



등록특허 10-2210183



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년01월29일
(11) 등록번호 10-2210183
(24) 등록일자 2021년01월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2018.01) *A61K 31/4164* (2006.01)
C07K 14/72 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2018.05)
A61K 31/4164 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7004875
- (22) 출원일자(국제) 2013년07월26일
심사청구일자 2018년07월24일
- (85) 번역문제출일자 2015년02월25일
- (65) 공개번호 10-2015-0072399
- (43) 공개일자 2015년06월29일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2013/052395
- (87) 국제공개번호 WO 2014/018926
국제공개일자 2014년01월30일
- (30) 우선권주장
61/676,842 2012년07월27일 미국(US)
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌
Cancer Res, 72(6): 1494-1503 (2012.01.20.)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

전체 청구항 수 : 총 67 항

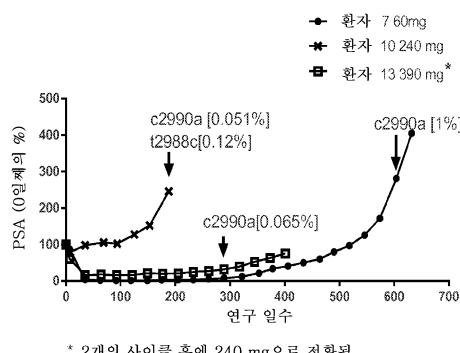
심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 안드로겐 수용체 요법 내성을 측정하는 방법 및 그 조성물

(57) 요약

안드로겐 수용체 억제제에 의한 억제에 대하여 내성을 나타내는 변형된 안드로겐 수용체 폴리펩티드가 본 명세서에 기재되어 있다. 변형된 안드로겐 수용체 폴리펩티드를 포함하는 조성물, 배합물 및 키트, 및 변형된 안드로겐 수용체 폴리펩티드의 사용 방법이 본 명세서에 기재되어 있다. 제3 세대 안드로겐 수용체 조절제의 동정 및 설계를 위한 스크리닝제로서 변형된 안드로겐 수용체 폴리펩티드를 사용하는 방법도 본 명세서에 기재되어 있다. 변형된 안드로겐 수용체 폴리펩티드의 활성을 억제하는 제3 세대 안드로겐 수용체 조절제도 본 명세서에 기재되어 있다. 본 명세서에 기재된 화합물을 포함하는 약제학적 조성물 및 의약, 및 안드로겐 수용체로 매개되거나 의존하는, 거세 저항성 전립선암과 같은 암을 비롯한 질환 또는 상태를 치료하기 위해 이러한 안드로겐 수용체 조절제를 단독으로, 다른 화합물과 병용하여 사용하는 방법도 기재되어 있다.

대 표 도 - 도13



* 2개의 사이클 후에 240 mg으로 전환됨

(52) CPC특허분류

C07K 14/721 (2013.01)

C07K 16/28 (2013.01)

C12Q 1/6869 (2018.05)

C12Q 2600/106 (2013.01)

(72) 발명자

센싱타파 존 리

미국 92064 캘리포니아주 포웨이 카사 에브니다

12777

루 닌

미국 92105 캘리포니아주 샌디에이고 유닛 4 애쉬

스트리트 3635

챈 정

미국 92126 캘리포니아주 샌디에이고 사우스 #8 컴
퍼스 포인트 드라이브 9456

스미스 니콜라스 디.

미국 92109 캘리포니아주 샌디에이고 베릴 스트리
트 1204

(30) 우선권주장

61/783,763 2013년03월14일 미국(US)

61/829,123 2013년05월30일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 안드로겐 수용체(AR) 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 대상으로부터 수득한 샘플을 시험(testing)하여, 암호화된 AR 폴리펩티드가 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 876에 대응하는 아미노산 위치에서 변형되었는지 여부를 결정하는 단계로서, 상기 변형이 F876L 아미노산 치환인 단계; 및

(b) 대상이 상기 변형을 갖는 경우, AR 길항제인 ARN-509 또는 MDV3100을 사용한 전립선암 요법에 대하여 내성을 갖거나 내성을 갖게 될 것으로 대상을 특징짓는 단계;

를 포함하는, 대상이 ARN-509 또는 MDV3100을 사용한 전립선암 요법에 대하여 내성을 갖거나 내성을 갖게 될 것인지 여부를 결정하는 방법.

청구항 2

(a) AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 대상으로부터 수득한 샘플을 시험하여, 암호화된 AR 폴리펩티드가 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 876에 대응하는 아미노산 위치에서 변형되었는지 여부를 결정하는 단계로서, 상기 변형이 F876L 아미노산 치환인 단계; 및

(b) (i) 대상이 상기 변형을 갖는 경우, ARN-509 또는 MDV3100에 의한 억제에 대하여 내성을 부여하는 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 AR 폴리펩티드의 적어도 하나의 활성을 억제하는 AR 길항제를 사용한 전립선암 치료의 후보자로서 대상을 특징짓고, 또는

(ii) 대상이 상기 변형을 갖지 않는 경우, ARN-509 또는 MDV3100의 계속된 사용의 후보자로서 대상을 특징짓는 단계;

를 포함하는, 전립선암 치료를 위해 ARN-509 또는 MDV3100을 투여받고 있는 대상의 요법을 최적화하는 방법.

청구항 3

(a) AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 대상으로부터 수득한 샘플을 시험하여, 암호화된 AR 폴리펩티드가 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 876에 대응하는 아미노산 위치에서 변형되었는지 여부를 결정하는 단계로서, 상기 변형이 F876L 아미노산 치환인 단계; 및

(b) 대상이 상기 변형을 갖는 경우, ARN-509 또는 MDV3100에 의한 억제에 대하여 내성을 부여하는 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 AR 폴리펩티드의 적어도 하나의 활성을 억제하는 AR 길항제를 사용한 전립선암 요법에 대한 후보자로서 대상을 특징짓는 단계;

를 포함하는, 전립선암 요법에 대한 대상을 선택하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 대상이 전립선암 치료를 위해 ARN-509 또는 MDV3100을 투여받아 왔던 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제2항에 있어서, 대상이 전립선암 치료를 위해 ARN-509 또는 MDV3100을 투여받아 왔던 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제3항에 있어서, 대상이 전립선암 치료를 위해 ARN-509 또는 MDV3100을 투여받아 왔던 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, ARN-509 또는 MDV3100을 사용한 전립선암 요법에 대하여 내성을 갖거나 내성을 갖게 될 것으로 결정된 대상을, ARN-509 또는 MDV3100에 의한 억제에 대하여 내성을 부여하는 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 AR 폴리펩티드의 적어도 하나의 활성을 억제하는 AR 길항제를 사용한 치료의 후보자로서 특징짓는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 핵산이 TTA, TTG, CTT 또는 CTC 코돈에 의해 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에서 류신을 암호화하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 핵산이 RNA 또는 DNA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, DNA가 게놈 DNA인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, RNA 샘플로부터 mRNA를 단리하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 시험(testing)이 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876을 암호화하는 핵산을 증폭시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제2항에 있어서, 시험이 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876을 암호화하는 핵산을 증폭시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제3항에 있어서, 시험이 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876을 암호화하는 핵산을 증폭시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제12항에 있어서, 증폭이 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)에 의한 것임을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, PCR 증폭이 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876을 암호화하는 영역에 인접하는 한 쌍의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제12항에 있어서, 증폭된 핵산을 시퀀싱(sequencing)하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 18

제1항에 있어서, 시험(testing)이 핵산을 서열 특이적 핵산 프로브와 접촉시키는 단계를 포함하며, 상기 서열 특이적 핵산 프로브는,

- (a) 아미노산 위치 876에서 F876L 아미노산 치환으로 변형된 수용체를 암호화하는 핵산에는 결합하고;
- (b) 아미노산 위치 876에 페닐알라닌을 갖는 야생형 수용체를 암호화하는 핵산에는 결합하지 않는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 19

제2항에 있어서, 시험이 핵산을 서열 특이적 핵산 프로브와 접촉시키는 단계를 포함하며, 상기 서열 특이적 핵산 프로브는,

- (a) 아미노산 위치 876에서 F876L 아미노산 치환으로 변형된 수용체를 암호화하는 핵산에는 결합하고;
- (b) 아미노산 위치 876에 페닐알라닌을 갖는 야생형 수용체를 암호화하는 핵산에는 결합하지 않는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 20

제3항에 있어서, 시험이 핵산을 서열 특이적 핵산 프로브와 접촉시키는 단계를 포함하며, 상기 서열 특이적 핵산 프로브는,

- (a) 아미노산 위치 876에서 F876L 아미노산 치환으로 변형된 수용체를 암호화하는 핵산에는 결합하고;
- (b) 아미노산 위치 876에 페닐알라닌을 갖는 야생형 수용체를 암호화하는 핵산에는 결합하지 않는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 21

제1항에 있어서, 샘플이 대상의 종양 세포 샘플로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 22

제1항에 있어서, 샘플이 종양 생검 샘플, 혈액 샘플, 혈청 샘플, 램프액 샘플, 또는 골수천자액으로부터 유래되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 23

제21항에 있어서, 샘플이 순환 종양 세포(CTC) 또는 과종성 종양 세포(DTC)를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 24

제1항에 있어서, 대상이 전립선암을 앓고 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 대상이 거세 저항성 전립선암을 앓고 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 26

제2항에 있어서, 대상이 거세 저항성 전립선암을 앓고 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 27

제3항에 있어서, 대상이 거세 저항성 전립선암을 앓고 있는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 28

제4항에 있어서, 샘플이 ARN-509 또는 MDV3100 최초 투여 후 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 14개월, 16개월, 18개월, 20개월, 22개월, 또는 24개월 후에 얻어진 샘플인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 29

제4항에 있어서, 샘플이 ARN-509 또는 MDV3100을 사용한 치료 동안에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10회 수득되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 30

제1항에 있어서, 대상이 ARN-509 또는 MDV3100 최초 투여시에는 이를 사용한 치료에 대하여 반응성을 나타내었던 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 31

- (a) 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 876에 대응하는 아미노산 위치에서 변형된, 변형된 AR을 세포에서 발현하는 단계로서, 상기 변형이 F876L 아미노산 치환인 단계;
- (b) 세포를 스크리닝할 시험 화합물과 접촉시키는 단계; 및
- (c) 서열번호 1의 활성에 상대적인 세포의 AR 활성 레벨을 검출하는 단계를 포함하며, 여기서 활성 저하는 상기 화합물이 변형된 AR의 길항제임을 나타내는 것인, 변형된 AR에 길항하는 화합물을 스크리닝하는 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 시험 화합물이 변형된 AR 수용체에 대하여 완전한 길항제 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 33

제31항에 있어서, 시험 화합물이 변형된 AR 수용체에 대하여 작용제 활성을 나타내지 않는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 34

제31항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 HeLa, CV1, COS7, HepG2, HEK-293, DU145, PC3, TSY-PR1, LNCaP, CWR, VCaP 및 LAPC4 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 35

제31항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 세포가 안드로겐 반응성 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터 유전자를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 리포터 유전자의 발현을 분석함으로써 활성을 측정하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 37

제35항에 있어서, 프로모터가 안드로겐 반응 요소를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 안드로겐 반응 요소가 4xARE 또는 프로바신 요소인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 39

제35항에 있어서, 프로모터가 프로바신, 전립선 특이 항원, MMTV LTR, FASN, STEAP4, TMPRSS2, ORM1, 또는 NKX3.1 프로모터인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 40

제35항에 있어서, 리포터 유전자가 루시페라제, 형광 단백질, 생물 빛광 단백질, 또는 효소 중에서 선택되는 단백질을 암호화하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 41

서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 876에 대응하는 아미노산 위치에서의 변형을 포함하는 단리된 AR 폴리펩티드로서, 상기 변형은 F876L 아미노산 치환이고, 또한 상기 변형은 변형된 AR 폴리펩티드에 대하여 AR 길항제에 대한 내성을 부여하는, 단리된 AR 폴리펩티드.

청구항 42

제41항에 있어서, 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 단리된 AR 폴리펩티드.

청구항 43

제41항에 있어서, T877A, W741C, W741L, W741R, L701H 및 H874Y 중에서 선택되는 하나 이상의 추가의 아미노산 치환을 포함하는 것을 특징으로 하는 단리된 AR 폴리펩티드.

청구항 44

제41항에 있어서, 폴리펩티드가 서열번호 5에 기재된 아미노산 서열을 포함하거나, 또는 서열번호 5에 기재된 서열을 갖는 폴리펩티드와 적어도 95% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 변이체를 포함하되, 위치 876에서의 아미노산이 류신인 것을 특징으로 하는 단리된 AR 폴리펩티드.

청구항 45

제41항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 단백질인 것을 특징으로 하는 단리된 AR 폴리펩티드.

청구항 46

제41항 내지 제44항 중 어느 한 항의 변형된 AR 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 핵산.

청구항 47

제46항에 있어서, DNA 또는 RNA 분자인 것을 특징으로 하는 단리된 핵산.

청구항 48

제46항에 있어서, cDNA 분자인 것을 특징으로 하는 단리된 핵산.

청구항 49

제46항에 있어서, 서열번호 19에 기재된 핵산 서열을 포함하거나, 또는 서열번호 19에 기재된 핵산 서열과 적어도 95% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 변이체를 포함하되, 위치 876에서의 아미노산을 암호화하는 핵산 코돈이 류신을 암호화하는 것을 특징으로 하는 단리된 핵산.

청구항 50

제46항의 핵산을 포함하는 벡터.

청구항 51

제50항에 있어서, 바이러스 또는 플라스미드 벡터인 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 52

제50항에 있어서, 핵산이 프로모터에 작동가능하게 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 53

제52항에 있어서, 프로모터가 구성적 또는 유도성 프로모터인 것을 특징으로 하는 벡터.

청구항 54

제50항의 벡터를 포함하는 숙주 세포.

청구항 55

제54항에 있어서, 원핵 세포 또는 진핵 세포인 것을 특징으로 하는 숙주 세포.

청구항 56

제55항에 있어서, 포유류 세포, 세균 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 또는 양서류 세포인 것을 특징으로 하는 속주 세포.

청구항 57

제54항의 속주 세포에 의해 발현되는 돌연변이 AR 폴리펩티드.

청구항 58

제41항 내지 제44항 중 어느 한 항의 변형된 AR 폴리펩티드, 또는 제41항 내지 제44항 중 어느 한 항의 변형된 AR 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 핵산을 포함하는 마이크로칩.

청구항 59

제58항에 있어서, 변형된 AR 폴리펩티드가 아미노산 치환 F876L을 포함하거나, 또는 핵산이 아미노산 치환 F876L을 갖는 변형된 AR 폴리펩티드를 암호화하는 것을 특징으로 하는 마이크로칩.

청구항 60

아미노산 위치 876에서의 변형을 포함하는 변형된 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산; 또는 아미노산 위치 876에서의 변형을 포함하는 변형된 AR 폴리펩티드;의 검출을 위한 하나 이상의 시약을 포함하는 키트로서, 상기 변형된 AR 폴리펩티드가 F876L 아미노산 치환을 포함하는 것인, 키트.

청구항 61

제60항에 있어서, AR 폴리펩티드의 아미노산 876을 암호화하는 핵산 영역에 인접하는 한 쌍의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 62

제60항에 있어서,

- (a) 아미노산 위치 876에서 변형된 변형된 AR을 암호화하는 핵산에 결합하며;
- (b) 아미노산 위치 876에 페닐알라닌을 갖는 야생형 AR을 암호화하는 핵산에는 결합하지 않는 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 63

제60항에 있어서,

- (a) F876S 변형을 갖는 변형된 AR 폴리펩티드, 또는 F876S 변형을 포함하는 이의 부분; 또는
- (b) F876S 변형을 갖는 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 문자, 또는 F876S 변형을 포함하는 이의 부분;

을 포함하는 마이크로칩을 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 64

- (a) 대상으로부터 수득한 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 샘플; 및
- (b) 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 876에 대응하는 아미노산 위치에서 변형된 돌연변이 AR 폴리펩티드 또는 이의 부분을 암호화하는 핵산을 포함하는 마이크로어레이로서, 상기 변형이 F876L 아미노산 치환인, 마이크로어레이;

를 포함하는, 대상에서 ARN-509 또는 MDV3100을 사용한 억제에 대하여 내성을 나타내는 변형된 AR을 검출하기 위한 시스템.

청구항 65

제64항에 있어서, 마이크로어레이가 마이크로칩 상에 함유되어 있는 것을 특징으로 하는 시스템.

청구항 66

(a) 대상으로부터 수득한 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 샘플; 및
(b) (i) 아미노산 위치 876에서 변형된 변형된 AR을 암호화하는 핵산에는 결합하고; (ii) 아미노산 위치 876에
페닐알라닌을 갖는 야생형 AR을 암호화하는 핵산에는 결합하지 않는 서열 특이적 핵산 프로브로서, 상기 변형이
F876L 아미노산 치환인, 서열 특이적 핵산 프로브;

를 포함하는, 대상에서 ARN-509 또는 MDV3100을 사용한 억제에 대하여 내성을 나타내는 변형된 AR을 검출하기
위한 시스템.

청구항 67

제41항 내지 제44항 중 어느 한 항의 변형된 AR 폴리펩티드에 결합하는 단리된 항체로서,

상기 항체는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 야생형 AR 폴리펩티드에 결합하지 않거나, 또는 변형된
AR 폴리펩티드에 결합하는 친화성보다 낮은 친화성으로 상기 야생형 AR 폴리펩티드에 결합하는, 항체.

