV3100 的治疗组合物的步骤。

[0518] 49. 实施方式 48 的方法，其中 AR- 相关疾病是前列腺癌或乳腺癌。

[0519] 50. 实施方式 48 的方法，其中 AR- 相关疾病是聚谷氨酸病、秃头症、良性前列腺增生、多毛症、痤疮、脊髓和肌肉萎缩症或肯尼迪病。

[0520] 51. 治疗具有雄激素受体 (AR)- 相关疾病的患者的方法，其中 AR 的位置 876 处的氨基酸不存在或者不是苯丙氨酸，并且其中方法包括施用包括 CDK4/6 抑制剂的治疗组合物的步骤。

[0521] 52. 实施方式 51 的方法，其中 CDK4/6 抑制剂是 LEE011 或 PD0332991。

[0522] 53. 实施方式 51 的方法，其中 AR- 相关疾病是前列腺癌或乳腺癌。

[0523] 54. 实施方式 51 的方法，其中 AR- 相关疾病是聚谷氨酸病、秃头症、良性前列腺增生、多毛症、痤疮、脊髓和肌肉萎缩症或肯尼迪病。

[0524] 55. 治疗具有雄激素受体 (AR)- 相关疾病的患者的方法，其中 AR 是野生型或者其中 AR 的位置 876 处的氨基酸不存在或者不是苯丙氨酸，并且其中方法包括施用包括 CDK4/6 抑制剂的治疗组合物的步骤。

[0525] 56. 实施方式 51 的方法，其中 CDK4/6 抑制剂是 LEE011 或 PD0332991。

[0526] 57. 实施方式 51 的方法，其中 AR- 相关疾病是前列腺癌或乳腺癌。

[0527] 58. 实施方式 51 的方法，其中 AR- 相关疾病是聚谷氨酸病、秃头症、良性前列腺增生、多毛症、痤疮、脊髓和肌肉萎缩症或肯尼迪病。

[0528] 59. 实施方式 55 的方法，其中 CDK4/6 抑制剂抑制表达雄激素受体的细胞系的体外或者体内生长，其中雄激素受体的位置 876 处的氨基酸不存在或者不是苯丙氨酸。

[0529] 60. 实施方式 59 的方法，其中生长抑制通过增殖速率、集落测定、显微测定和 / 或图像分析确定。

[0530] 除非另外定义，本文所用的科技术语的意义与本公开内容所述领域技术人员通常所理解的相同。除非另外指出，所有未具体详述的方法、步骤、技术和操作可以本身已知的方式进行或已进行，这对技术人员来说将会是显而易见的。例如，再次参考本文所提及的标准手册和普通背景技术，以及其中引用的进一步的参考文献。除非另外指出，本文应用的各参考文献均全文并入作为参考。

[0531] 权利要求是非限定性的，提供如下。

[0532] 尽管在此详细公开了具体的实施方式和权利要求，其仅仅出于说明目的通过例子进行，就所附权利要求的范围或者任何未来相关申请的权利要求主题的范围而言，并无意于加以限定。具体地，发明人预计，可以在不偏离权利要求所定义的公开内容的精神和范围的前提下进行多种置换、变更和修改。核酸起始原料、所关注克隆或文库类型的选择据信对于具有本文所述实施方式的知识的本领域普通技术人员来说是常规的。其他的方面、优势和修改被视作在以下权利要求的范围以内。本领域技术人员将会在至多使用常规实验的情况下认识到或者能够确认本文所述公开内容的具体实施方式的许多等同方式。这些等同方式也要包括在所附权利要求内。后续提交的相关申请中权利要求范围的重新撰写可能是由于多国专利法的限制，不应当理解为放弃权利要求的主题。

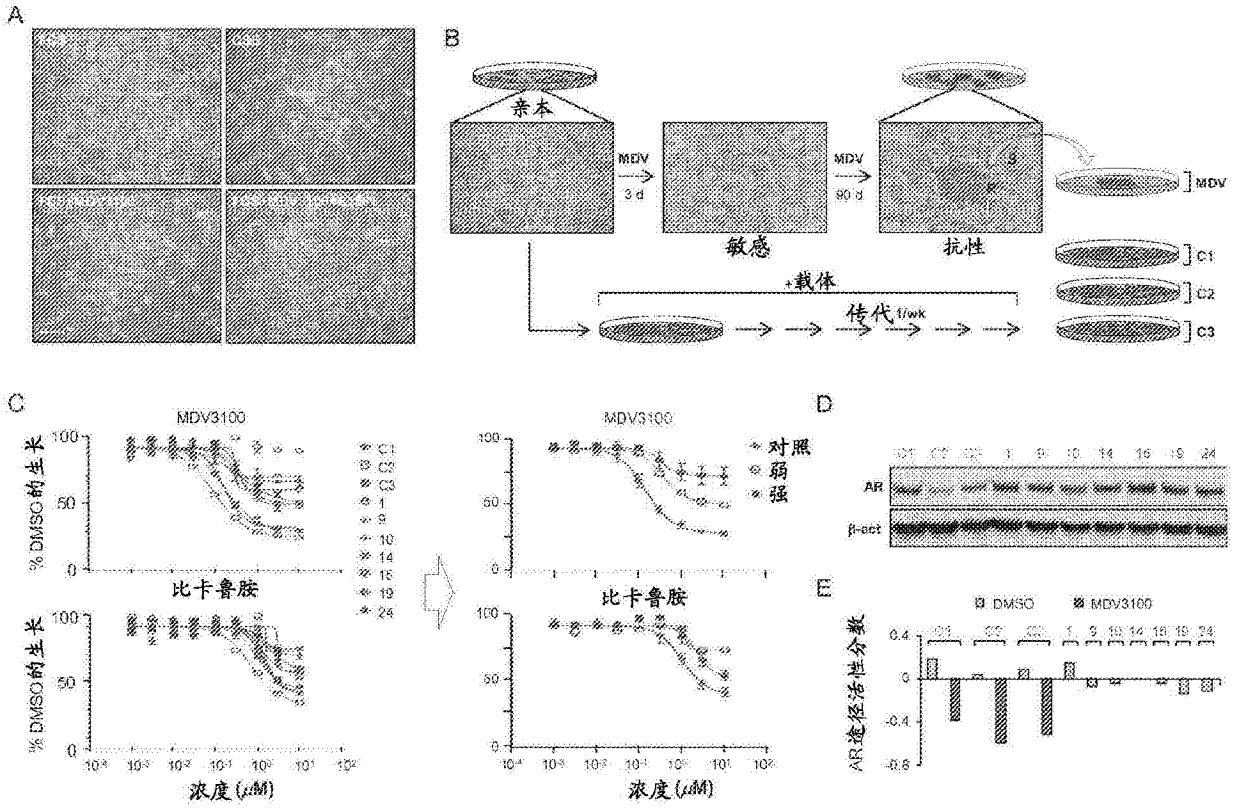

A
B
亲本
MDV
3 d
MDV
90 d
敏感
抗性
MDV
C1
C2
C3
+载体
传代 1/wk
C
MDV3100
% DMSO的生长
比卡鲁胺
浓度 (μM)
C1
C2
C3
1
9
10
14
16
19
24
对照
弱
强
D
AR
β-act
E
DMSO
MDV3100
AR通路活性分数