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] EFS-웹을 통해 텍스트 파일로서 제출된 서열목록의 원용

[0002] 본 출원은 그 전체가 본원에 참조로 포함되는, EFS-웹을 통해 ASCII 포맷의 컴퓨터로 판독가능한 텍스트 파일로서 제출된 서열목록을 포함한다. 2013년 7월 16일자로 작성된 텍스트 파일은 38937-725-601_SEQ.txt로 명명되며, 그 크기는 132 KB이다.

배경 기술

[0003] 안드로겐 수용체 ("AR")는 내인성 안드로겐과의 상호작용을 통해서 다양한 생물학적 효과의 유도를 매개하는 리간드 활성화 전사 조절 단백질 (ligand-activated transcriptional regulatory protein)이다. 내인성 안드로겐은 스테로이드, 예컨대 테스토스테론 및 다이하이드로테스토스테론을 포함한다. 테스토스테론은 많은 조직에서 효소 5 알파 환원 효소에 의해서 다이하이드로테스토스테론으로 전환된다.

[0004] 안드로겐과 안드로겐 수용체의 작용은 다수의 질환 또는 상태, 예컨대 특히 안드로겐 의존성 암 (androgen dependent cancer), 여성의 남성화, 및 여드름과 관련된다. 안드로겐 수용체에 의한 안드로겐 신호전달의 효과를 감소시키고/시키거나 안드로겐 수용체의 농도를 감소시키는 화합물은 안드로겐 수용체가 작용하는 질환 또는 상태의 치료에 있어서 그 용도가 발견된다.

발명의 내용

[0005] 제1 세대 또는 제2 세대 안드로겐 수용체 길항제를 사용한 치료에 대한 환자의 내성을 부여하는 안드로겐 수용체(AR)의 동정 또는 변형에 대하여 본 명세서에 기술되어 있다. 일부 실시 형태에서, 변형은 AR 폴리펩티드의 위치 876에서의 페닐알라닌의 치환이다. 일부 실시 형태에서, 변형은 F876L이다. 일부 실시 형태에서, 변형된 AR 폴리펩티드는 ARN-509, 엔잘루타마이드 (enzalutamide; MDV3100), 및 RD162 중에서 선택되는 제2 세대 안드로겐 수용체 길항제에 의한 억제에 대하여 내성이 있다. 일부 실시 형태에서, 변형된 AR 폴리펩티드는 비칼루타마이드, 플루타마이드, 하이드록시플루타마이드 또는 널루타마이드 중에서 선택되는 제1 세대 안드로겐 수용체 길항제에 의한 억제에 대하여 내성이 있다. 일부 실시 형태에서, 환자는 암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 암은 전립선암, 유방암, 간 (즉, 간세포)암, 또는 방광암이다. 일부 실시 형태에서, 암은 거세 저항성 (castration-resistant) 전립선암이다. 일부 실시 형태에서, 변형된 AR 폴리펩티드는 공활성화 인자 결합, DNA 결합, 리간드 결합, 또는 핵 전좌 (nuclear translocation)를 포함하나, 이에 한정되지 않는 하나 이상의 야생형 AR 수용체 활성을 나타낸다. 일부 실시 형태에서, 제1 세대 또는 제2 세대 길항제는 야생형 AR 폴리펩티드와 비교하여, 변형된 AR 폴리펩티드에 대하여 길항 작용 저하를 나타낸다.

[0006] 특정한 실시 형태에서, (a) 안드로겐 수용체 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는, 대상으로부터의 샘플을 시험하여, 암호화된 안드로겐 수용체 폴리펩티드가 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 876에서 변형되는지를 결정하는 단계; 및 (b) 대상이 변형을 갖는 경우에 제1 세대 또는 제2 세대 안드로겐 수용체 길항제를 사용한 요법에 대하여 내성을 갖거나 내성을 갖게 될 것으로 대상을 특징짓는 단계를 포함하고/하거나, 이를 단계로 구성되고/되거나, 실질적으로 이를 단계로 구성되는, 대상이 제1 세대 또는 제2 세대 안드로겐 수용체 길항제를 사용한 요법에 대하여 내성을 갖거나 갖게 될 것인지를 결정하는 방법이 본 명세서에 기재되어 있다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 대상으로부터 샘플을 얻는 단계를 추가로 포함한다. 일부

실시 형태에서, 암 치료를 위해 대상에게 제1 세대 또는 제2 세대 AR 길항제가 투여된다. 일부 실시 형태에서, 암은 전립선암, 유방암, 간 (즉, 간세포)암, 또는 방광암이다. 일부 실시 형태에서, 암은 전립선암이다. 일부 실시 형태에서, 암은 거세 저항성 전립선암이다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 대상으로부터의 샘플이 서열 번호 1의 위치 876에서의 변형을 갖는 경우에 제1 세대 또는 제2 세대 안드로겐 수용체 길항제를 사용한 치료를 중지하는 단계를 추가로 포함하고/하거나, 이러한 단계로 구성되고/되거나, 실질적으로 이러한 단계로 구성된다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 대상으로부터의 샘플이 서열 번호 1의 위치 876에서의 변형을 갖지 않는 경우에 제1 세대 또는 제2 세대 안드로겐 수용체 길항제를 사용한 치료를 계속하는 단계를 추가로 포함하고/하거나, 이러한 단계로 구성되고/되거나, 실질적으로 이러한 단계로 구성된다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 대상으로부터의 샘플이 서열 번호 1의 위치 876에서의 변형을 갖는 경우에 변형된 AR을 억제하는 제3 세대 안드로겐 수용체 길항제를 투여하는 단계를 추가로 포함하고/하거나, 이러한 단계로 구성되고/되거나, 실질적으로 이러한 단계로 구성된다. 일부 실시 형태에서, 제2 세대 안드로겐 수용체 길항제는 ARN-509, 엔잘루타마이드 (MDV3100), 및 RD162 중에서 선택된다. 일부 실시 형태에서, 제1 세대 안드로겐 수용체 길항제는 비칼루타마이드, 플루타마이드, 하이드록시플루타마이드 또는 널루타마이드 중에서 선택된다.

[0007] 특정한 실시 형태에서, (a) 안드로겐 수용체 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는, 대상으로부터의 샘플을 시험하여, 암호화된 안드로겐 수용체 폴리펩티드가 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 876에서 변형되는지를 결정하는 단계; 및 (b) 대상이 변형을 갖는 경우에 제3 세대 안드로겐 수용체 길항제를 사용한 요법에 대한 후보자로서 대상을 특징짓는 단계를 포함하고/하거나, 이를 단계로 구성되고/되거나, 실질적으로 이들 단계로 구성되는, 제3 세대 안드로겐 수용체 길항제를 사용한 요법에 대한 대상을 선택하는 방법이 본 명세서에 기재되어 있다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 대상으로부터 샘플을 얻는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 대상으로부터의 샘플이 서열 번호 1의 위치 876에서의 변형을 갖는 경우에 제1 세대 또는 제2 세대 안드로겐 수용체 길항제를 사용한 치료를 중지하는 단계를 추가로 포함하고/하거나, 이러한 단계로 구성되고/되거나, 실질적으로 이러한 단계로 구성된다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 대상으로부터의 샘플이 서열 번호 1의 위치 876에서의 변형을 갖지 않는 경우에 제1 세대 또는 제2 세대 안드로겐 수용체 길항제를 사용한 치료를 계속하는 단계를 추가로 포함하고/하거나, 이러한 단계로 구성되고/되거나, 실질적으로 이러한 단계로 구성된다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 대상으로부터의 샘플이 서열 번호 1의 위치 876에서의 변형을 갖는 경우에 변형된 AR을 억제하는 제3 세대 안드로겐 수용체 길항제를 투여하는 단계를 추가로 포함하고/하거나, 이러한 단계로 구성되고/되거나, 실질적으로 이러한 단계로 구성된다. 일부 실시 형태에서, 제2 세대 안드로겐 수용체 길항제는 ARN-509, 엔잘루타마이드 (MDV3100), 및 RD162 중에서 선택된다. 일부 실시 형태에서, 제1 세대 안드로겐 수용체 길항제는 비칼루타마이드, 플루타마이드, 하이드록시플루타마이드 또는 널루타마이드 중에서 선택된다.

[0008] 특정한 실시 형태에서, (a) 안드로겐 수용체 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는, 대상으로부터의 샘플을 시험하여, 암호화된 안드로겐 수용체 폴리펩티드가 서열 번호 1의 아미노산 위치 876에서 변형되는지를 결정하는 단계; 및 (b) 대상이 서열 번호 1의 876에서의 변형을 갖는 경우에 대상의 안드로겐 수용체를 제1 세대 또는 제2 세대 안드로겐 수용체 길항제를 사용한 억제에 대하여 내성이 있는 것으로서 특징짓는 단계를 포함하고/하거나, 이를 단계로 구성되고/되거나, 실질적으로 이들 단계로 구성되는, 대상이 제1 세대 또는 제2 세대 안드로겐 수용체 길항제를 사용한 억제에 대하여 내성을 나타낼 수 있는지를 결정하기 위해 이러한 대상의 안드로겐 수용체를 특성화하는 방법이 본 명세서에 기재되어 있다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 대상으로부터 샘플을 얻는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 제1 세대 또는 제2 세대 길항제는 야생형 AR 폴리펩티드와 비교하여, 변형된 AR 폴리펩티드에 대하여 길항 작용 저하를 나타낸다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 대상으로부터의 샘플이 서열 번호 1의 위치 876에서의 변형을 갖는 경우에 제1 세대 또는 제2 세대 안드로겐 수용체 길항제를 사용한 치료를 중지하는 단계를 추가로 포함하고/하거나, 이러한 단계로 구성되고/되거나, 실질적으로 이러한 단계로 구성된다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 대상으로부터의 샘플이 서열 번호 1의 위치 876에서의 변형을 갖지 않는 경우에 제1 세대 또는 제2 세대 안드로겐 수용체 길항제를 사용한 치료를 계속하는 단계를 추가로 포함하고/하거나, 이러한 단계로 구성되고/되거나, 실질적으로 이러한 단계로 구성된다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 대상으로부터의 샘플이 서열 번호 1의 위치 876에서의 변형을 갖는 경우에 변형된 AR을 억제하는 제3 세대 안드로겐 수용체 길항제를 투여하는 단계를 추가로 포함하고/하거나, 이러한 단계로 구성되고/되거나, 실질적으로 이러한 단계로 구성된다. 일부 실시 형태에서, 제2 세대 안드로겐 수용체 길항제는 ARN-509, 엔잘루타마이드 (MDV3100), 및 RD162 중에서 선택된다. 일부 실시 형태에서, 제1 세대 안드로겐 수용체 길항제는 비칼루타마이드, 플루타마이드, 하이드록시플루타마이드 또는 널루타마이드 중에서 선택된다.

[0009]

특정한 실시 형태에서, (a) 안드로겐 수용체 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는, 대상으로부터의 샘플을 시험하여, 암호화된 안드로겐 수용체 폴리펩티드가 서열 번호 1의 아미노산 위치 876에서 변형되는지를 결정하는 단계; 및 (b) 대상이 변형을 갖는 경우에 제1 세대 또는 제2 세대 안드로겐 수용체 길항제를 사용한 요법에 대하여 내성을 갖거나 내성을 갖게 될 것으로 대상을 특징짓는 단계를 포함하는, 암 치료를 위해 제1 세대 또는 제2 세대 안드로겐 수용체 길항제가 투여된 대상이 요법에 대하여 내성을 발현하거나 발현할 것인지를 모니터링하는 방법이 본 명세서에 기재되어 있다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 대상으로부터 샘플을 얻는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 대상으로부터의 샘플이 서열 번호 1의 위치 876에서의 변형을 갖는 경우에 제1 세대 또는 제2 세대 안드로겐 수용체 길항제를 사용한 치료를 중지하는 단계를 추가로 포함하고/하거나, 이러한 단계로 구성되고/되거나, 실질적으로 이러한 단계로 구성된다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 대상으로부터의 샘플이 서열 번호 1의 위치 876에서의 변형을 갖지 않는 경우에 제1 세대 또는 제2 세대 안드로겐 수용체 길항제를 사용한 치료를 계속하는 단계를 추가로 포함하고/하거나, 이러한 단계로 구성되고/되거나, 실질적으로 이러한 단계로 구성된다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 대상으로부터의 샘플이 서열 번호 1의 위치 876에서의 변형을 갖는 경우에 변형된 AR을 억제하는 제3 세대 안드로겐 수용체 길항제를 투여하는 단계를 추가로 포함하고/하거나, 이러한 단계로 구성되고/되거나, 실질적으로 이러한 단계로 구성된다. 일부 실시 형태에서, 제2 세대 안드로겐 수용체 길항제는 ARN-509, 엔잘루타마이드 (MDV3100), 및 RD162 중에서 선택된다. 일부 실시 형태에서, 제1 세대 안드로겐 수용체 길항제는 비칼루타마이드, 플루타마이드, 하이드록시플루타마이드 또는 널루타마이드 중에서 선택된다.

[0010]

특정한 실시 형태에서, (a) 안드로겐 수용체 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는, 대상으로부터의 샘플을 시험하여, 암호화된 안드로겐 수용체 폴리펩티드가 서열 번호 1의 아미노산 위치 876에서 변형되는지를 결정하는 단계; 및 (c) (i) 샘플이 변형을 갖는 경우에, 제1 세대 또는 제2 세대 안드로겐 수용체 길항제를 사용한 대상의 치료를 중지하거나, (ii) 샘플이 변형을 갖지 않는 경우에, 대상이 변형을 갖지 않는 경우에 제1 세대 또는 제2 세대 안드로겐 수용체 길항제를 사용한 대상의 치료를 계속하는 단계를 포함하고/하거나, 이들 단계로 구성되고/되거나, 실질적으로 이들 단계로 구성되는, 암 치료를 위해 제1 세대 또는 제2 세대 안드로겐 수용체 길항제가 투여되는 대상의 요법을 최적화하는 방법이 본 명세서에 기재되어 있다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 대상으로부터 샘플을 얻는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 대상으로부터의 샘플이 서열 번호 1의 위치 876에서의 변형을 갖는 경우에 제1 세대 또는 제2 세대 안드로겐 수용체 길항제를 사용한 치료를 중지하는 단계를 추가로 포함하고/하거나, 이러한 단계로 구성되고/되거나, 실질적으로 이러한 단계로 구성된다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 대상으로부터의 샘플이 서열 번호 1의 위치 876에서의 변형을 갖지 않는 경우에 제1 세대 또는 제2 세대 안드로겐 수용체 길항제를 사용한 치료를 계속하는 단계를 추가로 포함하고/하거나, 이러한 단계로 구성되고/되거나, 실질적으로 이러한 단계로 구성된다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 대상으로부터의 샘플이 서열 번호 1의 위치 876에서의 변형을 갖는 경우에 변형된 AR을 억제하는 제3 세대 안드로겐 수용체 길항제를 투여하는 단계를 추가로 포함하고/하거나, 이러한 단계로 구성되고/되거나, 실질적으로 이러한 단계로 구성된다. 일부 실시 형태에서, 제2 세대 안드로겐 수용체 길항제는 ARN-509, 엔잘루타마이드 (MDV3100), 및 RD162 중에서 선택된다. 일부 실시 형태에서, 제1 세대 안드로겐 수용체 길항제는 비칼루타마이드, 플루타마이드, 하이드록시플루타마이드 또는 널루타마이드 중에서 선택된다.

[0011]

일부 실시 형태에서, 변형된 AR 폴리펩티드는 서열 번호 1의 위치 876에서의 아미노산 치환 또는 결실을 포함하고/하거나, 이것으로 구성되고/되거나, 실질적으로 이것으로 구성된다. 일부 실시 형태에서, 변형된 AR 폴리펩티드는 서열 번호 1의 위치 876에서의 류신, 아이소류신, 발린, 알라닌, 글리신, 메티오닌, 세린, 트레오닌, 시스테인, 트립토판, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 프롤린, 타이로신, 아스파라긴, 글루타민, 아스파르트산 및 글루탐산으로 구성되는 군으로부터 선택되는 아미노산으로의 페닐알라닌의 치환을 포함하고/하거나, 이러한 치환으로 구성되고/되거나, 실질적으로 이러한 치환으로 구성된다. 일부 실시 형태에서, 변형된 AR 폴리펩티드는 서열 번호 1의 위치 876에서의 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 및 아이소류신 중에서 선택되는 아미노산으로의 페닐알라닌의 치환을 포함하고/하거나, 이러한 치환으로 구성되고/되거나, 실질적으로 이러한 치환으로 구성된다. 일부 실시 형태에서, 변형된 AR 폴리펩티드는 서열 번호 1의 위치 876에서의 류신으로의 페닐알라닌의 치환을 포함하고/하거나, 이러한 치환으로 구성되고/되거나, 실질적으로 이러한 치환으로 구성된다. 일부 실시 형태에서, 변형된 AR 폴리펩티드는 서열 번호 1의 아미노산 위치 876을 암호화하는 핵산의 결실을 포함하고/하거나, 이러한 결실로 구성되고/되거나, 실질적으로 이러한 결실로 구성된다.

[0012]

일부 실시 형태에서, 변형된 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 (i) 서열 번호 18에 기재된 뉴클레오티드 서열의 핵산 위치 2626에 대응하는 핵산 위치에서의 티민 (t)의 시토신 (c)으로의 변이; (ii) 서열 번호 18에 기재

된 뉴클레오티드 서열의 핵산 위치 2628에 대응하는 핵산 위치에서의 시토신 (c)의 아데닌 (a)으로의 변이; 또는 (ii) 서열 번호 18에 기재된 뉴클레오티드 서열의 핵산 위치 2628에 대응하는 핵산 위치에서의 시토신 (c)의 구아닌 (g)으로의 변이를 갖는다.