图 1

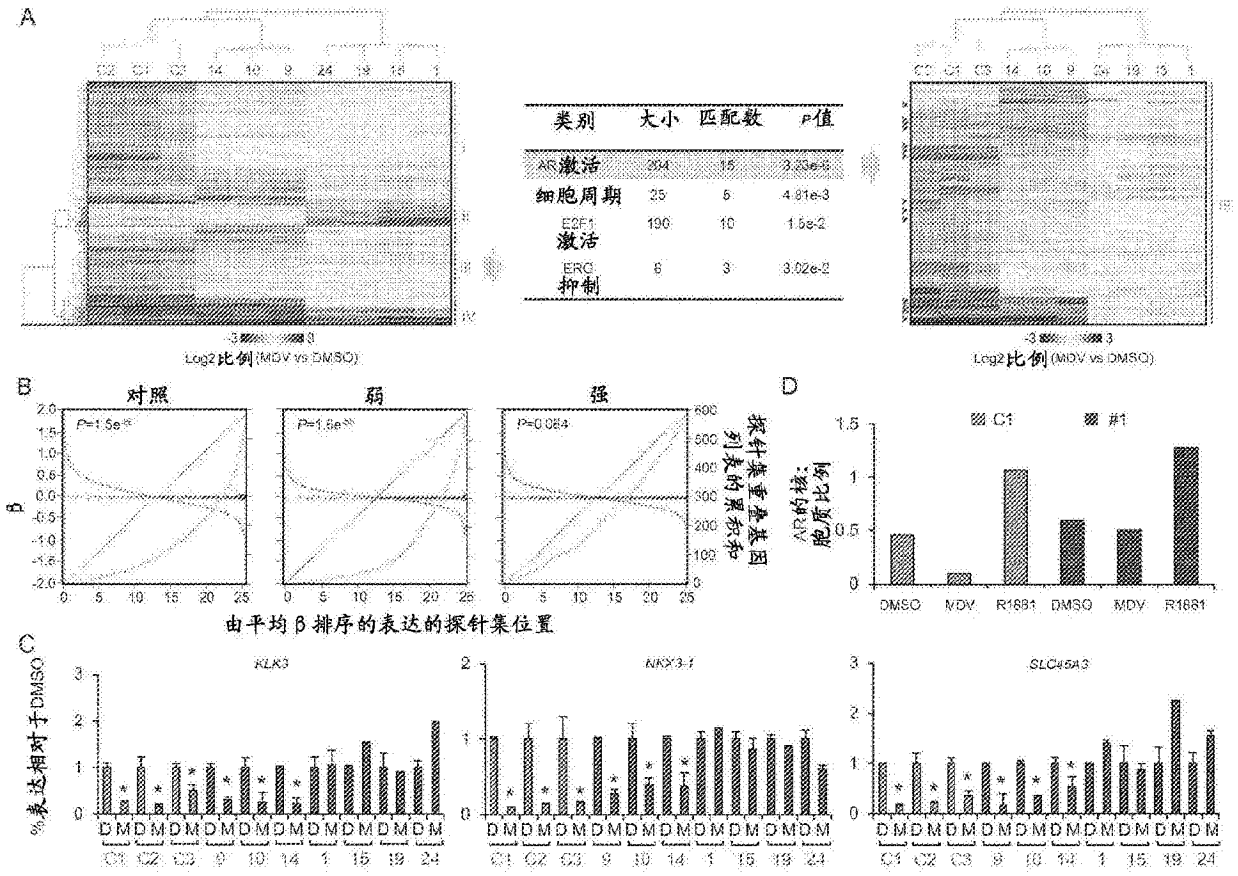

A
C2 C1 C3 14 10 9 24 19 15 1
I
II
III
IV
-3 3
Log2比例(MDV vs DMSO)
类别 大小 匹配数 P值
AR激活 264 15 3.23e-3
细胞周期 25 5 4.81e-3
E2F1激活 190 10 1.5e-2
ERG抑制 6 3 3.02e-2
B
对照
弱
强
P=1.5e-6
P=1.6e-3
P=0.084
β
探针集重叠基因列表的累积和
由平均β排序的表达的探针集位置
C
%表达相对于DMSO
KLK3
NKX3-1
SLC45A3
D
C1
#1
AR的细胞比例
DMSO MDV R1881 DMSO MDV R1881

图 2

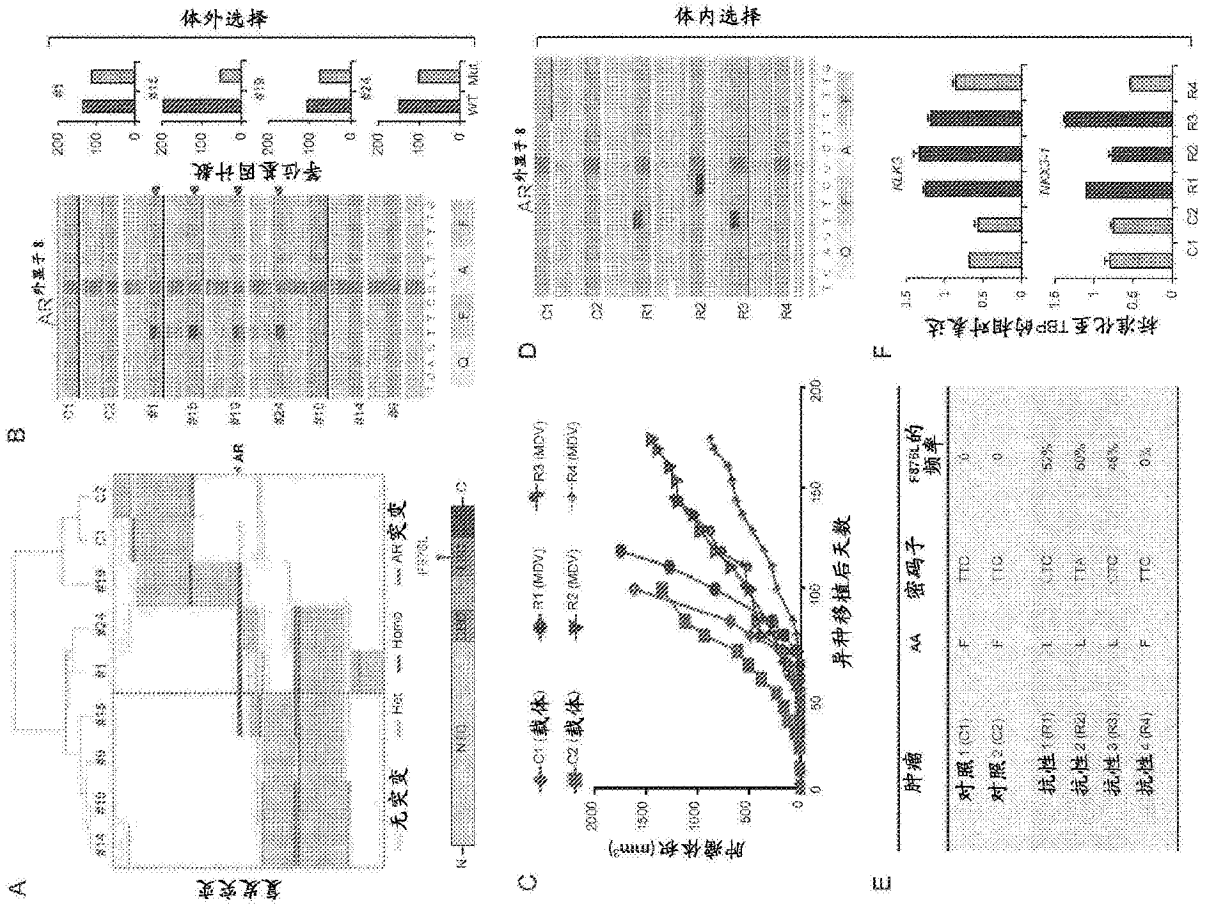


图 3

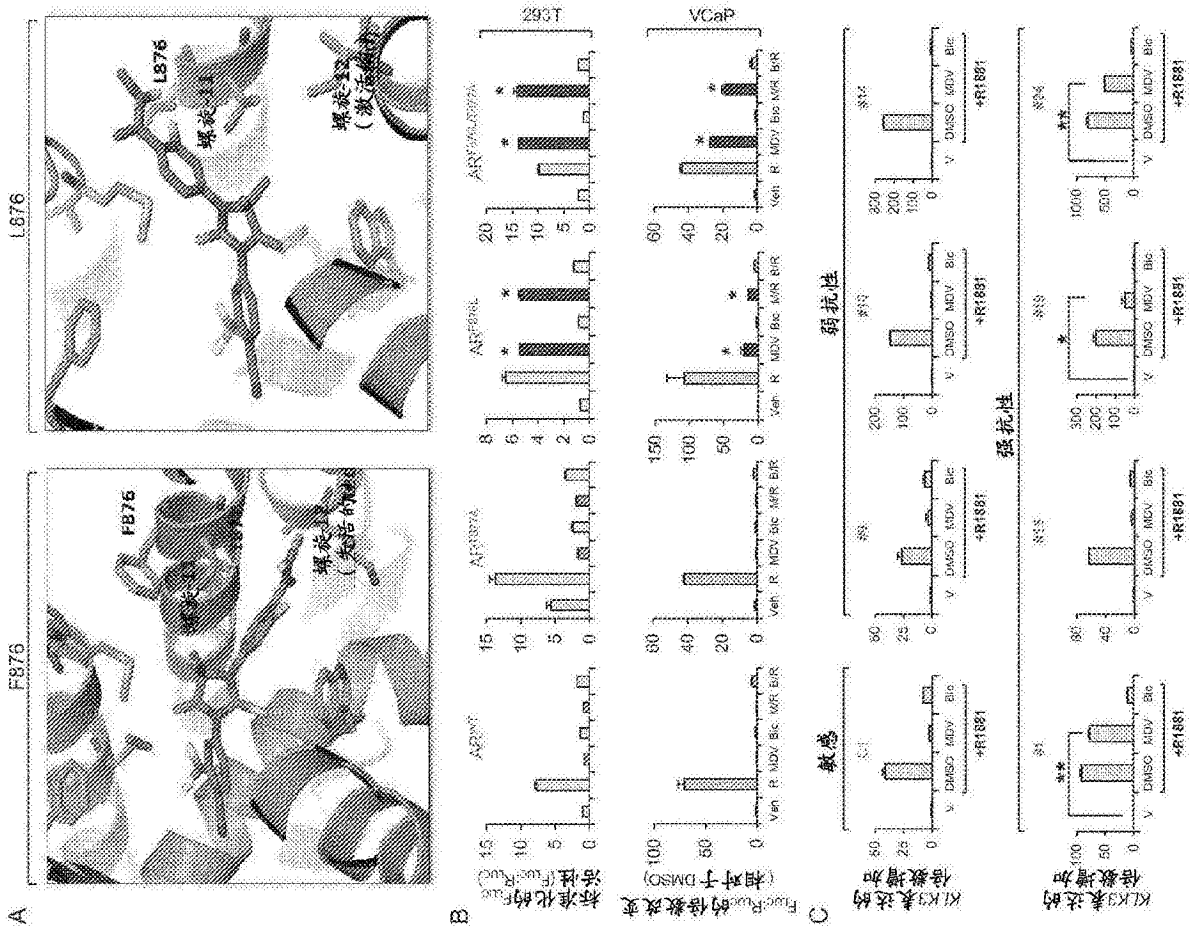

A
F876
L876
螺旋12
螺旋11
螺旋12
（激活的）
B
293T
VCaP
AR-WT
AR-F876L
AR-V576A/F876L
标准化的荧光素酶（FLuc）/R荧光素酶（RLuc）活性
相对于DMSO的倍数变化
Veh R MDV Bic M/R B/R
C
敏感
弱抗性
强抗性
KLK3表达的倍数增加
DMSO MDV Bic
+R1881