[0013] 상기 방법의 일부 실시 형태에서, 핵산 샘플은 RNA 또는 DNA이다. 상기 방법의 일부 실시 형태에서, 핵산 샘플은 게놈 DNA이다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 mRNA를 RNA 샘플로부터 단리하는 단계를 추가로 포함하고/하거나, 이러한 단계로 구성되고/되거나, 실질적으로 이러한 단계로 구성된다. 일부 실시 형태에서, 핵산은 대상으로부터 얻어진 종양 세포 샘플로부터 단리된다. 일부 실시 형태에서, 샘플은 대상으로부터 얻어진 종양 생검 샘플, 혈액 샘플, 혈청 샘플, 림프액 샘플, 또는 골수천자액 (bone marrow aspirate)이다. 일부 실시 형태에서, 샘플은 순환 종양 세포를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 샘플은 과종성 종양 세포를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 핵산은 시험 전에 샘플로부터 정제된다. 일부 실시 형태에서, 핵산은 시험 전에 증폭된다.

[0014] 상기 방법의 일부 실시 형태에서, 시험은 서열 번호 1의 위치 876을 암호화하는 핵산 샘플의 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR) 증폭을 수행하는 단계를 포함하고/하거나, 이것으로 구성되고/되거나, 실질적으로 이것으로 구성된다. 일부 실시 형태에서, PCR 증폭은 서열 번호 1의 아미노산 위치 876을 암호화하는 영역에 인접하는 한 쌍의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하는 단계를 포함하고/하거나, 이러한 단계로 구성되고/되거나, 실질적으로 이러한 단계로 구성된다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 추가로 당업자에게 공지된 기술을 사용하여 PCR로 증폭된 핵산을 염기서열결정 (sequencing)하는 것을 포함한다.

[0015] 일부 실시 형태에서, 시험은 핵산을 서열 특이적 핵산 프로브와 접촉시키는 단계를 포함하고/하거나, 이것으로 구성되고/되거나, 실질적으로 이것으로 구성되며, 여기서 서열 특이적 핵산 프로브는 (a) 서열 번호 1의 아미노산 위치 876에서 변형되는 변형된 수용체를 암호화하는 핵산에 결합하고; (b) 위치 876에 페닐알라닌을 갖는 야생형 수용체를 암호화하는 핵산에 결합하지 않는다.

[0016] 일부 실시 형태에서, 제1 세대 또는 제2 세대 안드로겐 수용체 길항제는 경쟁적 길항 작용에 의해 야생형 안드로겐 수용체 폴리펩티드를 억제시킨다. 일부 실시 형태에서, 제2 세대 안드로겐 수용체 길항제는 ARN-509, 엔잘루타마이드 (MDV3100), 또는 RD162 중에서 선택된다.

[0017] 일부 실시 형태에서, 대상은 암, 염증성 장애 또는 종식성 장애 중에서 선택되는 질환 또는 장애를 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 AR 매개성 암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 암은 전립선암, 유방암, 간 (즉, 간세포) 암, 또는 방광암으로부터 선택된다. 일부 실시 형태에서, 암은 전립선암이다. 일부 실시 형태에서, 대상은 거세 저항성 전립선암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 고형 종양에 걸려 있다.

[0018] 일부 실시 형태에서, 대상은 대상으로부터의 샘플을 얻기 전에 제1 세대 또는 제2 세대 안드로겐 수용체 길항제로 치료된다. 일부 실시 형태에서, 대상은 제1 세대 또는 제2 세대 안드로겐 수용체 길항제가 최초로 투여되는 경우에 이를 사용한 치료에 대하여 반응성을 나타낸다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법에 사용되는 샘플은 제1 세대 또는 제2 세대 AR 길항제와 함께 최초로 투여한 지 1주, 2주, 3주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 14개월, 16개월, 18개월, 20개월, 22개월, 또는 24개월 후에 얻어진 샘플이다. 일부 실시 형태에서, 샘플은 제1 세대 또는 제2 세대 AR 길항제를 사용한 치료 동안에 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10회 얻어진다. 일부 실시 형태에서, 대상은 제1 세대 또는 제2 세대 AR 길항제가 최초로 투여되는 경우에 이를 사용한 치료에 대하여 반응성을 나타낸다.

[0019] 특정한 실시 형태에서, (a) 서열 번호 1의 위치 876에 대응하는 아미노산 위치에서 변형되는 변형된 안드로겐 수용체를 세포에서 발현하는 단계; (b) 세포를 시험 화합물과 접촉시키는 단계; 및 (c) 세포의 안드로겐 수용체 활성 레벨을 검출하는 단계 - 여기서, 발현된 활성 저하는 상기 화합물이 변형된 AR에 길항하는 것을 나타냄 -를 포함하고/하거나, 이들 단계로 구성되고/되거나, 실질적으로 이들 단계로 구성되는, 변형된 안드로겐 수용체에 길항하는 화합물을 스크리닝하는 방법이 본 명세서에 기재되어 있다. 일부 실시 형태에서, 시험 화합물은 변형된 AR에 대하여 완전한 길항제 활성을 나타낸다. 일부 실시 형태에서, 시험 화합물은 변형된 AR에 대하여 작용제 활성을 나타내지 않는다. 특정한 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 방법에 의해 동정되는 제3 세대 안드로겐 수용체 억제제가 본 명세서에 기재되어 있다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법에 사용되는 AR 폴리펩티드의 변형은 안드로겐 수용체 폴리펩티드의 위치 876에서의 아미노산의 치환 또는 결실이다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법에 사용되는 AR 폴리펩티드의 변형은 안드로겐 수용체 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에서의 류신, 아이소류신, 발린, 알라닌, 글리신, 메티오닌, 세린, 트레오닌, 시스테인, 트립토판, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 프롤린, 타이로신, 아스파라긴, 글루타민, 아스파르트산 및 글루탐산 중에서 선택되는 아미노산으로

의 페닐알라닌의 치환이다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법에 사용되는 AR 폴리펩티드의 변형은 안드로겐 수용체 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에서의 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 및 아이소류신 중에서 선택되는 아미노산으로의 페닐알라닌의 치환이다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법에 사용되는 AR 폴리펩티드의 변형은 안드로겐 수용체 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에서의 류신으로의 페닐알라닌의 치환이다.

[0020] 일부 실시 형태에서, 상기 방법에 사용되는 세포는 야생형 안드로겐 수용체의 발현이 불충분하거나, 낮은 레벨의 야생형 안드로겐 수용체를 발현하거나, 변형된 AR 수용체를 발현한다. 일부 실시 형태에서, 세포는 HeLa, CV1, COS7, HepG2, HEK-293, DU145, PC3, TSY-PR1, LNCaP, CWR, VCaP 및 LAPC4 중에서 선택된다. 일부 실시 형태에서, 세포는 안드로겐 반응성 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터 유전자를 포함한다. 일부 실시 형태에서, AR 폴리펩티드의 활성을 리포터 유전자의 발현을 분석함으로써 측정된다. 일부 실시 형태에서, 프로모터는 안드로겐 반응 요소를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 안드로겐 반응 요소는 4XARE 또는 프로바신 요소이다. 일부 실시 형태에서, 프로모터는 프로바신, 전립선 특이 항원, MMTV LTR, FASN, STEAP4, TMPRSS2, ORM1, 또는 NKX3.1 프로모터이다. 일부 실시 형태에서, 리포터 유전자는 루시페라제, 형광 단백질, 생물 벌광 단백질, 또는 효소 중에서 선택되는 단백질을 암호화한다.

[0021] 특정한 실시 형태에서, 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 876에 대응하는 아미노산 위치에서의 변형을 포함하는 안드로겐 수용체 활성을 갖는 단리된 안드로겐 수용체 폴리펩티드 또는 이의 변이체로서, 여기서, 변형은 변형된 안드로겐 수용체 폴리펩티드 또는 변이체에 안드로겐 수용체 길항제에 대한 내성을 부여하는 단리된 안드로겐 수용체 폴리펩티드 또는 이의 변이체가 본 명세서에 기재되어 있다. 일부 실시 형태에서, 변형은 서열 번호 1에 기재된 야생형 안드로겐 수용체와 비교하여, 위치 876에서의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 치환은 F876L이다. 일부 실시 형태에서, 변형은 아미노산 위치 876의 결실을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 변형된 AR 폴리펩티드는 서열 번호 5에 기재된 아미노산의 서열을 갖는다. 일부 실시 형태에서, 변형된 AR 폴리펩티드는 재조합 폴리펩티드이다. 일부 실시 형태에서, 변형된 AR 폴리펩티드는 서열 번호 1에 기재된 야생형 안드로겐 수용체와 비교하여, 위치 876에서의 아미노산 치환 및 하나 이상의 추가의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 변형된 AR 폴리펩티드는 F876L인 위치 876에서의 아미노산의 치환을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 변형된 AR 폴리펩티드는 거세 저항성 전립선암과 관련된 하나 이상의 아미노산 치환 중에서 선택되는 하나 이상의 추가의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 하나 이상의 추가의 아미노산 치환은 서열 번호 1에 기재된 야생형 안드로겐 수용체와 비교하여, 아미노산 위치 701, 741, 874 및 877에서의 하나 이상의 치환 중에서 선택된다. 일부 실시 형태에서, 하나 이상의 추가의 아미노산 치환은 T877A, W741C, W741L, W741R, L701H 및 H874Y 중에서 선택된다. 일부 실시 형태에서, 변형된 AR 폴리펩티드는 재조합 폴리펩티드이다. 일부 실시 형태에서, 변형된 AR 폴리펩티드는 서열 번호 5에 기재된 아미노산 서열, 또는 서열 번호 5에 기재된 서열을 갖는 폴리펩티드와 적어도 또는 적어도 약 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 변이체를 포함하며, 위치 876에서의 아미노산은 페닐알라닌이 아니다.

[0022] 특정한 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 변형된 안드로겐 수용체 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 핵산 분자가 본 명세서에 기재되어 있다. 일부 실시 형태에서, 핵산은 DNA 또는 RNA 분자이다. 일부 실시 형태에서, 핵산은 cDNA 분자이다. 일부 실시 형태에서, 핵산은 PCR 증폭 산물이다. 일부 실시 형태에서, 핵산은 재조합 분자이다. 일부 실시 형태에서, 핵산은 합성 분자이다. 일부 실시 형태에서, 핵산은 서열 번호 19에 기재된 핵산 서열, 또는 서열 번호 19에 기재된 서열을 갖는 폴리펩티드와 적어도 또는 적어도 약 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 갖는 변이체를 포함하며, 위치 876에서의 아미노산을 암호화하는 핵산 코돈은 페닐알라닌을 암호화하지 않는다.

[0023] 특정한 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 변형된 안드로겐 수용체 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 벡터가 본 명세서에 기재되어 있다. 일부 실시 형태에서, 벡터는 바이러스 또는 플라스미드 벡터이다. 일부 실시 형태에서, 핵산은 프로모터에 작동가능하게 연결되어 있다. 일부 실시 형태에서, 프로모터는 구성적 또는 유도성 프로모터이다. 특정한 실시 형태에서, 벡터를 포함하는 숙주 세포가 본 명세서에 기재되어 있다. 일부 실시 형태에서, 상기 세포는 원핵 세포 또는 진핵 세포이다. 특정한 실시 형태에서, 숙주 세포에 의해 발현되는 돌연변이 AR 폴리펩티드가 본 명세서에 제공된다.

[0024] 특정한 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법에 의해 동정된 제3 세대 안드로겐 수용체 억제제 및 약제학적으로 허용가능한 부형제를 포함하는 약제학적 조성물이 본 명세서에 기재되어 있다. 특정한 실시 형태에서, 의약의 제조를 위한, 본 명세서에 제공된 방법에 의해 동정된 제3 세대 안드로겐 수용체 억제제의 용도가 본 명세서에 기재되어 있다. 특정한 실시 형태에서, 적절한 약제학적 담체를 포함하는 약제학적 조성물의 치료적 유효

량을 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는, 치료 방법이 본 명세서에 기재되어 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 AR 매개성 암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 암은 전립선암, 유방암, 간(즉, 간세포)암 또는 방광암이다. 일부 실시 형태에서, 암은 거세 저항성 전립선암이다. 일부 실시 형태에서, 대상은 돌연변이 AR을 발현한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR은 안드로겐 수용체 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에서의 아미노산의 치환 또는 결실을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 치환은 F876L이다. 일부 실시 형태에서, 제3 세대 AR 길항제는 추가의 치료제와 함께 투여된다. 일부 실시 형태에서, 제3 세대 AR 길항제와 추가의 치료제는 순차적으로, 동시에 또는 간헐적으로 투여된다. 일부 실시 형태에서, 추가의 치료제는 호르몬, 호르몬 수용체 작용제 또는 길항제, 코르티코스테로이드, 항구토제, 진정제, 항암제, 항염증제, 키나제 억제제, HSP90 억제제, 히스톤 데아세틸라제(HDAC) 억제제 중에서 선택된다. 일부 실시 형태에서, 추가의 치료제는 생식선 자극 호르몬 방출 호르몬(GnRH) 작용제 또는 길항제이다. 일부 실시 형태에서, GnRH 작용제는 류프롤라이드, 부세렐린 또는 고세렐린이다.

[0025] 특정한 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드 또는 본 명세서에 제공된 변형된 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 마이크로칩이 본 명세서에 기재되어 있다. 일부 실시 형태에서, 변형된 AR 폴리펩티드는 아미노산 876에서의 변형을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 변형은 F876L인 아미노산 치환이다.

[0026] 특정한 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드를 포함하는 키트가 본 명세서에 기재되어 있다. 특정한 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 핵산을 포함하는 키트가 본 명세서에 기재되어 있다. 특정한 실시 형태에서, 아미노산 위치 876에서의 변형을 포함하는 돌연변이 AR 폴리펩티드의 검출을 위한 하나 이상의 시약을 포함하는 키트가 본 명세서에 기재되어 있다. 특정한 실시 형태에서, 아미노산 위치 876에서의 변형을 포함하는 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 검출을 위한 하나 이상의 시약을 포함하는 키트가 본 명세서에 기재되어 있다. 일부 실시 형태에서, 변형은 F876L인 아미노산 치환이다. 일부 실시 형태에서, 키트는 AR 폴리펩티드의 아미노산 876을 암호화하는 핵산 영역에 인접하는 한 쌍의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 키트는 (a) 아미노산 위치 876에서 변형되는 변형된 AR을 암호화하는 핵산에 결합하며; (b) 아미노산 위치 876에 페닐알라닌을 갖는 야생형 AR을 암호화하는 핵산에 결합하지 않는 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 키트는 (a) F876S인 변형을 갖는 변형된 AR 폴리펩티드, 또는 F876S인 변형을 포함하는 이의 부분; 또는 (b) F876S인 변형을 갖는 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자, 또는 F876S인 변형을 포함하는 이의 부분을 포함하는 마이크로칩을 포함한다.

[0027] 특정한 실시 형태에서, (a) AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는, 대상으로부터의 샘플; 및 (b) 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 876에 대응하는 아미노산 위치에서 변형되는 돌연변이 AR 폴리펩티드 또는 이의 부분을 암호화하는 핵산을 포함하는 마이크로어레이를 포함하는, 대상에서의 제1 세대 또는 제2 세대 AR 길항제를 사용한 억제에 대하여 내성을 나타내는 변형된 AR을 검출하는 시스템이 본 명세서에 기재되어 있다. 일부 실시 형태에서, 마이크로어레이에는 마이크로칩 상에 포함된다. 특정한 실시 형태에서, (a) AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는, 대상으로부터의 샘플; 및 (b) (i) 아미노산 위치 876에서 변형되는 변형된 AR을 암호화하는 핵산에 결합하며; (ii) 아미노산 위치 876에 페닐알라닌을 갖는 야생형 AR을 암호화하는 핵산에 결합하지 않는 서열 특이적 핵산 프로브를 포함하는, 대상에서의 제1 세대 또는 제2 세대 AR 길항제를 사용한 억제에 대하여 내성을 나타내는 변형된 AR을 검출하는 시스템이 본 명세서에 기재되어 있다. 특정한 실시 형태에서, (a) AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는, 대상으로부터의 샘플; 및 (b) AR 폴리펩티드의 아미노산 876을 암호화하는 핵산 영역에 인접하는 한 쌍의 올리고뉴클레오티드 프라이머를 포함하는, 대상에서의 제1 세대 또는 제2 세대 AR 길항제를 사용한 억제에 대하여 내성을 나타내는 변형된 AR을 검출하는 시스템이 본 명세서에 기재되어 있다.

[0028] 특정한 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 변형된 안드로겐 수용체 폴리펩티드에 결합하며, 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열을 갖는 야생형 AR 폴리펩티드에 결합하지 않거나 낮은 친화성으로 결합하는 단리된 항체가 본 명세서에 기재되어 있다. 일부 실시 형태에서, 변형된 AR 폴리펩티드는 아미노산 876에서의 변형을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 변형은 F876L인 아미노산 치환이다.