图 4

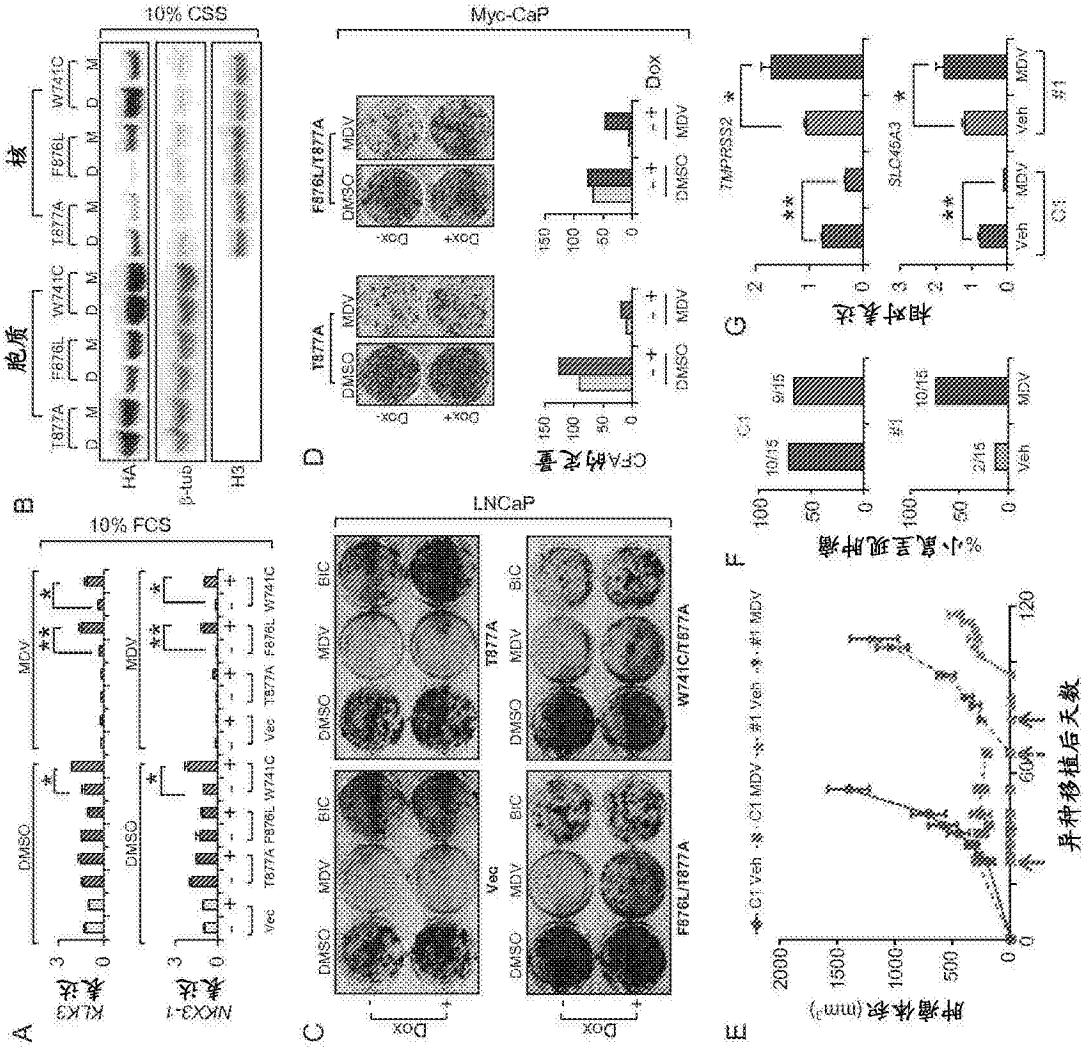


图 5

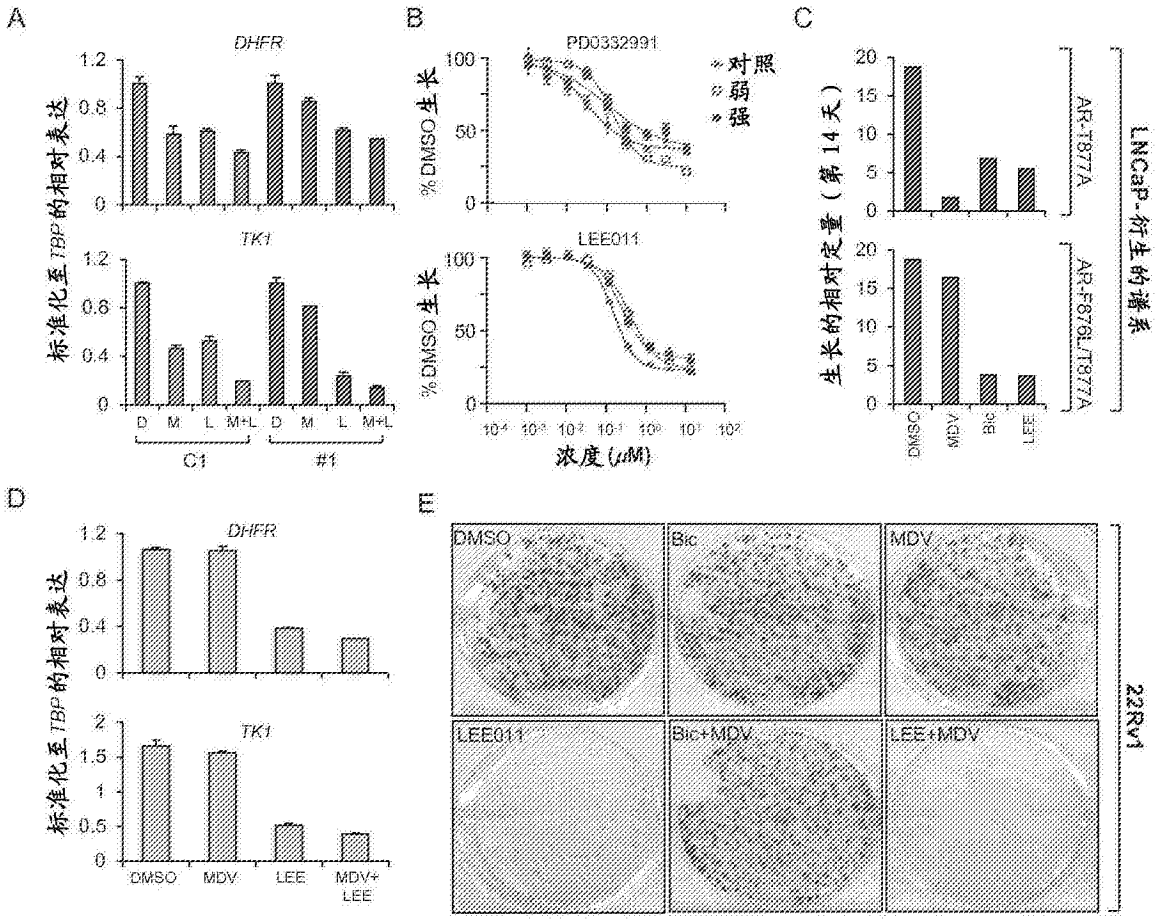

A
DHFR
TK1
标准化至 TBP 的相对表达
D M L M+L D M L M+L
C1
#1
B
PD0332991
LEE011
% DMSO 生长
浓度 (μM)
对照
弱
强
C
生长的相对定量 (第 14 天)
AR-T877A
AR-F876L/T877A
LNCaP- 衍生的谱系
DMSO
MDV
Bic
LEE
D
DHFR
TK1
标准化至 TBP 的相对表达
DMSO
MDV
LEE
MDV+ LEE
E
DMSO
Bic
MDV
LEE011
Bic+MDV
LEE+MDV
22Rv1

图 6

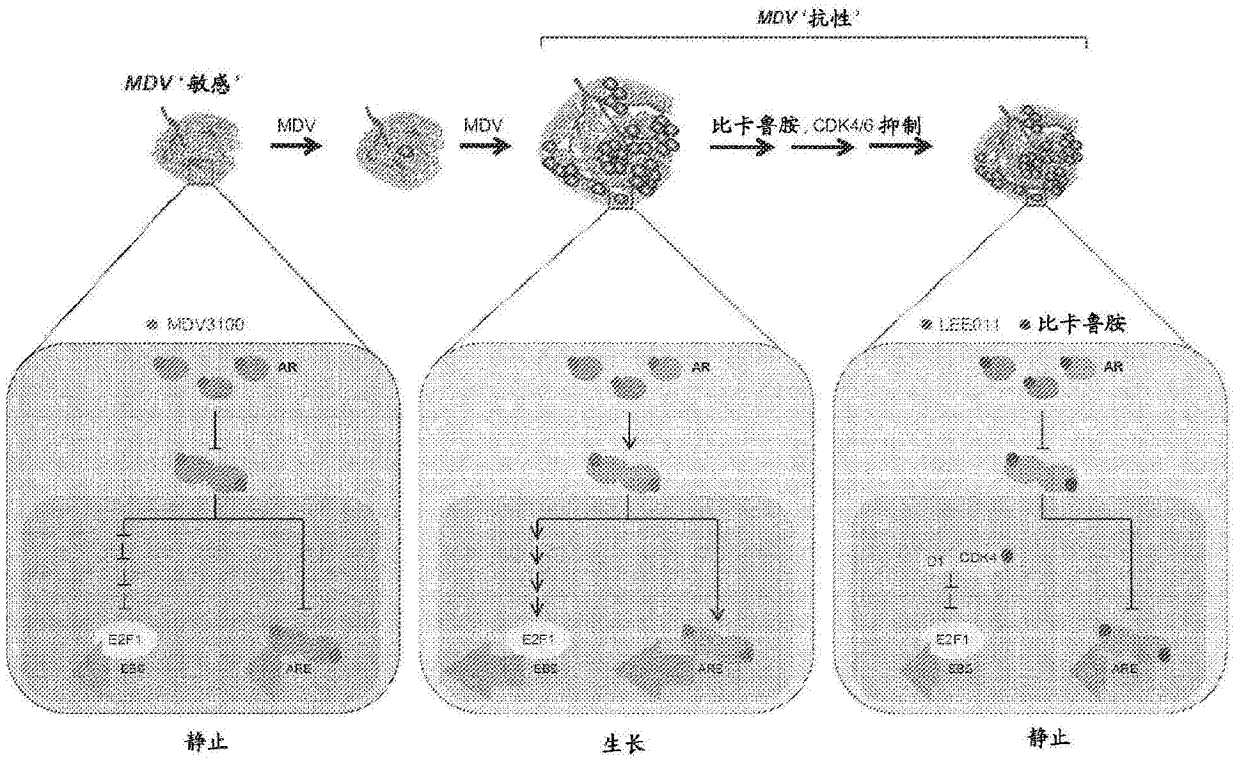

MDV'抗性'
MDV'敏感'
MDV
MDV
比卡鲁胺, CDK4/6 抑制
MDV3100
AR
E2F1
ARE
静止
AR
E2F1
ARE
生长
LEE011
比卡鲁胺
AR
D1
CDK4
E2F1
ARE
静止

图 7

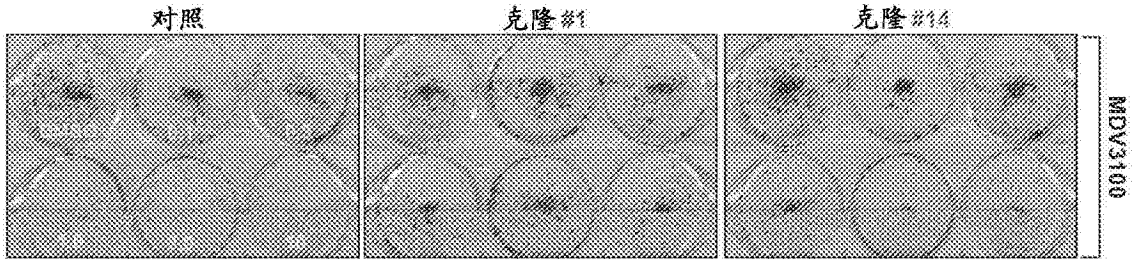

对照
克隆#1
克隆#14
MDV3100

图 8

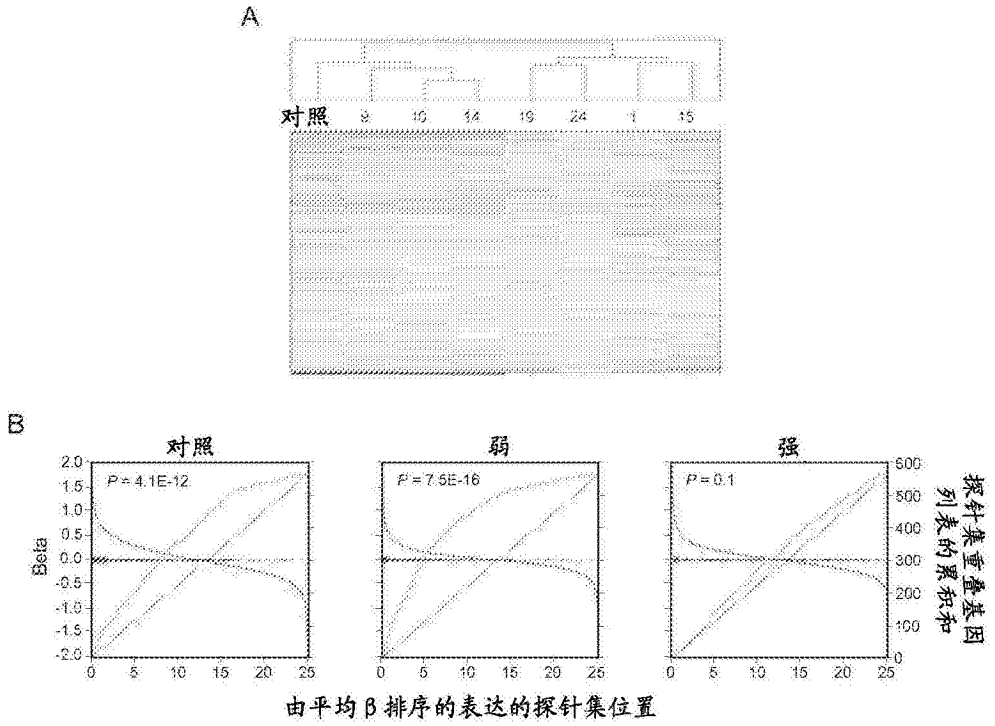

A
对照
B
对照
弱
强
P = 4.1E-12
P = 7.5E-16
P = 0.1
Beta
探针集重叠基因列表的累积和
由平均β排序的表达的探针集位置

图 9

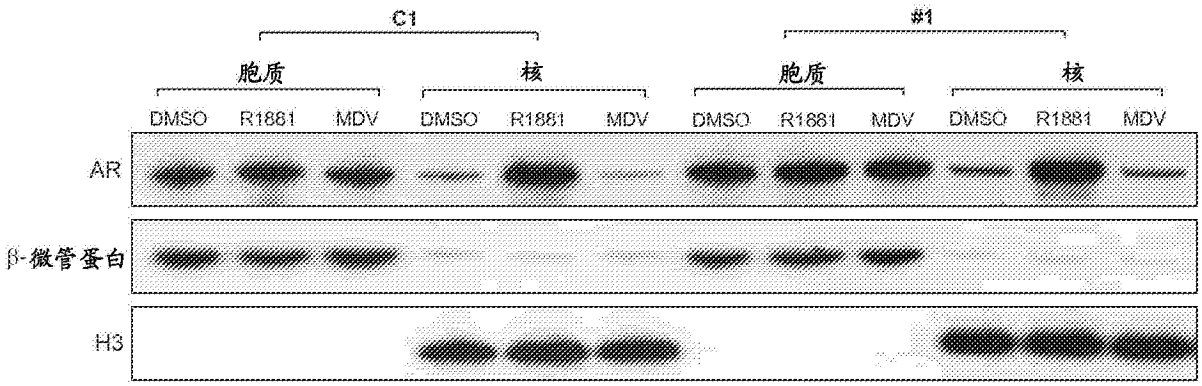

C1
#1
胞质
核
胞质
核
DMSO
R1881
MDV
DMSO
R1881
MDV
DMSO
R1881
MDV
DMSO
R1881
MDV
AR
β-微管蛋白
H3

图 10

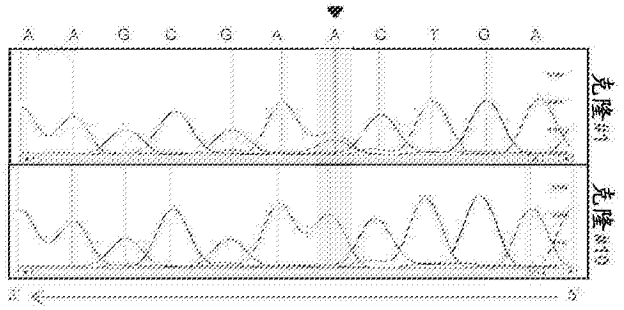
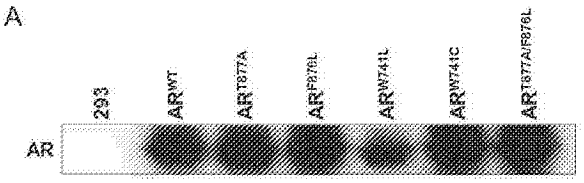

A A G C G A A C T G A
克隆 1
克隆 2
3'
5'