[0029] 특정한 실시 형태에서, (a) 제1 세대 또는 제2 세대 AR 길항제의 치료적 유효 용량을 투여하는 것을 포함하는 유지 요법 처방(maintenance therapy regimen)을 환자에게 투여하는 단계; 및 (b) 유지 요법 처방 동안에 환자를 소정 시간 간격으로 모니터링하여, 대상이 AR를 암호화하는 내인성 유전자에 돌연변이를 가진, 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 876에 대응하는 아미노산 위치에서 변형을 일으키는지를 결정하는 단계를 포함하는, 암을 앓고 있는 환자의 유지 요법의 방법이 본 명세서에 기재되어 있다. 일부 실시 형태에서,

모니터링은 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는, 대상으로부터의 샘플을 시험하여, 암호화된 AR 폴리펩티드가 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 876에 대응하는 아미노산 위치에서 변형되는지를 결정하는 단계를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 대상이 돌연변이를 갖는 경우에 유지 요법 처방을 중지하는 단계 또는 대상이 변형을 갖지 않는 경우에 유지 요법 처방을 계속하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 대상이 변형을 갖는 경우에 변형된 AR을 억제하는 제3 세대 AR 길항제를 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, AR 폴리펩티드의 변형은 F876L이다. 일부 실시 형태에서, 제1 세대 또는 제2 세대 AR 길항제는 경쟁적 길항 작용에 의해 야생형 AR 폴리펩티드를 억제시킨다. 일부 실시 형태에서, 제2 세대 AR 길항제는 ARN-509, 엔잘루타마이드 (MDV3100), 및 RD162 중에서 선택된다. 일부 실시 형태에서, 암은 전립선암, 유방암, 방광암, 또는 간세포암이다. 일부 실시 형태에서, 암은 전립선암이다. 일부 실시 형태에서, 암은 거세 저항성 전립선암이다. 일부 실시 형태에서, 소정 시간 간격은 매주, 매월, 2개월마다, 3개월마다, 4개월마다, 5개월마다, 6개월마다, 7개월마다, 8개월마다, 9개월마다, 10개월마다, 11개월마다, 또는 매년이다.

[0030] 본 명세서에 기재된 폴리펩티드, 핵산, 화합물, 방법 및 조성물의 다른 목적, 특징 및 이점은 하기 상세한 설명으로부터 명백해질 것이다. 그러나, 구체적인 실시 형태를 나타내는 상세한 설명 및 구체적인 실시예는 단지 예로서 제공되는 것이며, 본 발명의 사상 및 범주 내의 다양한 변경 및 변형은 이러한 상세한 설명으로부터 본 기술 분야의 숙련자에게 명백해질 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 ARN-509 및 엔잘루타마이드 내성을 예시한다. (a) LNCaP 및 LNCaP ARN-509r1 세포 증식. LNCaP 및 LNCaP ARN-509r1 세포를 호르몬 결핍 배지의 존재 하에 2일간 배양한 다음에, 리간드 첨가를 행하였다. 7일간의 화합물 처리 후에 셀타이터-글로(CellTiter-Glo)® (프로메가 코퍼레이션(Promega Corp.)) 발광에 기초한 생존율 분석에 의해, 증식을 정량화한다. (b) LNCaP/AR-Luc, LNCaP/AR-Luc ENZr2 및 LNCaP ARN-509r2 세포주의 작용제 증식 분석. 세포를 호르몬 결핍 배지의 존재 하에 2일간 배양한 다음에, 7일간 리간드 처리를 행하였다. 셀타이터-글로® 발광에 기초한 생존율 분석에 의해, 증식을 정량화한다. (c) 친세대 (parental generation) 및 제2 세대 항안드로겐 내성 세포주의 길항제 증식 분석. 세포를 2일간 호르몬 결핍 배지의 존재 하에 배양한 다음에, R1881 (최종 농도 = 100 pM)의 존재 하에 리간드 처리를 행하였다. 셀타이터-글로 발광에 기초한 생존율 분석에 의해, 증식을 정량화한다. (d) 돌연변이될 때에 CRPC에 리간드 활성 변화를 나타내는 아미노산을 보여주는 AR 도메인 구조의 약도.

도 2는 친세대 및 제2 세대 항안드로겐 내성 세포주의 AR 레벨을 예시한다. 단백질 추출물을 호르몬 결핍 배지에 3일간 배양한 세포로부터 생성하였다. AR 단백질 레벨을 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다. AR 레벨을 정량화하여, α -튜불린으로 정규화하고, LNCaP 세포에 대하여 상대적으로 나타내었다.

도 3은 ARN-509 및 엔잘루타마이드가 AR F876L의 부분 작용제임을 예시한다. (a) 야생형 또는 F876L AR에 대한 ARN-509 및 엔잘루타마이드의 전사 작용제 및 길항제 활성. 4X ARE-루시페라제 리포터의 전사 활성을 1 nM R1881 (야생형 AR의 경우) 또는 5 nM R1881 (F876L AR의 경우)의 부재 또는 존재 하에서의 화합물 농도 증가 시에 측정하였다. (b) 4X ARE-루시페라제 리포터의 야생형, F876L, T877A, F876L/T877A, L701H, H874Y 및 W741C AR 의존성 활성화 시의 제1 및 제2 세대 항안드로겐 및 프레드니손의 전사 작용제 활성을 일시적으로 트랜스펙션된 HepG2 세포에서 측정하였다.

도 4는 ARN-509 및 엔잘루타마이드의 VP16-AR (a) 및 F876L VP16-AR (b) 작용제 및 길항제 활성을 예시한다. 4X ARE-루시페라제 리포터 활성을 90 pM R1881 (야생형 VP16-AR의 경우) 또는 1 nM R1881 (F876L VP16-AR의 경우)의 부재 또는 존재 하에서의 화합물 농도 증가 시에 모니터링하였다.

도 5는 야생형 AR (a) 대 F876L AR (b)의 경쟁적 결합 분석을 예시한다. ^3H -R1881 결합을 야생형 또는 F876L AR을 발현하는 PC3 세포 추출물에서 행하였다. 데이터는 3개의 독립 실험을 나타낸다. 에러 바, SEM; n=2.

도 6은 AR 과발현 세포주의 AR 레벨을 예시한다. 단백질 추출물을 호르몬 결핍 배지에서 3일간 배양한 LNCaP, LNCap/AR(cs), LNCaP/SR α F876L 및 LNCaP/pCDNAF876L 세포로부터 생성하였다. AR 단백질 레벨을 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다. AR 레벨을 정량화하여, 액틴으로 정규화하고, LNCaP 세포에 대하여 상대적으로 나타내었다.

도 7은 F876L AR 돌연변이가 ARN-509 및 엔잘루타마이드에 대한 부분 작용제 활성을 부여한다는 것을 예시한다.

(a) LNCaP/AR(cs) 및 LNCaP/SR α F876L 세포 증식. 세포를 호르몬 결핍 배지의 존재 하에 2일간 배양한 다음에, 7일간 리간드 처리를 행하였다. 셀타이터-글로 빌광에 기초한 생존율 분석에 의해, 증식을 정량화한다. (b) LNCaP/AR(cs), LNCaP/SR α F876L 및 LNCaP/pCDNAF876L 세포 증식. 세포를 호르몬 결핍 배지에서 2일간 배양한 다음에, 7일간 리간드 처리를 행하였다. 길항제 분석에서, 200 pM R1881 (100 pM 최종 농도)의 존재 하에 화합물을 첨가하였다. 빌광에 기초한 셀타이터-글로® 분석을 이용하여, 증식을 정량화하였다.

도 8은 AR N/C 상호작용 분석을 예시한다. 리간드 유도 N/C 상호작용을 HepG2 세포에서 포유류의 투 하이브리드 분석 (two hybrid assay)을 통해 모니터링하였다. 길항제를 8 μ M로, R1881을 1nM로 분석하였다.

도 9는 AR 표적 유전자의 AR ChIP 분석을 예시한다. ChIP 분석을 호르몬 결핍 배지에서 3일간 인큐베이션한 후에, 4시간 리간드 처리를 행한 LNCaP/AR(cs) 및 LNCaP/SR α F876L 세포에 대하여 행하였다. 세포를 1 nM R1881의 존재 또는 부재 하에 10 μ M 길항제로 처리하였다. AR 및 비특이적 IgG 대조군에 관한 데이터를 % 인풋 (input)로 나타낸다.

도 10은 AR F876L 돌연변이가 ARN-509 및 엔잘루타마이드 내성을 부여한다는 것을 예시한다. LNCaP/AR(cs) 및 LNCaP/SR α F876L 종양 이종 이식. 종양을 가지고 있는 거세 수컷 마우스를 매일 비히를 또는 30 mg/kg/일 화합물로 처리하였다. 각 그룹에 대한 종양 성장은 평균 종양 용적 \pm SEM으로 나타낸다.

도 11은 점진적 진행성 전이성 거세 저항성 전립선암에 걸린 환자의 ARN-509의 오픈 라벨 단계 (open-label phase) 1/2 안전성, 약물 동태, 및 개념 증명 (proof-of-concept) 연구에 관한 투여량 스케줄을 예시한다.

도 12는 ARN-509로 처리된 환자에서의 AR-F876L의 동정을 예시한다. (a) F876L 돌연변이에 대하여 분석한 29명의 환자의 PSA 반응. PSA 반응 라인의 종점 (terminal end)은 BEAMing 분석을 이용하여 환자 혈장에 대한 F876L 돌연변이를 스크리닝한 시간이다. 처음에 본 연구에 사용한 혈장을 수집하여, ARN-509의 약물 동태를 측정하였으며, 이와 같이 림프구 DNA에 대한 ctDNA의 비를 최대화하는 방법을 이용하여 샘플을 준비하지 않았다. (b) F876L에 대하여 양성인 환자의 PSA 반응. 표시된 치료 사이클에서의 환자 7의 PSA 반응. 순환 혈장을 화살표로 표시된 때에 F876L에 관해 분석하였다. 검출가능한 돌연변이가 없는 혈장 샘플을 "w.t."로 표기하며, F876L 돌연변이의 존재를 "m"으로 나타낸다. 혈장 샘플을 돌연변이 비드의 퍼센트가 컷오프 (0.02%)를 초과하고, 돌연변이 카피 수가 \geq 0.5로 추정되면 (혈장 샘플 중의 게놈 등가물 (genome equivalent)의 수 x 돌연변이 비드 분율= \geq 0.5), 돌연변이 양성으로 명명되었다.

도 13은 AR에 검출가능한 체세포 F876L 돌연변이를 갖는 3명의 환자 (7, 10, 및 13) 각각에서의 단계 1/2 ARN-509 임상 연구 동안에 검출된 전립선 특이 항원 (PSA)의 상대량을 예시한다. 화살표는 돌연변이(들)이 검출된 샘플을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

특정 용어

[0032] 달리 정의되지 않는다면, 본 명세서에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 청구된 요지가 속하는 기술 분야의 통상의 숙련자가 통상적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본 발명의 전체를 통해 언급된 모든 특허, 특히 출원, 공개된 출원서 및 공보, GENBANK 서열, 웹사이트 및 기타 간행물은 달리 언급되지 않는 한, 그 전체 내용이 본 명세서에 참조로 포함된다. 본 명세서에서 용어에 대한 다수의 정의가 존재하는 경우에는, 이러한 섹션에서의 용어가 통용된다. URL 또는 다른 그러한 식별자 또는 어드레스를 참조하면, 이러한 식별자가 변경될 수 있으며, 인터넷 상의 특정 정보가 변동될 수 있으나, 동등한 정보가 공지되어, 예를 들어 인터넷 및/또는 적절한 데이터베이스를 검색하여 용이하게 접근될 수 있음을 알 수 있다. 그것에 대한 언급은 이러한 정보의 이용가능성 및 대중 보급을 입증한다. 일반적으로, 세포 배양, 세포 감염, 항체 생산 및 분자 생물학 방법에 대한 절차는 당업계에 통상적으로 사용되는 방법이다. 이러한 표준 기술은 예를 들어, 참조 매뉴얼, 예를 들어 문헌 [Sambrook et al. (2000) and Ausubel et al. (1994)]에서 발견될 수 있다.

[0034] 본 명세서에 사용되는 단수형(부정 관사("a" 및 "an") 및 정관사("the"))은 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않으면, 복수의 지시 대상을 포함한다. 본원에서, 단수형의 사용은 달리 특별히 명시되지 않는 한, 복수형을 포함한다. 본 명세서에 사용되는 "또는"의 사용은 달리 명시되지 않는 한, "및/또는"을 의미한다. 게다가, 용어 "포함하는" 및 다른 형태(예를 들어, "포함하다", "포함한다" 및 "포함하였다")의 사용은 제한적이지 않다.

[0035] 본 명세서에 사용되는 범위 및 양은 "약" 특정 값 또는 범위로 표시될 수 있다. "약"은 또한 정확한 양을 포함

한다. 그러므로, "약 5 μg "은 "약 5 μg "과 "5 μg "도 의미한다. 일반적으로, 용어 "약"은 실험 오차 내에 있을 것으로 예상되는 양을 포함한다.

[0036] 본 명세서에 사용되는 안드로겐 수용체 (AR) 폴리펩티드는 재조합에 의해 생산된 단백질, 합성적으로 생산된 단백질, 천연 안드로겐 수용체 단백질, 및 세포 또는 조직으로부터 추출되는 안드로겐 수용체 단백질을 포함하나 이에 한정되지 않는 안드로겐 수용체 단백질 또는 폴리펩티드를 말한다. AR 폴리펩티드는 인간 및 비인간 유래의 동물을 포함하나 이에 한정되지 않는 상이한 종류 유래의 관련 폴리펩티드가 포함된다. 비인간 유래의 AR 폴리펩티드는 비인간 영장류(예를 들어, 침팬지 및 꼬리 없는 원숭이), 뮤린(예를 들어, 마우스 및 래트), 개과의 동물(canine(개)), 고양잇과 동물(고양이), 토끼과 동물(래빗), 조류(새), 소아과의 동물(bovine(암소)), 양(ovine(绵羊(sheep))), 돼지(피그), 말과 동물(equine(말)), 어류(piscine(물고기)), 두꺼비(개구리) 및 다른 포유류 또는 비포유류 AR 폴리펩티드를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 예시적인 AR 폴리펩티드는 예를 들어, 서열 번호 1 내지 17을 포함한다. 안드로겐 수용체 폴리펩티드는 야생형 안드로겐 수용체, 대립유전자 변이체 아이소형, 종양에서 발견된 것들을 비롯한 체세포 돌연변이, 핵산 유래의 합성 분자, 인간 조직 및 세포로부터 단리된 단백질, 및 이의 변형된 형태를 포함한다. 본 명세서에 제공된 안드로겐 수용체 폴리펩티드는 추가로 하나 이상의 아미노산의 결실, 침가, 또는 치환에 의한 일차 아미노산 서열의 변형에 의해 변형될 수 있다. 안드로겐 수용체 폴리펩티드는 예를 들어, AR 리간드 결합 도메인과 비상동 DNA 결합 도메인의 융합 폴리펩티드를 비롯하여, AR 활성을 갖는 AR 폴리펩티드 또는 이의 부분을 포함한다.

[0037] 본 명세서에 사용되는 돌연변이 안드로겐 수용체 (AR) 폴리펩티드, 돌연변이 AR 단백질, 변형된 AR 폴리펩티드, 또는 변형된 AR 단백질은 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되며, 하나 이상의 아미노산 위치에서 변형되는 안드로겐 수용체 폴리펩티드를 말한다. 예시적인 변형은 아미노산의 치환, 결실 또는 침가를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0038] 본 명세서에 사용되는 용어 "항안드로겐"은 체내의 정상 반응 조직에 대한 안드로겐의 생물학적 효과를 예방하거나 억제할 수 있는 일군의 호르몬 수용체 길항제 화합물을 말한다.

[0039] 본 명세서에 사용되는 용어 "AR 억제제" 또는 "AR 길항제"는 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되며, AR 폴리펩티드의 적어도 하나의 활성을 억제하거나 저하시키는 제제를 말한다. 예시적인 AR 활성을 공활성화 인자 결합, DNA 결합, 리간드 결합, 또는 핵 전좌를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0040] 본 명세서에 사용되는 "완전 길항제"는 유효 농도로 AR 폴리펩티드의 활성을 실질적으로 완전히 억제하는 길항제를 말한다. 본 명세서에 사용되는 "부분 길항제"는 AR 폴리펩티드의 활성을 부분적으로 억제할 수 있으나, 최고 농도로도 완전 길항제가 아닌 길항제를 말한다. '실질적으로 완전히'란, AR 폴리펩티드의 활성을 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%, 또는 그 이상을 억제시키는 것을 의미한다.

[0041] 본 명세서에 사용되는 용어 "제3 세대 AR 억제제" 또는 "제3 세대 AR 길항제"는 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되며, 제2 세대 AR 길항제, 예를 들어 ARN-509 (CAS No. 956104-40-8), 엔잘루타마이드 (MDV3100으로도 알려짐; CAS No: 915087-33-1), 또는 RD162 (CAS No. 915087-27-3)에 의한 억제에 대하여 내성을 부여하는 하나 이상의 아미노산 변형을 포함하는 AR 폴리펩티드의 적어도 하나의 활성을 억제하는 제제를 말한다. 일부 실시 형태에서, 제3 세대 AR 억제제는 예를 들어, 공활성화 인자 결합, DNA 결합, 리간드 결합, 또는 핵 전좌를 포함하나 이에 한정되지 않는 야생형 AR 폴리펩티드의 적어도 하나의 활성을 억제한다. 일부 실시 형태에서, 제3 세대 AR 억제제는 제1 세대 또는 제2 세대 AR 억제제에 의해서도 억제되는 돌연변이 AR 폴리펩티드의 활성을 억제한다.

[0042] 본 명세서에 사용되는 어구 "억제에 대하여 내성이 있는"은 야생형 AR 폴리펩티드와 비교하여, 변형된 AR 폴리펩티드의 하나 이상의 활성을 억제하는(즉, 이에 길항하는) AR 길항제의 능력의 저하를 말한다. 예를 들어, AR 길항제는 변형된 AR 폴리펩티드를 억제하는데 있어서, 야생형 AR 폴리펩티드와 비교하여 효과가 덜하다. 일부 실시 형태에서, 변형된 AR 폴리펩티드에 대한 길항 작용은 야생형 AR 폴리펩티드에 대한 길항 작용과 비교하여, 약 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 100%로 감소된다. 예시적인 AR 활성을 공활성화 인자 결합, DNA 결합, 리간드 결합, 또는 핵 전좌를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 일부 실시 형태에서, AR 길항제는 변형된 AR 폴리펩티드에 결합할 수 없거나 이에 저하된 친화성으로 결합한다.