图 11


A
293
AR^WT
AR^T877A
AR^F876L
AR^W741L
AR^W741C
AR^T877A/F876L
AR

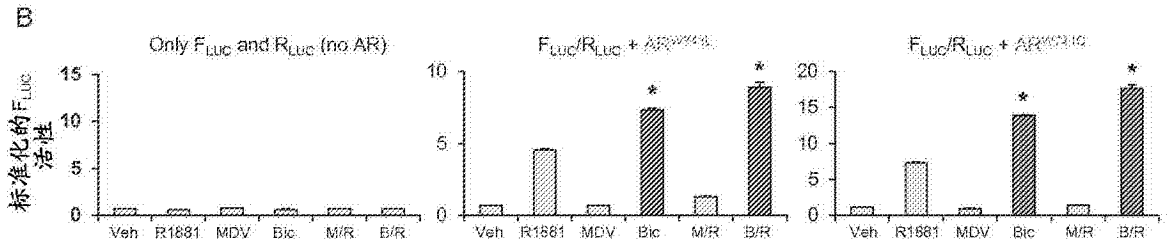

B
Only F_Luc and R_Luc (no AR)
F_Luc/R_Luc + AR^W741L
F_Luc/R_Luc + AR^W741C
标准化的F_Luc活性
Veh R1881 MDV Bic M/R B/R

图 12

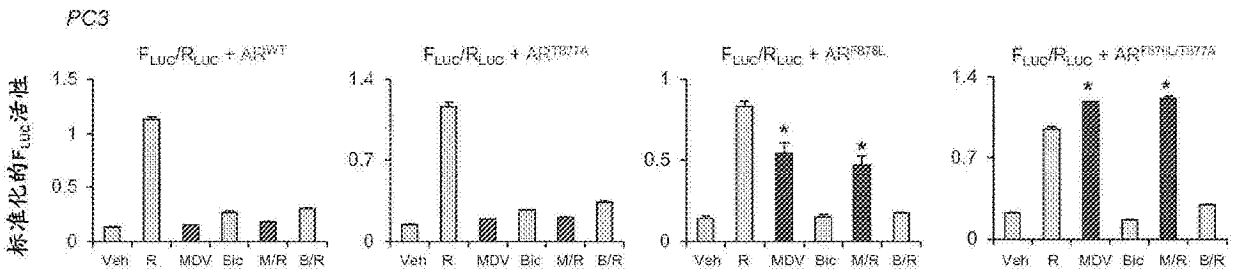

PC3
F_Luc/R_Luc + AR^WT
F_Luc/R_Luc + AR^T877A
F_Luc/R_Luc + AR^F876L
F_Luc/R_Luc + AR^F876L/T877A
标准化的F_Luc活性
Veh R MDV Bic M/R B/R

图 13

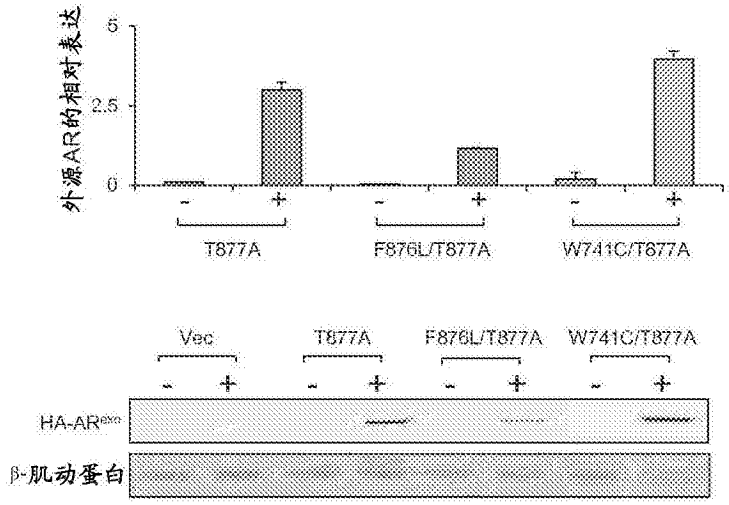

外源AR的相对表达
5
2.5
0
-
+
T877A
F876L/T877A
W741C/T877A
Vec
T877A
F876L/T877A
W741C/T877A
HA-AR^exo
β-肌动蛋白

图 14

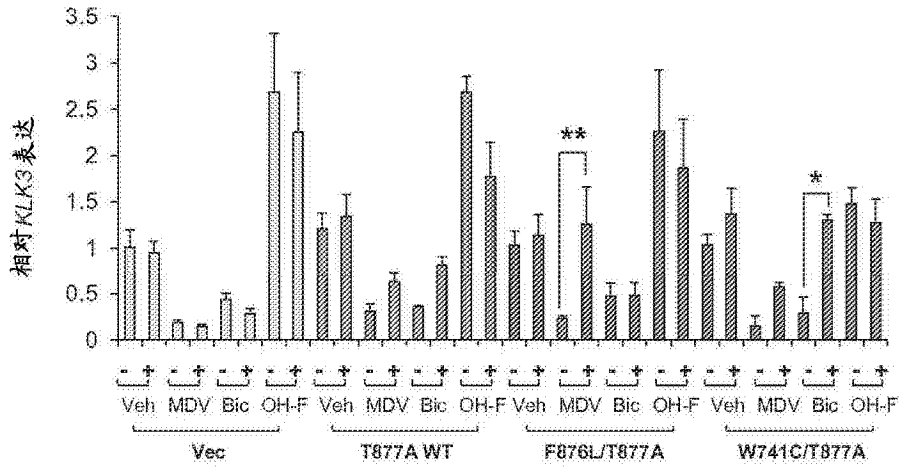

相对KLK3表达
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
**
*
Veh MDV Bic OH-F Veh MDV Bic OH-F Veh MDV Bic OH-F Veh MDV Bic OH-F
Vec
T877A WT
F876L/T877A
W741C/T877A