[0043] 본 명세서에 사용되는 용어 "제2 세대 AR 억제제" 또는 "제2 세대 AR 길항제"는 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되며, 억제에 대하여 내성을 부여하는 하나 이상의 아미노산 변형, 예를 들어 AR 폴리펩티드의 아미노산 위

치 876에서의 변형을 포함하는 AR 폴리펩티드의 완전 길항제 활성을 나타내지 않으나, 야생형 AR 폴리펩티드의 완전 길항제 활성을 나타내는 제제를 말한다. 일부 실시 형태에서, 제2 세대 AR 억제제는 F876L인 아미노산 치환을 갖는 AR 폴리펩티드에 대하여 완전 길항제 활성을 나타내지 않는다. 일부 실시 형태에서, 제2 세대 AR 억제제는 야생형 AR을 억제하는데 요구되는 농도보다 높거나 이것과 동등한 농도에서 AR의 활성을 유도한다(즉, AR 작용제임). 제2 세대 AR 억제제는 제2 세대 AR 억제제가 상승된 AR의 레벨을 발현하는 세포, 예를 들어, 거세 저항성 전립선암(CRPC)에서 완전 길항제로 작용한다는 점에서, 제1 세대 AR 억제제, 예컨대 비칼루타마이드 및 플루타마이드와 상이하다. 제1 세대 AR 억제제, 예컨대 비칼루타마이드 및 플루타마이드는 CRPC에서 작용제로 작용한다. 예시적인 제2 세대 AR 억제제는 ARN-509, 엔잘루타마이드 및 RD162를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 제2 세대 AR 억제제는 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드의 작용제이다. 일부 실시 형태에서, 제2 세대 AR 억제제는 AR 폴리펩티드의 리간드 결합 부위 또는 그 부근에서 AR 폴리펩티드에 결합한다.

[0044] 용어 "핵산"은 테옥시리보뉴클레오티드, 테옥시리보뉴클레오시드, 리보뉴클레오티드, 또는 리보뉴클레오티드 및 단일 또는 이중 가닥 형태의 이들의 폴리머를 말한다. 특별히 제한되지 않는 한, 상기 용어는 표준 핵산과 유사한 결합 특성을 가지며, 천연 뉴클레오티드와 유사한 방법으로 대사하는 알려진 천연 뉴클레오티드의 유사체를 포함하는 핵산을 포함한다. 달리 특별히 제한되지 않는 한, 상기 용어는 또한 PNA (펩ти드핵산)을 비롯한 올리고뉴클레오티드 유사체, 안티센스 기술에 사용되는 DNA 유사체(예를 들어, 포스포로티오에이트, 포스포로아미데이트)를 말한다. 달리 지시되지 않는 한, 특정한 핵산 서열은 또한 보존적으로 변형된 이의 변이체(퇴화 코돈 치환을 포함하나 이에 한정되지 않음), 및 상보적 서열 및 명확히 나타낸 서열을 목적으로 포함한다. 특히, 퇴화 코돈 치환은 하나 이상의 선택된 (또는 모든) 코돈의 세 번째 위치가 혼합된 염기 및/또는 테옥시이노신 잔기로 치환되는 서열을 생성하여 달성된다(문헌[Batzer et al. (1991) Nucleic Acid Res. 19:5081; Ohtsuka et al. (1985) J. Biol. Chem. 260:2605-2608]; 및 문헌[Cassol et al. (1992) Mol. Cell. Probes 6, 327-331]; 및 문헌[Rossolini et al. (1994) Mol. Cell. Probes 8:91-98]).

[0045] 용어 "아미노산"은 천연 및 비천연 아미노산과, 천연 아미노산과 유사한 방법으로 기능하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모방체(mimetic)를 말한다. 자연 발생적으로 암호화된(naturally encoded) 아미노산은 20개의 통상적인 아미노산(알라닌, 아르기닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 시스테인, 글루타민, 글루탐산, 글리신, 히스티딘, 아이소류신, 류신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌, 프롤린, 세린, 트레오닌, 트립토판, 타이로신, 및 발린) 및 파이로라이신 및 셀레노시스테인이다. 아미노산 유사체는 천연 아미노산, 즉, 수소, 카르복실기, 아미노기, 및 R기에 결합되는 α 탄소, 예컨대 호모세린, 노르류신, 메티오닌 셀프사이드, 메티오닌 메틸 셀프늄과 동일한 기본적인 화학 구조를 갖는 제제를 말한다. 이러한 유사체는 변형된 R기 (예컨대, 노르류신) 또는 변형된 웨პ티드 골격을 가지나, 천연 아미노산과 동일한 기본적인 화학 구조를 보유한다.

[0046] 아미노산은 일반적으로 알려진 이의 3문자 기호 또는 IUPAC-IUB 생화학 명명법 위원회(Biochemical Nomenclature Commission)에 의해 추천되는 1문자 기호로 본 명세서에 언급된다. 마찬가지로, 뉴클레오티드도 이의 일반적으로 인정된 1문자 코드로 언급된다.

[0047] 용어 "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되며, 아미노산 잔기의 폴리머를 말한다. 상기 용어는 하나 이상의 아미노산 잔기가 비천연 아미노산, 예를 들어, 아미노산 유사체인 아미노산 폴리머뿐만 아니라, 천연 아미노산 폴리머에도 적용된다. 상기 용어는 전장(full length) 단백질을 비롯한 임의의 길이의 아미노산 쇄를 포함하며, 여기서 아미노산 잔기는 공유 웨პ티드 결합에 의해 결합된다.

[0048] 본 명세서에 사용되는 변형은 폴리펩티드의 아미노산 서열의 변형 또는 핵산 분자의 뉴클레오티드 서열의 변형을 말하며, 각각 아미노산 및 뉴클레오티드의 결실, 삽입, 및 치환을 포함한다.

[0049] 2개의 아미노산 서열 또는 2개의 핵산의 상동성 비율을 측정하기 위해, 서열은 최적 비교 목적으로 정렬될 수 있다(예를 들어, 캡은 제2 아미노산 또는 핵산 서열과의 최적 정렬을 위해 제1 아미노산 또는 핵산 서열의 서열에 도입됨). 그 다음에, 대응하는 아미노산 위치 또는 뉴클레오티드 위치에서의 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드가 비교될 수 있다. 제1 서열에서의 위치가 제2 서열에서의 대응하는 위치와 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오티드에 의해 점유되면, 분자는 그 위치에서 동일하다. 두 서열 간의 상동성 비율은 서열에 의해 공유되는 동일 위치 수의 함수이다 (즉, %동일성 = 동일 위치 수/총 위치 수 (예를 들어, 중복 위치) x 100). 일부 실시 형태에서, 두 서열은 동일한 길이로 되어 있다.

[0050] 두 서열 간의 상동성 비율을 측정하기 위해, 문헌[Karlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877]에서와 같이 변형된, 문헌[Karlin and Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268]의 알고리즘이 사용된다. 이러한 알고리즘은 문헌[Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-

410]의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램에 통합된다. BLAST 뉴클레오티드 서치를 NBLAST 프로그램, 스코어=100, 워드 길이=12를 사용하여 행하여, 본 명세서에 기재되거나 개시되는 핵산 문자와 상동인 뉴클레오티드 서열을 얻는다. BLAST 단백질 서치를 XBLAST 프로그램, 스코어=50, 워드 길이=3을 사용하여 행한다. 비교 목적으로 갭트(gapped) 정렬을 얻기 위해, Gapped BLAST를 문헌[Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389-3402]에 기재된 바와 같이 이용한다. BLAST 및 Gapped BLAST 프로그램을 이용하는 경우, 각각의 프로그램(예를 들어, XBLAST 및 NBLAST)의 디폴트 파라미터가 사용된다. 더 자세한 사항은 미국 국립생물공학정보센터(the National Center for Biotechnology Information(NCBI))의 웹사이트를 참조한다(ncbi.nlm.nih.gov의 월드 와이드 웹 상에서). 본 명세서에 기재된 방법에 사용하기에 적합한 단백질은 또한 본 명세서에 기재된 임의의 단백질의 아미노산 서열과 비교하여, 1 내지 15개의 아미노산 변화, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15개의 아미노산 치환, 결실, 또는 첨가를 갖는 단백질을 포함한다. 다른 실시 형태에서, 변경된 아미노산 서열은 본 명세서에 기재된 임의의 단백질의 아미노산 서열에 대하여 적어도 75% 동일한데, 예를 들어, 77%, 80%, 82%, 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일하다. 이러한 서열 변이 단백질은 변경된 아미노산 서열이 본 명세서에 기재된 조성을 및 방법에서 기능하도록 충분한 생물학적 활성을 보유하는 한, 본 명세서에 기재된 방법에 적합하다. 아미노산 치환이 행해지는 경우, 상기 치환은 보존적 아미노산 치환일 것이다. 통상적인 아미노산 중에서, 예를 들어, "보존적 아미노산 치환"은 각각의 하기 그룹 내의 아미노산 중에서의 치환에 의해 예시된다: (1) 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 및 아이소류신, (2) 페닐알라닌, 타이로신, 및 트립토판, (3) 세린 및 트레오닌, (4) 아스파르트산염 및 글루탐산염, (5) 글루타민 및 아스파라긴, 및 (6) 라이신, 아르기닌 및 히스티딘. 당업자는 일반적으로, 폴리펩티드의 비필수 영역에서의 단일 아미노산 치환이 생물학적 활성을 실질적으로 변화시키지 않는다는 것을 인지한다(예를 들어, 문헌[Watson et al. *Molecular Biology of the Gene*, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., p.224] 참조). BLOSUM62 테이블은 단백질 서열 세그먼트의 약 2,000개의 국부다중 정렬로부터 유래된 아미노산 치환 행렬이며, 500개가 넘는 그룹의 관련 단백질의 고도로 보존된 영역을 나타낸다(문헌[Henikoff et al (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10915-10919]). 따라서, BLOSUM62 치환빈도는 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 기재되거나 개시된 아미노산 서열에 도입되는 보존적 아미노산 치환을 하는데 사용된다. 화학적 특성(상술한 바와 같은)에만 기초하여 아미노산 치환을 디자인할 수 있지만, 용어 "보존적 아미노산 치환"은 바람직하게는 -1보다 큰 BLOSUM62 값을 나타내는 치환을 말한다. 예를 들어, 아미노산 치환은 상기 치환이 0, 1, 2, 또는 3의 BLOSUM62 값을 특징으로 하는 경우에 보존적이다. 이러한 시스템에 따라, 바람직한 보존적 아미노산 치환은 적어도 1(예를 들어, 1, 2 또는 3)의 BLOSUM62 값을 특징으로 하며, 더욱 바람직한 보존적 아미노산 치환은 적어도 2(예를 들어, 2 또는 3)의 BLOSUM62 값을 특징으로 한다.

[0051]

본 명세서에 사용되는 대응 잔기는 정렬된 자리에서 발생하는 잔기를 말한다. 관련 또는 변이 폴리펩티드는 당업자에게 공지된 방법에 의해 정렬된다. 이러한 방법은 수동 정렬을 사용하는 것과 같은 방법을 포함하며, 이 용가능한 다수의 정렬 프로그램(예를 들어, BLASTP) 및 당업자에게 공지된 다른 것들을 이용하여 전형적으로 매칭을 최대화한다. 폴리펩티드의 서열을 정렬시킴으로써, 당업자는 가이드로서 보존된 및 동일한 아미노산 잔기를 사용하여 대응 잔기를 동정할 수 있다. 대응 위치는 또한 예를 들어, 단백질 구조의 컴퓨터 시뮬레이트된 정렬을 이용하여, 구조적 정렬에 기초를 둘 수 있다. 다른 경우에는, 대응 영역이 동정될 수 있다.

[0052]

본 명세서에 사용되는 대립유전자 변이체 또는 대립유전자 변이는 유전자의 기준형과 상이한 유전자에 의해 암호화되는 폴리펩티드에 대하여 언급한다(즉, 대립유전자에 의해 암호화됨). 전형적으로 유전자의 기준형은 종의 개체군 또는 종의 단일 기준 구성원 유래의 폴리펩티드의 야생형 및/또는 우세형을 암호화한다. 전형적으로, 종 간의 변이체를 포함하는 대립유전자 변이체는 동종 유래의 야생형 및/또는 우세형과 적어도 80%, 90% 또는 그 이상의 아미노산 동일성을 가지며; 동일성의 정도는 유전자와, 종간 비교인지 또는 종내 비교인지에 따라 다르다. 일반적으로, 종내 대립유전자 변이체는 폴리펩티드의 야생형 및/또는 우세형과의 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 동일성을 비롯하여, 적어도 약 80%, 85%, 90% 또는 95% 이상의 동일성을 갖는다.

[0053]

본 명세서에 사용되는 종 변이체는 종간의 동일한 폴리펩티드의 변이체를 말한다. 일반적으로, 종간 변이체는 폴리펩티드의 야생형 및/또는 우세형과의 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 이상의 동일성을 비롯하여, 다른 종 유래의 야생형 및/또는 우세형과 적어도 약 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 또는 95% 이상의 동일성을 갖는다.

[0054]

본 명세서에 사용되는 용어 "치료하다", "치료하는" 또는 "치료," 및 다른 문법적인 등가물은 질환 또는 상태의 하나 이상의 증상을 경감, 완화 또는 개선하는 것, 질환 또는 상태의 하나 이상의 추가의 증상의 발현, 증증도 또는 빈도를 개선, 예방 또는 저하시키는 것, 질환 또는 상태의 하나 이상의 증상의 근본적인 대사 원인을 개선 또는 예방하는 것, 질환 또는 상태를 억제시키는 것, 예를 들어 질환 또는 상태의 진행을 저지시키는 것, 질환

또는 상태를 완화시키는 것, 질환 또는 상태의 퇴행을 일으키는 것, 질환 또는 상태로 인한 병태를 경감시키는 것, 또는 질환 또는 상태의 증상을 예방적으로 및/또는 치료적으로 억제시키는 것을 포함한다. 비제한적인 예에서, 예방 효과를 위해, 본 명세서에 개시된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 특정 장애에 걸리기 쉬운 특정 장애에 걸릴 위험성이 있는 개체, 또는 장애에 대한 하나 이상의 생리적 증상이 기록된 개체에게 투여된다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 하나 이상의 치료제를 사용한 치료 후에 대상에게 투여된다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 하나 이상의 치료제를 사용한 치료와 병용하여, 대상에게 투여된다.

[0055] 본 명세서에 사용되는 예방은 질환 또는 상태의 발병 위험성을 감소시키는 것을 말한다.

[0056] 본 명세서에 사용되는 용어 "유효량", "치료적 유효량" 또는 "약제학적 유효량"은 장애를 치료하기에 충분한 AR 억제제 화합물의 양을 말한다. 일부 실시 형태에서, 장애의 징후, 증상, 또는 원인의 감소 및/또는 경감, 또는 다른 원하는 생물학적 시스템의 변화를 가져온다. 예를 들어, 치료 용도를 위한 "유효량"은 질환의 임상적으로 유의한 감소를 제공하는데 필요한 본 명세서에 개시된 AR 억제제 화합물을 포함하는 조성물의 양이다. 개개의 경우에 있어서의 적절한 "유효한" 양은 적절한 기술(예를 들어, 용량 증가 시험(dose escalation study))을 이용하여 결정된다.

[0057] 본 명세서에 사용되는 용어 "약제학적으로 허용가능한"은 본 명세서에 기재된 AR 억제제 화합물의 생물학적 활성 또는 생물학적 특성을 제거하지 않으며, 비교적 비독성인 재료 (즉, 상기 재료는 바람직하지 않은 생물학적 작용을 일으키거나 조성물에 함유된 이의 임의의 성분과 유해한 방법으로 상호작용하지 않고서 개체에게 투여됨) (예를 들어, 담체 또는 희석제)를 말한다.

[0058] 본 명세서에 사용되는 "대조군"은 시험 파라미터로 처리되지 않는 것을 제외하고는, 시험 샘플과 실질적으로 동일하거나, 혈장 샘플인 경우에, 관심 상태에 감염되지 않은 정상 지원자로부터 유래될 수 있는 샘플을 말한다. 대조군은 또한 내부 대조군일 수 있다.

[0059] 본 명세서에 사용되는 용어 "대상", "개체" 및 "환자"는 상호교환적으로 사용된다. 어떠한 용어도 의료 전문가(예를 들어, 의사, 간호사, 의사 보조자, 잡역부, 호스피스 직원)의 관리를 필요로 하는 것으로서 해석되지 않을 것이다. 본 명세서에 사용되는 "대상"은 포유류(예를 들어, 인간 또는 비인간 동물) 및 비포유류를 비롯한 동물일 수 있다. 본 명세서에 제공된 방법 및 조성물의 일 실시 형태에서, 포유류는 인간이다.

[0060] 본 명세서에 사용되는 "접촉하는"은 물질에 닿거나, 물질과 접촉하거나, 바로 옆에 근접하게 되는 행위를 말한다. "접촉하는"은 유체 또는 반유동체 혼합물의 성분을 혼합함으로써 행해질 수 있다.