图 15

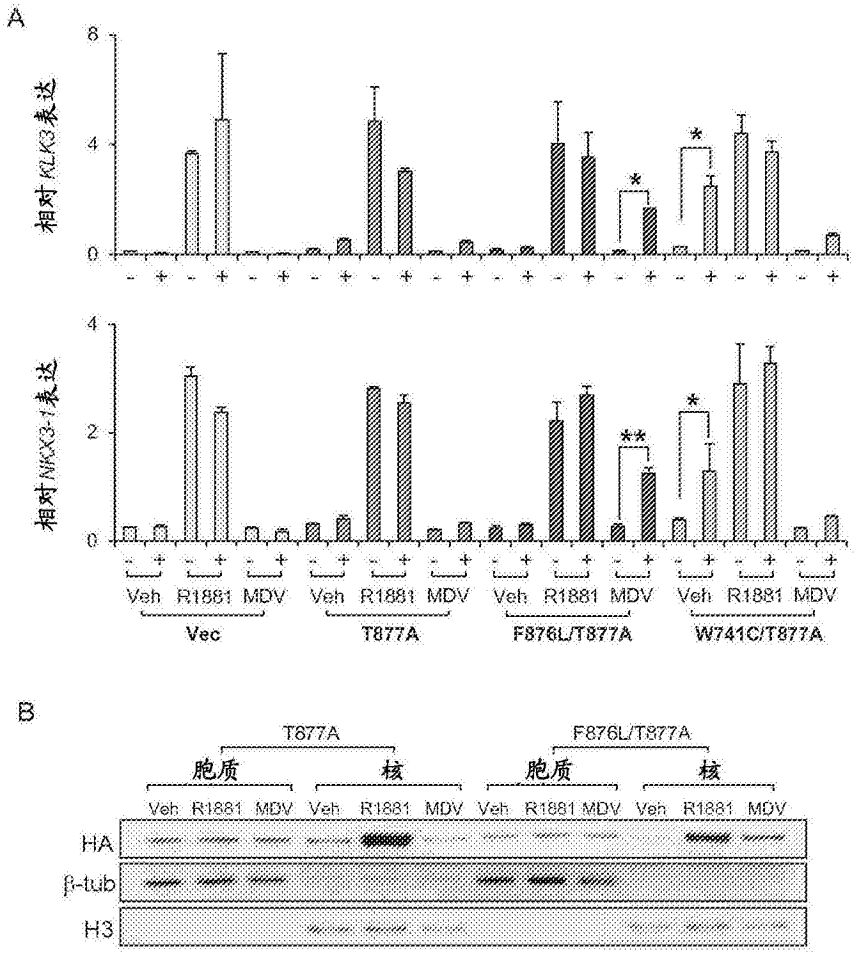

A
相对KLK3表达
相对NKX3-1表达
Veh R1881 MDV
Vec
T877A
F876L/T877A
W741C/T877A
B
T877A
F876L/T877A
胞质
核
HA
β-tub
H3

图 16

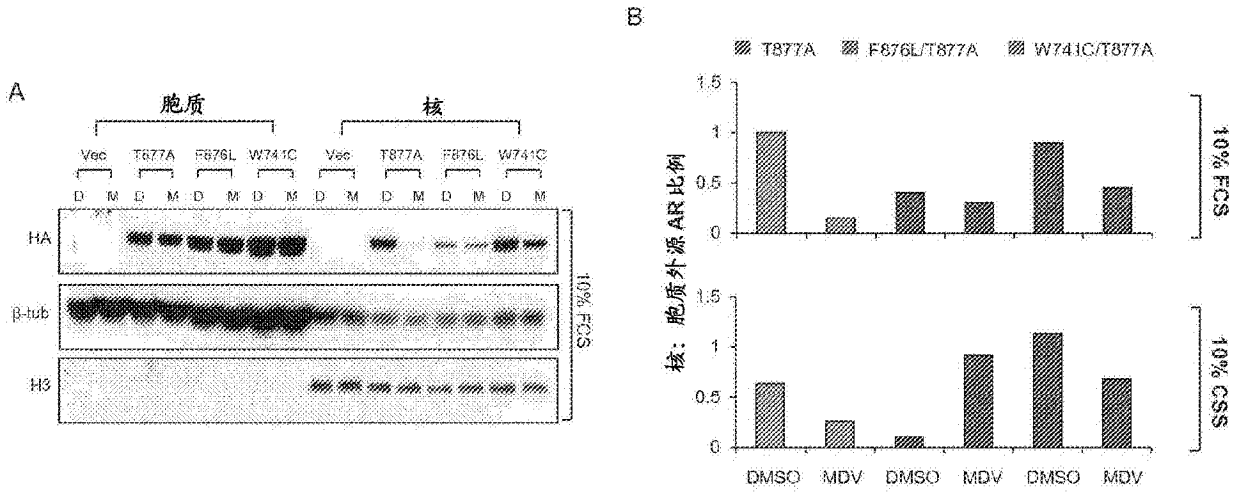

A
胞质
核
Vec
T877A
F876L
W741C
HA
β-tub
H3
10% FCS
B
T877A
F876L/T877A
W741C/T877A
核：胞质外源AR比例
10% FCS
10% CSS
DMSO
MDV

图 17

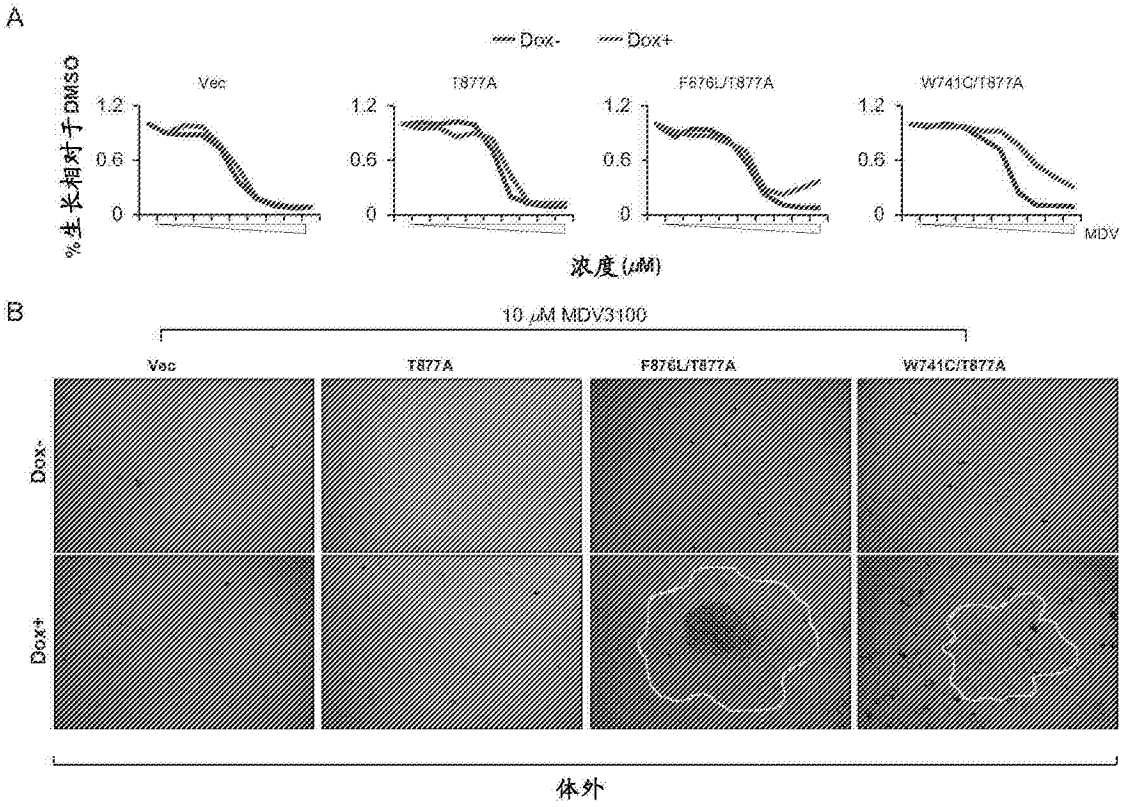

A
Dox-
Dox+
Vec
T877A
F876L/T877A
W741C/T877A
%生长相对于DMSO
1.2
0.6
0
MDV
浓度(μM)
B
10 μM MDV3100
Vec
T877A
F876L/T877A
W741C/T877A
Dox-
Dox+
体外