개요: 암에 있어서의 AR 기능 및 억제 내성

[0062] 안드로겐 수용체 (AR)는 스테로이드 및 핵수용체 슈퍼페밀리의 구성원이다. 이러한 큰 단백질 패밀리 중에서, 단지 5종의 척추동물 스테로이드(vertebrate steroid) 수용체가 공지되어 있으며, 안드로겐 수용체, 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체, 글루코코르티코이드 수용체, 및 미네랄로코르티코이드 수용체가 포함된다. AR은 세포내 전사 인자로서 작용하는 가용성 단백질이다. AR 기능은 안드로겐의 결합에 의해 조절되는데, 이는 수용체-단백질 상호작용 및 수용체-DNA 상호작용에 영향을 미치는 수용체의 순차적인 입체구조(sequential conformational) 변화를 개시한다.

[0063] AR은 주로 안드로겐 표적 조직, 예컨대 전립선, 골격근, 간 및 중추 신경계 (CNS)에서 주로 발현되며, 전립선, 부신 및 부고환에서 가장 높은 발현 레벨이 관찰된다. 경우에 따라서는, AR은 테스토스테론 및 5 α -다이하이드로테스토스테론 (5 α -DHT)을 비롯하여, 내인성 안드로겐의 결합에 의해 활성화된다.

[0064] AR은 안드로겐에 의한 활성화 시에, 전립선 상피 세포의 성장 및 분화를 조절하는 표적 유전자의 전사를 매개하는 110 kD 핵수용체이다. AR은 Xq11-12에서의 X 염색체 상에 위치하는 AR 유전자에 의해 암호화된다. AR 유전자는 전장 안드로겐 수용체를 암호화하는 8개의 엑손을 포함한다. 다른 스테로이드 수용체와 유사하게, 비결합 AR은 주로 세포질 내에 위치하며, 리간드 결합 도메인과의 상호작용을 통해서 열 충격 단백질(heat shock protein) (HSP)의 착물과 회합된다. 작용제 결합 시에, AR은 일련의 입체구조 변화를 겪는데, 열 충격 단백질이 AR로부터 해리되고, 형질전환된 AR은 이량체화되고, 인산화되고, 핵으로의 전위가 일어나며, 이는 핵 국소화 신호(nuclear localization signal)에 의해 매개된다. 이어서, 전위된 수용체는 3개의 랜덤 뉴클레오티드에 의해 떨어져 있는 역위 반복 서열(inverted repeat)로서 배열된 2개의 육량체 6-뉴클레오티드 하프-사이트 공통 서열 5'-TGTTCT-3'을 특징으로 하고, AR 유전자 표적의 프로모터 또는 인핸서 영역에 위치하는 안드로겐 반응 요소(ARE)에 결합한다. 다른 전사 공조절 인자(공활성화 인자 및 보조 억제 인자(co-repressor) 포함) 및 전사

기구(transcriptional machinery)의 동원(recruitment)은 적절한 AR 조절 유전자 발현 조절을 더욱 보장한다. 이러한 과정은 리간드 결합 도메인의 리간드 유도 구조 변화에 의해 개시된다.

[0065] AR 신호전달은 전립선을 비롯한 남성 생식 기관의 발달 및 유지에 중요한데, 그 이유는 기능 상실 AR 돌연변을 포함하는 유전자적 융성 및 AR 결합을 갖도록 유전자 조작된 마우스는 전립선을 성장시키지 않기 때문이다. AR 신호전달에 대한 전립선 세포의 이러한 의존성은 악성 형질변환(neoplastic transformation) 시에도 계속된다. 안드로겐 고갈(예를 들어, 생식선 자극 호르몬 방출 호르몬(GnRH) 작용제의 사용)은 계속해서 전립선암의 주력 치료가 되고 있다. 그러나, 안드로겐 고갈은 통상적으로 제한된 기간 동안에 효과적이며, 낮은 레벨의 순환 안드로겐에도 불구하고 전립선암이 진화하여 성장하는 능력을 되찾는다.

[0066] 전립선암은 남성에 있어서의 가장 보편적인 암이다. 전립선암은 남성에 있어서 모든 진단된 신규 암 사례 중 약 29% 및 암사망률의 10%를 나타낸다. 또한, 미국 남성들은 일생에 걸쳐서 침습성 전립선암에 걸릴 가능성이 약 17%이다. 초기 진단 시에, 대부분의 전립선암은 낮은 위험성 내지 중간 정도의 위험성을 나타내는데, 이는 거의 개입이 없이 10년간 사망 위험도가 비교적 낮은(24% 이하) 것을 의미한다. 그러나, 진행성 및 전이성 전립선암은 평균 생존기간이 2.5 내지 3년이며, 수술 및 화학적 거세 요법을 비롯한 적극적인 치료를 받게 된다.

[0067] 대부분의 전립선암 세포가 이의 증식과 생존에 있어서 AR에 좌우된다는 것을 고려하면, 치료는 일반적으로 테스토스테론(예를 들어, GnRH 작용제)의 생성을 저해하는 제제를 단독으로 또는 임의의 잔류 테스토스테론의 작용에 길항하는 항안드로겐(예를 들어, 비칼루타마이드)과 병용하여 투여하는 것으로 구성된다. 불행하게도, 전립선 특이 항원(PSA) 감소 및 있다면, 눈에 보이는 종양의 퇴화에 의해 입증된 바와 같이, 종종 처음에는 성공적이지만, 전이성 종양은 치유적 치료가 존재하지 않는 단계에서는 호르몬 요법에 대하여 내성을 가지게 될 수밖에 없게 된다.

[0068] 호르몬 요법에 대하여 내성을 나타내는 전립선암은 현재 '거세 저항성'으로 명명되는데, 이는 안드로겐 축 상의 임의의 지점을 표적으로 하는 약물이 임상적 유용성을 갖는 지점을 넘어서 진행하는 것을 의미한다. 전임상적 및 임상적 증거는 거세 저항성 암에서도 AR이 생존 치료 표적임을 시사한다. AR 돌연변이가 전립선암 사례 중 33% 이하에서 발생하는 것으로 보고되어 있으며, AR 의존성 거세 저항성 상태에서의 치료 후에 가장 통상적으로 관찰된다. 돌연변이는 리간드 특이성 및 효과를 변화시켜, 리간드 비의존성 수용체 활성을 일으키는 것으로 밝혀졌다. 특이적 돌연변이는 다양하지만, 치료 처방에 좌우되는 것으로 보인다. 게다가, AR 자체의 상향 조절은 환자 및 동물 모델에서 거세 저항성 상태로의 진행과 관련되어 있다.

[0069] 2개의 제제, 아비라테론 아세테이트(abiraterone acetate) (Zytiga; CAS No. 154229-19-3) 및 MDV3100 (엔잘루타마이드; CAS No. 915087-33-7)이 최근에 거세 저항성 전립선암(CRPC)에 걸린 남성의 치료를 위한 후기 임상시험에 사용되어 왔다. 아비라테론 아세테이트는 7- α -하이드록실리아제/17,20-리아제(CYP17A)를 표적으로 하여, 잔류 안드로겐 생합성을 억제시킨다. MDV3100은 AR 과발현과 관련하여, 작용제 활성이 결여된 강력한 항안드로겐의 스크리닝 시에 발견된 항안드로겐이다. MDV3100 및 아비라테론 아세테이트의 임상적 효능은 AR이 거세 저항성 전립선암의 성장과 생존을 지속적으로 촉진시킨다는 가설을 지지한다. 불행하게도, 제1 세대 안드로겐 제거 요법과 유사하게, 아비라테론 아세테이트 또는 제2 세대 AR 길항제를 사용한 장기 치료는 궁극적으로 내성을 초래한다.

[0070] 아비라테론 아세테이트 및 MDV3100에 대한 내성은 전립선암 모델 및 환자에서 관찰되었다. 예비 데이터는 거세 저항성 전립선암과 유사하게, 제2 세대 항안드로겐 내성이 다중 기전을 통해 발현되며, AR이 이러한 세팅에서 치료 표적으로 존재하는 것으로 간주된다는 것을 시사한다. 이중 이식 모델 및 환자에서, CYP17A 상향 조절 및 피코그램 레벨의 안드로겐의 존재가 저항성 개체군에서 주목되었다. CYP17A 상향 조절은 아마도 종양내 안드로겐 합성에 의한 AR 활성화를 통해 내성을 증진시킨다. 다른 경우에는, 내성은 AR 레벨 증가 및 핵 국소화와 상관관계를 갖는다. 게다가, 내인성 리간드의 부재 시에 AR을 활성화시키는 것으로 알려진 다수의 세포 신호전달 경로는 제2 세대 요법 내성을 증진시킬 수 있다. 높은 레벨의 활성화 Src를 갖는 종양이 MDV3100 및 아비라테론 아세테이트 치료에 별로 반응하지 않는다는 관찰은 이러한 가설을 지지한다. 지금까지, AR 돌연변이가 MDV3100, ARN-509 또는 아비라테론에 대한 내성을 부여하는 것으로 기술된 적은 없었다.

[0071] ARN-509는 AR 발현 증가의 세팅에서 완전 길항제 활성을 보유하는 비스테로이드성 항안드로겐을 동정하기 위해 구조-활성 상관(SAR)에 의해 유도된 의약 화학을 이용하여 발견된 합성 티오하이드로인 화합물이다. ARN-509는 전립선암의 거세 감수성 및 저항성 이중 이식 모델에 있어서의 항종양 활성 및 거세를 표현형 모사하는 개에 있어서의 항안드로겐 작용 효과를 나타낸다

[0072] 억제제 내성 포주 및 돌연변이 AR 폴리펩티드의 동정

약물 내성 세포주의 생성을 입증하는 실시예가 본 명세서에 기재되어 있다. 일부 실시 형태에서, 예를 들어, ARN-509, 엔잘루타마이드 (MDV3100) 또는 RD162이나, 이에 한정되지 않는 제2 세대 AR 길항제에 의한 억제에 내성을 나타내는 세포주의 발생을 위해 이용되는 방법이 제공된다. 일부 실시 형태에서, 안드로겐 생성을 억제하며, AR 수용체와의 결합을 나타내는 AR 길항제에 의한 억제에 대하여 내성을 나타내는 세포주의 발생을 위해 이용되는 방법이 제공된다. 일부 실시 형태에서, 안드로겐 생성을 억제하는 AR 길항제는 CYP17A 억제제이며, AR 와의 결합을 나타낸다. 일부 실시 형태에서, 안드로겐 생성을 억제하며, AR 결합을 나타내는 AR 길항제는 갈레테론 (TOKO01) 또는 아비라테론 아세테이트이다. 일부 실시 형태에서, 안드로겐 생성을 억제하며, AR 결합을 나타내는 AR 길항제는 TAK-700이다.

[0074] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 내성 세포주를 거세 저항성 전립선암 (CRPC) 세포 이종 이식에서의 생체 내, 및 항안드로겐제 ARN-509 또는 MDV3100의 농도 증가에의 노출에 의한 안드로겐 반응성 전립선암 세포주에서의 시험관 내에서 발생시켰다. 세포 증식 및 전사 분석에서, 세포주를 2개의 별개의 부류로 분리하였다.

[0075] 부류 1의 세포주는 이의 모세포주(parental cell line)와 비교하여, 높은 레벨의 AR을 발현하여, 첨가된 안드로겐의 부재 하에 증식하였다. 부류 1의 세포의 리간드 비의존성 증식은 ARN-509, MDV3100 또는 비칼루타마이드의 존재 하에 변화되지 않았다. 합성 안드로겐, R1881은 부류 1의 세포의 증식을 억제하였으며, MDV3100 또는 ARN-509에 의해 길항되는데, 이는 이러한 세포주의 AR가 여전히 MDV3100 및 ARN-509에 결합하는 것을 나타낸다.

[0076] 부류 2의 내성 세포주는 이의 모세포주와 유사하게 성장에 대하여 안드로겐 의존성을 유지하였다. ARN-509 및 MDV3100은 모세포주의 증식을 억제시키는 반면에, 두 화합물은 작용제 활성을 나타내고, 부류 2의 세포주의 증식을 촉진시켰다. 부류 2의 세포주에서의 AR을 암호화하는 핵산의 분석에 의해, 세포주가 리간드 결합 도메인에서 돌연변이를 갖는 돌연변이 AR을 발현한 것으로 나타났다. 돌연변이는 티미딘 (T)에서 시토신 (C)으로의 미스센스 돌연변이로, 야생형 AR의 위치 876에서의 류신으로의 페닐알라닌의 아미노산 치환 (F876L)이 일어났다.

[0077] 본 명세서에 기재된 실시예에서, AR 유전자에서의 돌연변이가 ARN-509 1/2상 임상 연구가 행해진 전립선암 환자의 혈장 샘플에서 동정되었다. 동정된 돌연변이는 야생형 AR의 위치 876에서의 류신으로의 페닐알라닌의 아미노산 치환 (F876L)에 있어서, 위치 2988 (AR 유전자의 엑손 8에서 암호화되는, 페닐알라닌을 암호화하는 코돈의 첫 번째 위치)에서의 티미딘 (T)에서 시토신 (C)으로의 미스센스 돌연변이, 및 위치 2990 (페닐알라닌을 암호화하는 코돈의 세 번째 위치)에서의 시토신 (C)에서 알라닌 (A)으로의 미스센스 돌연변이를 포함한다. 이러한 돌연변이를 갖는 것으로 확인된 환자는 또한 연구 과정에 걸쳐서 전립선 특이 항원 (PSA)의 레벨 증가를 나타내었는데, 이는 치료에 대한 내성이 증가된 것을 나타낸다.

[0078] 야생형 AR의 위치 876에서의 류신으로의 페닐알라닌의 아미노산 치환 (F876L)을 포함하는 돌연변이 AR 폴리펩티드, 및 폴리펩티드를 암호화하는 핵산이 본 명세서에 기재되어 있다. 본 명세서에 기재된 돌연변이 AR 핵산 및 폴리펩티드의 생성 방법도 본 명세서에 기재되어 있다. 본 명세서에 기재된 돌연변이 AR 핵산 및 폴리펩티드를 포함하는 조성물, 배합물 및 키트도 본 명세서에 기재되어 있다. 제3 세대 AR 억제제 화합물을 비롯한 안드로겐 억제제를 포함하는 돌연변이 AR 상호작용 분자를 동정하기 위해 돌연변이 AR 폴리펩티드를 사용하는 방법도 제공된다. 돌연변이 AR 상호작용 분자를 포함하는 조성물(이의 약제학적 조성물 포함)도 제공된다. 동정된 돌연변이 AR 상호작용 분자를 이용한 치료 방법도 제공된다. 합성 핵산인 돌연변이 AR 핵산도 본 명세서에 기재되어 있다. cDNA 분자인 돌연변이 AR 핵산도 본 명세서에 기재되어 있다. 합성 핵산인 돌연변이 AR 핵산에 의해 생성되는 돌연변이 AR 폴리펩티드도 본 명세서에 기재되어 있다. cDNA 분자인 돌연변이 AR 핵산에 의해 생성되는 돌연변이 AR 폴리펩티드도 본 명세서에 기재되어 있다. AR 게놈 DNA를 포함하지 않는 돌연변이 AR 핵산도 본 명세서에 기재되어 있다. 비메틸화된 돌연변이 AR 핵산도 본 명세서에 기재되어 있다. AR 인트론 서열을 포함하지 않는 돌연변이 AR 핵산도 본 명세서에 기재되어 있다. AR 게놈 서열의 2개 이상의 엑손으로부터의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 돌연변이 AR 핵산도 본 명세서에 기재되어 있다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 핵산은 야생형 AR 폴리펩티드의 위치 876에 대응하는 위치에서 페닐알라닌을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0079] 본 명세서에 기재된 바와 같이, AR의 위치 876에서의 돌연변이, 예를 들어 F876L의 동정에 의해, 하나 이상의 내성 돌연변이를 갖는 돌연변이 AR의 억제에 효과적인 억제제의 디자인 및 스크리닝이 가능하게 된다. 이러한 억제제는 임상적 및 치료적 용도에 유용하다. 일부 실시 형태에서, 억제제는 예를 들어, AR 매개성 암, 예를 들어, 전립선암, 유방암, 간 (즉, 간세포) 암, 또는 방광암, 예를 들어, 약물 내성 전립선, 유방, 간 (즉, 간세

포), 또는 방광암과 같은 암의 치료에 유용하다.

[0080] 본 명세서에 기재된 일부 실시 형태에서, 대상은 AR의 위치 876에서의 돌연변이, 예를 들어 F876L의 동정을 위해 스크리닝된다. 일부 실시 형태에서, 이러한 돌연변이의 동정에 의해, 암 치료 처방 또는 암 치료 변경을 행할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 이러한 돌연변이의 동정을 이용하여, 특정 요법, 예를 들어, 돌연변이 AR의 활성을 억제시키는 억제제 (즉, 제3 세대 AR 억제제)를 사용한 요법의 대상을 분류한다. 일부 실시 형태에서, 이러한 돌연변이의 동정을 이용하여, 대상을 질환 또는 상태, 예를 들어 전립선암, 유방암, 간 (즉, 간세포) 암, 또는 방광암의 재발 위험성이 높은 것으로서 특징짓는다. 일부 실시 형태에서, 이러한 돌연변이의 동정을 이용하여, 대상을 특정 AR 억제제, 예를 들어 ARN-509, MDV3100, 또는 RD162에 대한 반응성 결여로서 특징짓는다. 일부 실시 형태에서, 이러한 돌연변이의 동정을 이용하여, 대상을 CYP17A 억제제, 예를 들어 갈레테론 (TOK001), TAK-700 또는 아비라테론 아세테이트인 AR 억제제에 대한 반응성 결여로서 특징짓는다.

돌연변이 AR 폴리펩티드

[0082] 돌연변이 AR 폴리펩티드가 본 명세서에 제공된다. 일부 실시 형태에서, 단리된 돌연변이 AR 폴리펩티드는 단리된 돌연변이 AR 폴리펩티드이다. 일부 실시 형태에서, 단리된 돌연변이 AR 폴리펩티드는 비천연(non-native) 돌연변이 AR 폴리펩티드이다. 일부 실시 형태에서, 단리된 돌연변이 AR 폴리펩티드는 재조합 돌연변이 AR 폴리펩티드이다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드는 안드로겐 수용체 활성을 나타낸다. 예를 들어, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 안드로겐 반응 요소에 결합하며, AR 반응성 유전자의 발현을 촉진한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 항안드로겐에 의한 완전 길항작용에 대한 내성을 부여하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 예를 들어, ARN-509, 엔잘루타마이드 (MDV3100) 또는 RD162이나, 이에 한정되지 않는 제2 세대 AR 억제제에 의한 완전 길항작용에 대한 내성을 부여하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 ARN-509에 의한 억제에 대한 내성을 부여하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 엔잘루타마이드 (MDV3100)에 의한 억제에 대한 내성을 부여하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 RD162에 의한 억제에 대한 내성을 부여하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함한다.

[0083] 일부 실시 형태에서, 제2 세대 AR 억제제에 의한 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드의 치료에 의해, AR 활성이 유도된다. 예를 들어, 제2 세대 AR 억제제는 돌연변이 AR 폴리펩티드의 작용제로 작용한다. 일부 실시 형태에서, ARN-509에 의한 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드의 치료에 의해, AR 활성이 유도된다. 일부 실시 형태에서, 엔잘루타마이드 (MDV3100)에 의한 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드의 치료에 의해, AR 활성이 유도된다. 일부 실시 형태에서, RD162에 의한 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드의 치료에 의해, AR 활성이 유도된다.

[0084] 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 서열 번호 1에 기재된 야생형 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에 대응하는 위치에서의 변형(수탁번호 P10275) 또는 서열 번호 2에 기재된 야생형 AR 폴리펩티드에서의 대응 위치에서의 변형(수탁번호 NP_000035.2)을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 변형은 서열 번호 1에 기재된 야생형 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에 대응하는 위치에서의 아미노산 페닐알라닌의 치환이다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 안드로겐 수용체 (AR) 폴리펩티드는 서열 번호 1에 기재된 야생형 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에 대응하는 위치에 페닐알라닌을 포함하지 않는다.

[0085] 일부 실시 형태에서, 변형은 서열 번호 1에 기재된 야생형 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에 대응하는 위치에서의 아미노산 페닐알라닌의 치환이며, 치환된 아미노산은 류신, 아이소류신, 발린, 알라닌, 글리신, 메티오닌, 세린, 트레오닌, 시스테인, 트립토판, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 프롤린, 타이로신, 아스파라긴, 글루타민, 아스파르트산 및 글루탐산 중에서 선택된다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 안드로겐 수용체 (AR) 폴리펩티드는 서열 번호 1에 기재된 야생형 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에 대응하는 위치에 류신, 아이소류신, 발린, 알라닌, 글리신, 메티오닌, 세린, 트레오닌, 시스테인, 트립토판, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 프롤린, 타이로신, 아스파라긴, 글루타민, 아스파르트산 또는 글루탐산을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 변형은 서열 번호 1에 기재된 야생형 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에 대응하는 위치에서의 아미노산 페닐알라닌의 치환이며, 치환된 아미노산은 류신, 아이소류신, 발린, 알라닌, 글리신, 메티오닌 및 트립토판 중에서 선택된다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 안드로겐 수용체 (AR) 폴리펩티드는 서열 번호 1에 기재된 야생형 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에 대응하는 위치에 류신, 아이소류신, 발린, 알라닌, 글리신, 메티오닌 또는 트립토판을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 변형은 서열 번호 1에 기재된 야생형 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에 대

응하는 위치에서의 류신으로의 아미노산 페닐알라닌의 치환이다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 서열 번호 1에 기재된 야생형 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에 대응하는 위치에 류신을 포함한다.

[0086] 일부 실시 형태에서, 변형은 서열 번호 1에 기재된 야생형 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에 대응하는 위치에서의 아미노산 페닐알라닌의 결실을 포함한다.

[0087] 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 서열 번호 5에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서 돌연변이 AR 폴리펩티드는 아미노산 위치 876에 대응하는 위치에 류신을 가지며, 서열 번호 5에 기재된 서열을 갖는 폴리펩티드와 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 아미노산 위치 876에 대응하는 위치에 페닐알라닌을 가지지 않으며, 서열 번호 5에 기재된 서열을 갖는 폴리펩티드와 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다.

[0088] 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 아미노산 위치 876에서의 변형 및 하나 이상의 추가의 아미노산 위치에서의 변형을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 아미노산 위치 876에서의 변형 및 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 이상의 아미노산 위치에서의 변형을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 위치 876에서의 변형 및 하나의 추가의 아미노산 위치에서의 변형을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 아미노산 위치 876에서의 류신 및 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개 또는 그 이상의 추가의 아미노산 위치에서의 변형을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 위치 876에서의 류신 및 하나의 추가의 아미노산 위치에서의 변형을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 아미노산 위치 876에서의 변형은 F876L인 치환이다.

[0089] 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 위치 876에서의 변형 및 제1 세대 또는 제2 세대 AR 길항제 또는 안드로겐 생성을 억제하는 AR 길항제에 대하여 내성을 부여하는 추가의 아미노산 위치에서의 변형을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 아미노산 876에서의 변형이외에도, 아미노산 위치에서의 변형은 아미노산 위치 876에서의 변형 단독을 포함하는 AR 폴리펩티드와 비교하여, 제1 세대 또는 제2 세대 AR 길항제 또는 안드로겐 생성을 억제하는 AR 길항제에 대한 AR 폴리펩티드의 내성을 증가시킨다. 일부 실시 형태에서, 아미노산 위치 876에서의 변형은 F876L인 치환이다.

[0090] 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 위치 876에서의 변형 및 예를 들어, 문헌[Grasso et al. (2012) *Nature* 487(7406):239-43]; 문헌[Ning et al. (2012) *Urology* 80(1):216-8]; 문헌[Cong et al. (2012) *Gene* 500(2):220-3]; 문헌[Hay et al. (2012) *PLoS One* 2012;7(3):e32514]; 문헌[Koochekpour (2010) *Asian J Androl.* 12(5):639-57]; 문헌[Waltering et al. (2012) *Mol Cell Endocrinol.* 360:38-43]; 문헌[Robbins (2012) *Mol Cell Endocrinol.* 352(1-2):26-33]; 또는 문헌[Gottlieb et al. (2012) *Hum Mutat.* 33(5):887-94]에 기재된 AR 변형 중에서 선택되는 변형을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 아미노산 위치 876에서의 변형은 F876L인 치환이다.

[0091] 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 위치 876에서의 변형 및 거세 저항성 전립선암과 관련된 AR 변형을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 거세 저항성 전립선암과 관련된 변형은 예를 들어, T877A, W741C, W741L, W741R, L701H 또는 H874Y와 같은 아미노산 치환이다. 일부 실시 형태에서, 아미노산 위치 876에서의 변형은 F876L인 치환이다.

[0092] 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 아미노산 위치 876에서의 변형 및 아미노산 위치 877에서의 변형을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 위치 876에서의 류신 및 아미노산 위치 877에서의 변형을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 아미노산 위치 877에서의 변형은 아미노산 트레오닌의 치환이다. 일부 실시 형태에서, 아미노산 위치 877에서의 치환된 아미노산은 류신, 아이소류신, 발린, 알라닌, 페닐알라닌, 글리신, 메티오닌, 세린, 시스테인, 트립토판, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 프롤린, 타이로신, 아스파라긴, 글루타민, 아스파르트산 및 글루탐산 중에서 선택된다. 일부 실시 형태에서, 아미노산 위치 877에서의 치환된 아미노산은 알라닌이다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 위치 876에서의 변형 및 아미노산 위치 877에서의 알라닌을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 위치 876에서의 류신 및 아미노산 위치 877에서의 알라닌을 포함한다.

[0093] 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 위치 876에서의 변형 및 아미노산 위치 741에서의 변형을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 위치 876에서의 류신 및 아미노산 위치 741에서의 변형

을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 아미노산 위치 741에서의 변형은 아미노산 트립토판의 치환이다. 일부 실시 형태에서, 아미노산 위치 741에서의 치환된 아미노산은 류신, 아이소류신, 발린, 알라닌, 페닐알라닌, 글리신, 메티오닌, 세린, 트레오닌, 시스테인, 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 프롤린, 타이로신, 아스파라긴, 글루타민, 아스파르트산 및 글루탐산 중에서 선택된다. 일부 실시 형태에서, 아미노산 위치 741에서의 치환된 아미노산은 류신, 시스테인 또는 아르기닌이다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 위치 876에서의 변형 및 아미노산 위치 741에서의 류신을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 위치 876에서의 변형 및 아미노산 위치 741에서의 시스테인을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 위치 876에서의 변형 및 아미노산 위치 741에서의 아르기닌을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 위치 876에서의 류신 및 아미노산 위치 741에서의 류신을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 위치 876에서의 류신 및 아미노산 위치 741에서의 시스테인을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 위치 876에서의 류신 및 아미노산 위치 741에서의 아르기닌을 포함한다.

[0094]

일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 위치 876에서의 변형 및 아미노산 위치 701에서의 변형을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 위치 876에서의 류신 및 아미노산 위치 701에서의 변형을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 아미노산 위치 701에서의 변형은 아미노산 류신의 치환이다. 일부 실시 형태에서, 아미노산 위치 701에서의 치환된 아미노산은 아이소류신, 발린, 알라닌, 페닐알라닌, 글리신, 메티오닌, 히스티딘, 세린, 트레오닌, 시스테인, 라이신, 아르기닌, 트립토판, 프롤린, 타이로신, 아스파라긴, 글루타민, 아스파르트산 및 글루탐산 중에서 선택된다. 일부 실시 형태에서, 아미노산 위치 701에서의 치환된 아미노산은 히스티딘이다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 위치 876에서의 변형 및 아미노산 위치 701에서의 히스티딘을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 위치 876에서의 류신 및 아미노산 위치 701에서의 히스티딘을 포함한다.

[0095]

일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 위치 876에서의 변형 및 아미노산 위치 874에서의 변형을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 위치 876에서의 류신 및 아미노산 위치 874에서의 변형을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 아미노산 위치 874에서의 변형은 아미노산 히스티딘의 치환이다. 일부 실시 형태에서, 아미노산 위치 874에서의 치환된 아미노산은 류신, 아이소류신, 발린, 알라닌, 페닐알라닌, 글리신, 메티오닌, 세린, 트레오닌, 시스테인, 라이신, 아르기닌, 트립토판, 프롤린, 타이로신, 아스파라긴, 글루타민, 아스파르트산 및 글루탐산 중에서 선택된다. 일부 실시 형태에서, 아미노산 위치 874에서의 치환된 아미노산은 타이로신이다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 위치 876에서의 변형 및 아미노산 위치 874에서의 타이로신을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 위치 876에서의 류신 및 아미노산 위치 874에서의 타이로신을 포함한다.

[0096]

일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 위치 876 및 서열 번호 1에 기재된 야생형 AR 폴리펩티드와 관련된 하나 이상의 추가의 아미노산 위치에서의 변형을 포함하는 AR 폴리펩티드 변이체이다. 예시적인 변이체에는 예를 들어, 종 변이체, 대립유전자 변이체, RNA 스플라이싱 변이체, 및 보존적 및 비보존적 아미노산 돌연변 이를 포함하는 변이체가 포함된다. 일부 실시 형태에서, AR 폴리펩티드 변이체는 약 6개의 연속 글루타민 잔기 내지 약 39개의 연속 글루타민 잔기로 된 폴리글루타민 트랙(tract)을 포함한다. 일부 실시 형태에서, AR 폴리펩티드 변이체는 약 16개의 연속 글루타민 잔기 내지 약 29개의 연속 글루타민 잔기로 된 폴리글루타민 트랙을 포함한다. 일부 실시 형태에서, AR 폴리펩티드 변이체는 약 21개의 연속 글루타민 잔기로 된 폴리글루타민 트랙을 포함한다. 일부 실시 형태에서, AR 폴리펩티드 변이체는 약 22개의 연속 글루타민 잔기로 된 폴리글루타민 트랙을 포함한다. 일부 실시 형태에서, AR 폴리펩티드 변이체는 약 23개의 연속 글루타민 잔기로 된 폴리글루타민 트랙을 포함한다. 일부 실시 형태에서, AR 폴리펩티드 변이체는 약 10개의 연속 글리신 잔기 내지 약 27개의 연속 글리신 잔기로 된 폴리글리신 트랙을 포함한다. 일부 실시 형태에서, AR 폴리펩티드 변이체는 약 23개의 연속 글리신 잔기로 된 폴리글리신 트랙을 포함한다. 일부 실시 형태에서, AR 폴리펩티드 변이체는 약 24개의 연속 글리신 잔기로 된 폴리글리신 트랙을 포함한다.

[0097]

일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 서열 번호 5에 기재된 돌연변이 AR 폴리펩티드의 부분을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 상기 부분은 AR 폴리펩티드의 활성을 나타낸다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 서열 번호 5에 기재된 돌연변이 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에서의 변형을 포함하는 AR 폴리펩티드의 리간드 결합 도메인 및 AR 폴리펩티드의 DNA 결합 도메인을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 실질적으로 서열 번호 5에 기재된 돌연변이 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에서의 변형을 포함하는 AR 폴리펩티드의 리간드 결합 도메인 및 AR 폴리펩티드의 DNA 결합 도메인으로 구성된다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 서열 번호 5에 기재된 돌연변이 AR 폴리펩티드의 약 아미노산 위치 554

내지 약 아미노산 위치 919의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 돌연변이 AR 폴리펩티드의 리간드 결합 도메인을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 실질적으로 돌연변이 AR 폴리펩티드의 리간드 결합 도메인으로 구성된다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 약 아미노산 위치 554 내지 약 아미노산 위치 919의 아미노산 서열을 포함한다.

[0098] 일부 실시 형태에서, AR 폴리펩티드는 이종 폴리펩티드에 연결된 서열 번호 1에 기재된 야생형 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에서의 변형을 포함하는 AR 폴리펩티드의 리간드 결합 도메인을 포함하는 융합 단백질이다. 일부 실시 형태에서, 변형은 F876L인 아미노산 치환이다. 융합 단백질의 생성 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 표준 재조합 DNA 기술을 포함한다. 예를 들어, 일부 실시 형태에서, 상이한 폴리펩티드 서열을 암호화하는 DNA 단편은 예를 들어, 라이게이션을 위한 평활 말단화(blunt-ended) 또는 스태거 말단화(stagger-ended) 말단, 적절한 말단을 제공하기 위한 제한 효소 소화, 필요에 따라 부착 말단의 보충(filling-in), 바람직하지 않은 연결을 피하기 위한 알칼리성 포스파타아제 처리, 및 효소적 라이게이션을 이용함으로써, 통상적인 기술에 따라 프레임 내(in-frame)에 함께 라이게이션된다. 일부 실시 형태에서, 융합 유전자는 자동 DNA 합성 장치를 비롯한 통상적인 기술에 의해 합성될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 유전자 단편의 PCR 증폭은 2개의 연속 유전자 단편 사이에 상보적 돌출부를 형성하는 앵커 프라이머를 이용하여 행해질 수 있으며, 이어서 어닐링 및 재증폭되어, 키메라 유전자 서열을 생성할 수 있다(예를 들어, 문헌[Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al. John Wiley & Sons: 1992] 참조). 일부 실시 형태에서, 융합 부분(예를 들어, GST 폴리펩티드)을 암호화하는 발현 벡터가 시판되고 있다. 변형된 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 융합 부분이 프레임 내에 변형된 AR 폴리펩티드에 연결되도록 이러한 발현 벡터로 클로닝될 수 있다.

[0099] 일부 실시 형태에서, AR 폴리펩티드는 비상동 DNA 결합 도메인에 연결된 서열 번호 1에 기재된 야생형 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에서의 변형을 포함하는 AR 폴리펩티드의 리간드 결합 도메인을 포함하는 융합 단백질이다. 일부 실시 형태에서, AR 폴리펩티드는 비상동 DNA 결합 도메인에 연결된 서열 번호 5에 기재된 돌연변이 AR 폴리펩티드의 리간드 결합 도메인을 포함하는 융합 단백질이다. 일부 실시 형태에서, 비상동 DNA 결합 도메인은 GAL4 DNA 결합 도메인이다. 일부 실시 형태에서, 비상동 DNA 결합 도메인은 LexA DNA 결합 도메인이다. 일부 실시 형태에서, AR 폴리펩티드의 리간드 결합 도메인은 웨티드 링커를 통해 비상동 DNA 결합 도메인에 연결된 서열 번호 1에 기재된 야생형 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에서의 변형을 포함한다. 일부 실시 형태에서, AR 폴리펩티드는 웨티드 링커를 통해 비상동 DNA 결합 도메인에 연결된 서열 번호 5에 기재된 돌연변이 AR 폴리펩티드의 리간드 결합 도메인을 포함하는 융합 단백질이다.