图 18

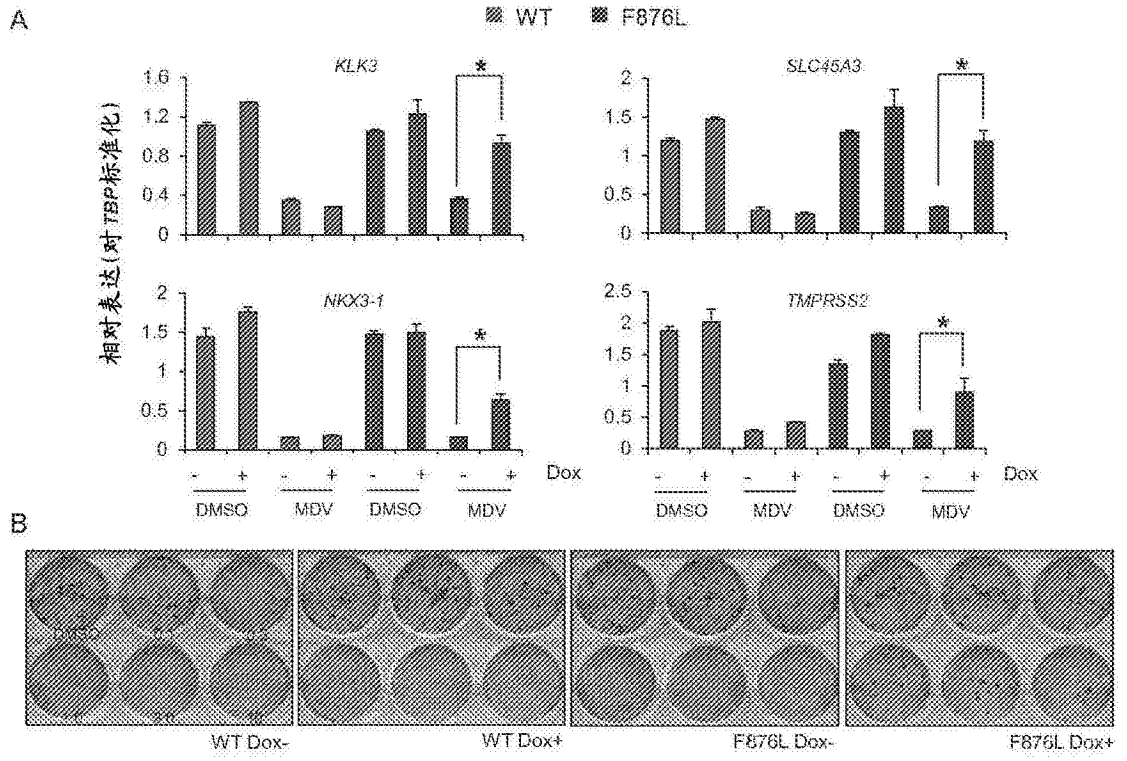

A
WT
F876L
KLK3
SLC45A3
NKX3-1
TMPRSS2
相对表达(对TBP标准化)
*
Dox
DMSO
MDV
B
WT Dox-
WT Dox+
F876L Dox-
F876L Dox+

图 19

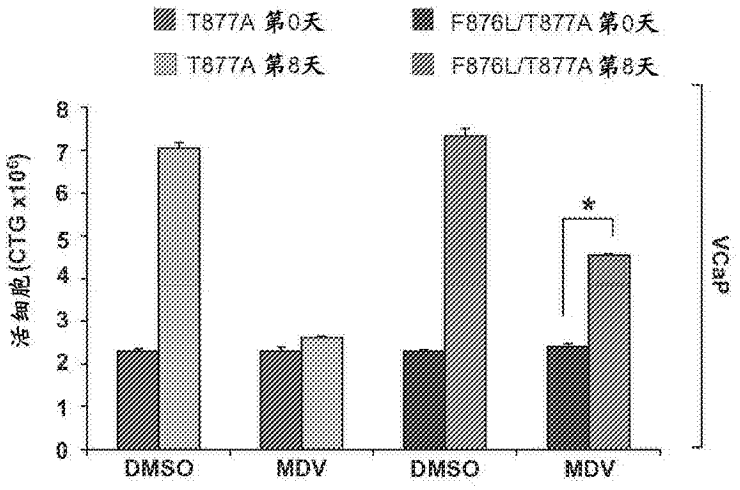

T877A 第0天
F876L/T877A 第0天
T877A 第8天
F876L/T877A 第8天
活细胞(CTG x10⁶)
0
1
2
3
4
5
6
7
8
*
VCaP
DMSO
MDV
DMSO
MDV

图 20

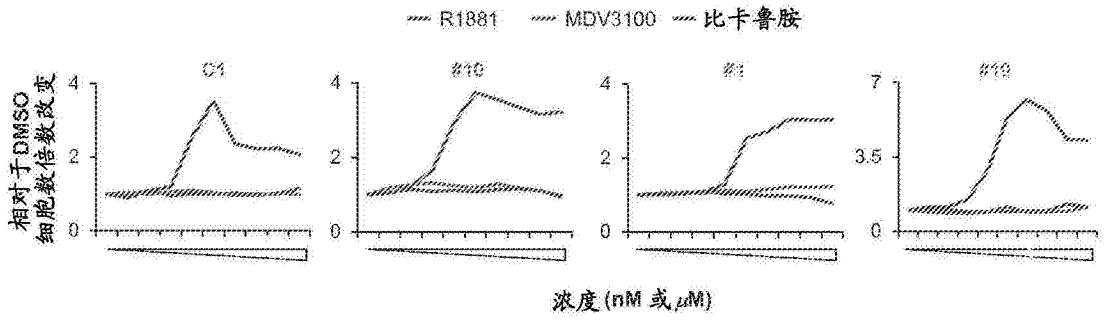

R1881
MDV3100
比卡鲁胺
C4
#10
#1
#10
相对于DMSO
细胞数倍数改变
浓度(nM 或μM)

图 21

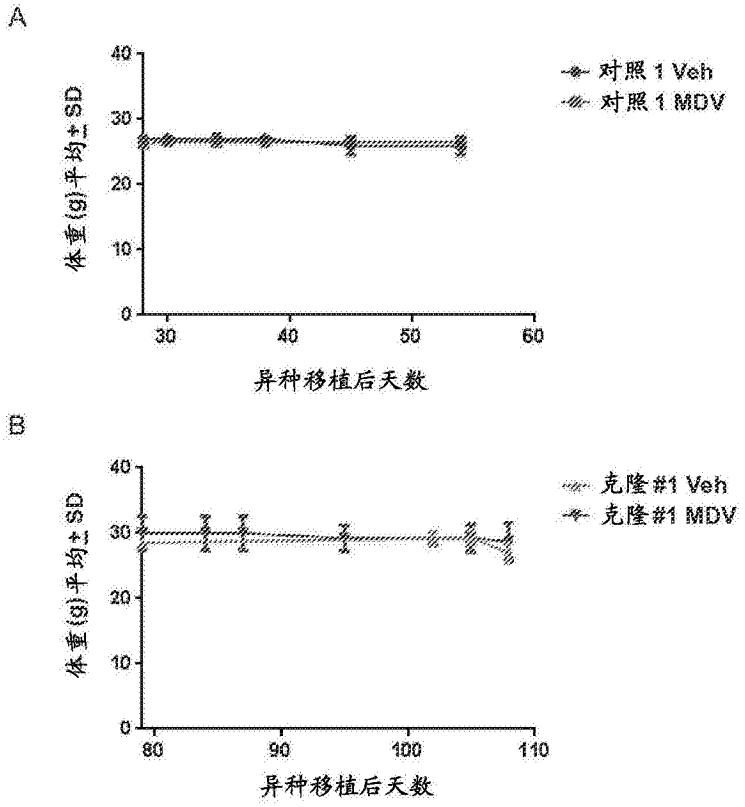

A
体重(g)平均±SD
异种移植后天数
对照 1 Veh
对照 1 MDV
B
体重(g)平均±SD
异种移植后天数
克隆#1 Veh
克隆#1 MDV

图 22