[0100] 일부 실시 형태에서, AR 폴리펩티드는 예를 들어, 효모 투 하이브리드 분석, 포유류 세포에 기초한 투 하이브리드(M2H) 시스템, 퍼르스터(Förster(형광)) 공명 에너지 전이 (FRET) 분석, 생물 발광 공명 에너지 전이 (BRET), 또는 균일한 시간 분해 형광 (HTRF®) 분석이나, 이에 한정되지 않는 단백질 상호작용 분석에 사용되는 이종 웨티드에 연결된 서열 번호 1에 기재된 야생형 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에서의 변형을 포함하는 AR 폴리펩티드의 리간드 결합 도메인을 포함하는 융합 단백질이다. 일부 실시 형태에서, AR 폴리펩티드는 예를 들어, 효모 투 하이브리드 분석, 포유류 세포에 기초한 투 하이브리드(M2H) 시스템, 퍼르스터(형광) 공명 에너지 전이 (FRET) 분석, 생물 발광 공명 에너지 전이 (BRET), 또는 균일한 시간 분해 형광 (HTRF®) 분석이나, 이에 한정되지 않는 단백질 상호작용 분석에 사용되는 이종 웨티드에 연결된 서열 번호 5에 기재된 돌연변이 AR 폴리펩티드의 리간드 결합 도메인을 포함하는 융합 단백질이다.

[0101] 일부 실시 형태에서, AR 폴리펩티드의 리간드 결합 도메인은 검출가능한 폴리펩티드에 연결된 서열 번호 1에 기재된 야생형 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에서의 변형을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 서열 번호 5에 기재된 돌연변이 AR 폴리펩티드의 리간드 결합 도메인은 검출가능한 폴리펩티드에 연결된다. 일부 실시 형태에서, AR 폴리펩티드의 리간드 결합 도메인은 예를 들어, 그린 (GFP), 레드 (RFP), 시안 (CFP), 옐로 (YFP), 또는 블루 (BFP) 형광 단백질이나, 이에 한정되지 않는 형광 단백질에 연결된 서열 번호 1에 기재된 야생형 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에서의 변형을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 서열 번호 5에 기재된 돌연변이 AR 폴리펩티드의 리간드 결합 도메인은 예를 들어, 그린 (GFP), 레드 (RFP), 시안 (CFP), 옐로 (YFP), 또는 블루 (BFP) 형광 단백질이나, 이에 한정되지 않는 형광 단백질에 연결된다. 일부 실시 형태에서, AR 폴리펩티드의 리간드 결합 도메인은 생물 발광 단백질에 연결된 서열 번호 1에 기재된 야생형 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에서의 변형을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 서열 번호 5에 기재된 돌연변이 AR 폴리펩티드의 리간드 결합 도메인은 생물 발광 단백질에 연결된다. 일부 실시 형태에서, AR 폴리펩티드의 리간드 결합 도메인은 웨티드 태그(tag)에 연결된 서열 번호 1에 기재된 야생형 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에서의 변형을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 서열 번호 5에 기재된 돌연변이 AR 폴리펩티드의 리간드 결합 도메인은 웨티드 태그

에 연결된다. 일부 실시 형태에서, 펩티드 태그는 태그 특이적 항체로 식별되는 에피토프 태그이다. 일부 실시 형태에서, 태그는 예를 들어, c-myc, V-5, 혈구응집소 (HA), FLAG이나, 이에 한정되지 않는 에피토프 태그이다. 일부 실시 형태에서, 태그는 예를 들어, 비오틴, 스트렙 태그(strep-tag), 키친 결합 단백질 (CBP), 말토스 결합 단백질 (MBP), 글루타티온-S-트랜스페라아제 (GST), 또는 폴리(His) 태그이나, 이에 한정되지 않는 친화성 태그이다.

[0102] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드를 포함하는 어레이가 본 명세서에 제공된다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 마이크로칩에 결합된다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 마이크로칩에 직접 결합된다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 링커를 통해 마이크로칩에 간접적으로 결합된다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드를 포함하는 마이크로칩 어레이가 본 명세서에 제공된다.

핵산

[0104] 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산이 본 명세서에 제공된다. 본 명세서에 기재된 돌연변이 AR 폴리펩티드 중 어느 하나를 암호화하는 핵산이 본 명세서에 제공된다. 특정 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 추정하는 방법이 당업계에 공지되어 있으며, 표준 분자생물학적 기법을 포함한다. 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 예시적인 핵산이 제공된다. 유전 암호의 다중 변이체의 퇴화로 인해, 동일한 폴리펩티드를 암호화하는 핵산이 존재하는 것으로 여겨진다. 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 이러한 변이체를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 핵산은 합성 핵산이다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 핵산은 cDNA 문자이다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 핵산은 게놈 DNA를 포함하지 않는다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 핵산은 비메틸화된다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 핵산은 AR 폴리펩티드의 위치 876을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 엑손 8 또는 이의 부분을 비롯하여, AR 게놈 서열의 2개 이상의 엑손으로부터의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 핵산은 야생형 AR 폴리펩티드의 위치 876에 대응하는 위치에서 페닐알라닌을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0105] 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 야생형 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산에 대한 변형을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 암호화된 폴리펩티드가 서열 번호 1에 기재된 야생형 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에 대응하는 위치에서의 아미노산 페닐알라닌의 치환을 포함하는 변형을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 암호화된 폴리펩티드가 서열 번호 1에 기재된 야생형 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에 대응하는 위치에 페닐알라닌을 포함하지 않는 변형을 포함한다.

[0106] 일부 실시 형태에서, 핵산 변형은 폴리펩티드를 암호화하는 하나 이상의 코돈의 미스센스 돌연변이 또는 결실이다. 일부 실시 형태에서, 변형은 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에서의 페닐알라닌을 암호화하는 핵산 코돈을 변경하는 미스센스 돌연변이이다. 일부 실시 형태에서, AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에서의 페닐알라닌을 암호화하는 핵산 코돈은 TTC 또는 TTT이다. 일부 실시 형태에서, AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에서의 페닐알라닌을 암호화하는 핵산 코돈은 TTC이다. 일부 실시 형태에서, AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에서의 페닐알라닌을 암호화하는 핵산 코돈은 TTT이다. 일부 실시 형태에서, 변형은 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에서의 페닐알라닌을 암호화하는 핵산 코돈을 TTC에서 류신을 암호화하는 핵산 코돈으로 변경한다. 일부 실시 형태에서, 변형은 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에서의 페닐알라닌을 암호화하는 핵산 코돈을 TTT에서 류신을 암호화하는 핵산 코돈으로 변경한다. 일부 실시 형태에서, 류신을 암호화하는 핵산 코돈은 TTA, TTG, CTT, CTC, CTA 또는 CTG 중에서 선택된다.

[0107] 일부 실시 형태에서, 변형은 시토신 (C)으로의 티민 (T)의 치환을 포함하는 미스센스 돌연변이이다. 일부 실시 형태에서, 변형은 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에서의 페닐알라닌을 암호화하는 핵산 코돈을 TTC에서 CTC로 변경한다. 일부 실시 형태에서, 변형은 서열 번호 18에 기재된 AR 핵산 서열의 핵산 위치 2626에서의 시토신 (C)으로의 티민 (T)의 치환을 포함하는 미스센스 돌연변이이다.

[0108] 일부 실시 형태에서, 변형은 아데닌 (A)으로의 티민 (T)의 치환을 포함하는 미스센스 돌연변이이다. 일부 실시 형태에서, 변형은 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에서의 페닐알라닌을 암호화하는 핵산 코돈을 TTT에서 TTA로 변경한다. 일부 실시 형태에서, 변형은 서열 번호 18에 기재된 AR 핵산 서열의 핵산 위치 2628에서의 아데닌 (A)으로의 티민 (T)의 치환을 포함하는 미스센스 돌연변이이다.

- [0109] 일부 실시 형태에서, 변형은 구아닌 (G)으로의 티민 (T)의 치환을 포함하는 미스센스 돌연변이이다. 일부 실시 형태에서, 변형은 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에서의 페닐알라닌을 암호화하는 핵산 코돈을 TTT에서 TTG로 변경한다. 일부 실시 형태에서, 변형은 서열 번호 18에 기재된 AR 핵산 서열의 핵산 위치 2628에서의 구아닌 (G)으로의 티민 (T)의 치환을 포함하는 미스센스 돌연변이이다.
- [0110] 일부 실시 형태에서, 변형은 AR 폴리펩티드의 F876을 암호화하는 코돈의 첫 번째 위치에서의 시토신 (C)으로의 티민 (T)의 치환을 포함하는 미스센스 돌연변이, 및 AR 폴리펩티드의 F876을 암호화하는 코돈의 세 번째 위치에서의 아데노신 (A)으로의 티민 (T)의 치환을 포함하는 제2 미스센스 돌연변이를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 변형은 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에서의 페닐알라닌을 암호화하는 핵산 코돈을 TTT에서 CTA로 변경한다. 일부 실시 형태에서, 변형은 서열 번호 18에 기재된 AR 핵산 서열의 핵산 위치 2626에서의 시토신 (C)으로의 티민 (T)의 치환을 포함하는 미스센스 돌연변이, 및 핵산 위치 2628에서의 아데노신 (A)으로의 티민 (T)의 치환을 포함하는 제2 미스센스 돌연변이이다.
- [0111] 일부 실시 형태에서, 변형은 AR 폴리펩티드의 F876을 암호화하는 코돈의 첫 번째 위치에서의 시토신 (C)으로의 티민 (T)의 치환을 포함하는 미스센스 돌연변이, 및 AR 폴리펩티드의 F876을 암호화하는 코돈의 세 번째 위치에서의 구아니딘 (G)으로의 티민 (T)의 치환을 포함하는 제2 미스센스 돌연변이를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 변형은 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에서의 페닐알라닌을 암호화하는 핵산 코돈을 TTT에서 CTG로 변경한다. 일부 실시 형태에서, 변형은 서열 번호 18에 기재된 AR 핵산 서열의 핵산 위치 2626에서의 시토신 (C)으로의 티민 (T)의 치환을 포함하는 미스센스 돌연변이, 및 핵산 위치 2628에서의 구아니딘 (G)으로의 티민 (T)의 치환을 포함하는 제2 미스센스 돌연변이이다.
- [0112] 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 서열 번호 19에 기재된 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 서열 번호 19에 기재된 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산과 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 뉴클레오티드 산 서열 동일성을 갖는 핵산을 포함하며, 암호화된 돌연변이 AR은 아미노산 위치 876에 대응하는 위치에서의 야생형 AR 폴리펩티드에 대한 변형을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 서열 번호 19에 기재된 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산과 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 뉴클레오티드 산 서열 동일성을 갖는 핵산을 포함하며, 암호화된 돌연변이 AR은 아미노산 위치 876에 대응하는 위치에 페닐알라닌을 포함하지 않는다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 서열 번호 19에 기재된 뉴클레오티드 서열을 갖는 핵산과 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 뉴클레오티드 산 서열 동일성을 갖는 핵산을 포함하며, 암호화된 돌연변이 AR은 아미노산 위치 876에 대응하는 위치에서의 류신을 포함한다.
- [0113] 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 본 명세서에 제공된 핵산은 단리된 핵산이다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 본 명세서에 제공된 핵산은 DNA 분자이다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 본 명세서에 제공된 핵산은 cDNA 분자이다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 본 명세서에 제공된 핵산은 RNA 분자이다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 본 명세서에 제공된 핵산은 억제 RNA 분자(즉, RNAi)이다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 핵산은 상보적인 핵산 분자이거나, 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산에 결합한다.
- [0114] 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드 또는 이의 부분을 암호화하는 본 명세서에 제공된 핵산은 페닐알라닌이 아닌, 위치 876에서의 아미노산을 암호화하는 핵산을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드 또는 이의 부분을 암호화하는 본 명세서에 제공된 핵산은 아미노산 위치 876에서의 류신을 암호화하는 핵산을 포함한다.
- [0115] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 핵산은 돌연변이 AR 폴리펩티드의 부분을 암호화하는 올리고뉴클레오티드이다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 핵산은 아미노산 위치 876에 대응하는 아미노산을 암호화하는 뉴클레오티드 코돈을 포함하는 돌연변이 AR 폴리펩티드의 부분을 암호화하는 올리고뉴클레오티드이다. 일부 실시 형태에서, 코돈은 페닐알라닌이 아닌 아미노산을 암호화한다. 일부 실시 형태에서, 코돈은 류신인 아미노산을 암호화한다.
- [0116] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 핵산은 본 명세서에 제공된 임의의 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 벡터이다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 임의의 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 벡터인 본 명세서에 제공된 핵산은 발현 벡터이다. 일부 실시 형태에서, 본 명세

서에 제공된 임의의 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 벡터인 본 명세서에 제공된 핵산은 돌연변이 AR 폴리펩티드의 발현을 위해 프로모터에 작동가능하게 연결되어 있다.

[0117] 일부 실시 형태에서, 벡터는 플라스미드 벡터이다. 일부 실시 형태에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 실시 형태에서, 바이러스 벡터는 DNA 또는 RNA 바이러스 벡터이다. 예시적인 바이러스 벡터는 백시니아 (vaccinia), 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스 (AAV), 레트로바이러스, 또는 헤르페스바이러스 벡터를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0118] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 임의의 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 어레이가 본 명세서에 제공된다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 핵산은 마이크로칩에 결합된다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 핵산은 마이크로칩에 직접 결합된다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 핵산은 링커를 통해 마이크로칩에 간접적으로 결합된다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 임의의 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 마이크로칩 어레이가 본 명세서에 제공된다.

핵산 및 폴리펩티드의 생성

[0120] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 핵산 분자는 표준 재조합 방법에 의해 생성된다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 핵산 분자는 계놈 DNA로부터의 돌연변이 AR 서열의 중복에 의해 생성된다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 핵산 분자는 AR 서열 특이적 프라이머를 사용하여 폴리머라제 연쇄 반응에 의해 생성된다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 핵산 분자는 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 mRNA의 역전사에 의해 생성된다.

[0121] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 핵산 분자는 발현 벡터에 삽입되며, 숙주 세포 또는 비세포 추출물에서 발현된다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 핵산 분자는 세포 또는 비세포 추출물에서의 암호화 폴리펩티드의 발현을 위해 프로모터에 작동가능하게 연결되어 있다. 일부 실시 형태에서, 프로모터는 구성적 프로모터이다. 일부 실시 형태에서, 프로모터는 유도성 프로모터이다.

[0122] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자는 세포에 대하여 "외인성"인데, 이는 벡터가 도입되는 세포와 상이하거나, 서열이 세포의 서열과 상동성을 갖지만 서열이 통상 발견되지 않는 숙주 세포 핵산 내의 위치에 있는 것을 의미한다. 벡터는 플라스미드, 코스미드, 바이러스 (박테리오파지, 동물 바이러스, 및 식물 바이러스), 및 인공 염색체 (예를 들어, YAC)를 포함한다. 당업자는 본 명세서에 참조로 포함되는 문헌 [Sambrook et al., 1989] 및 문헌 [Ausubel et al., 1996]에 기재되어 있는 표준 재조합 기술을 통해 벡터를 구축하는데 충분한 능력을 갖추고 있을 것이다.

[0123] 세포에서의 단백질 발현 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 세포, 예컨대 동물 및 식물 세포에서의 발현을 포함한다. 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드의 발현을 위한 예시적인 동물 세포는 세균, 효모, 곤충 세포, 및 예를 들어 인간, 영장류, 설치류, 소, 및 양 세포와 같은 포유류 세포를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR을 암호화하는 핵산은 숙주 세포 계놈에 통합된다.

[0124] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드의 발현 방법은 돌연변이 AR 폴리펩티드가 숙주 세포에 의해 생성되도록 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 발현 벡터를 포함하는 숙주 세포를 배양하는 것을 포함한다. 일부 방법에서, 돌연변이 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 신호 서열이 돌연변이 AR 폴리펩티드와의 융합 펩티드로서 발현되도록 신호 서열을 암호화하는 핵산에 연결된다. 일부 실시 형태에서, 신호 서열에 의해 숙주 세포에 의한 돌연변이 AR 폴리펩티드의 분비를 가능하게 한다.

[0125] 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 돌연변이 폴리펩티드를 발현하는 숙주 세포로부터 단리된다. 일부 실시 형태에서, 추출물은 숙주 세포로부터 제조되며, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 예를 들어, ARN-509, 엔잘루타마이드 (MDV3100) 또는 RD162이나 이에 한정되지 않는 제2 세대 억제제의 존재 하에 돌연변이 AR 폴리펩티드에 결합

항체

[0127] 일부 실시 형태에서, 항체는 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드에 결합하며, 야생형 AR 폴리펩티드에 낮은 친화성으로 결합하거나 결합하지 않는다. 일부 실시 형태에서, 항체는 예를 들어, ARN-509, 엔잘루타마이드 (MDV3100) 또는 RD162이나 이에 한정되지 않는 제2 세대 억제제의 존재 하에 돌연변이 AR 폴리펩티드에 결합

한다.

[0128]

일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드는 돌연변이 AR 폴리펩티드를 특이적으로 인식 하지만, 야생형 AR 폴리펩티드를 인식하지 않는 항체를 사용하여 검출된다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드는 아미노산 위치 876에 류신을 갖는 돌연변이 AR 폴리펩티드를 특이적으로 인식 하지만, 야생형 AR 폴리펩티드를 인식하지 않는 항체를 사용하여 검출된다. 일부 실시 형태에서, 항체는 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드의 하나 이상의 대립유전자형에 대하여 발생된다. 웨პ티드 또는 단백질 상의 에피토프를 특이적으로 인식하는 항체를 유도하는 항원으로서 특이 단백질 또는 올리고펩티드를 사용하는 기술이 잘 알려져 있다. 일부 실시 형태에서, 표적 유전자의 원하는 대립유전자형의 DNA 서열은 적절한 발현 벡터에로의 삽입에 의해 클로닝되며, 원핵생물 또는 진핵생물 숙주 세포에서 단백질로 번역된다. 단백질은 회수되어, 특이 항체의 생성을 유도하는 항원으로서 사용될 수 있다. 다른 실시 형태에서, 표적 유전자의 원하는 대립유전자형의 DNA는 PCR 기술에 의해 증폭되고, 이어서 특이 항체의 생성을 유도하는 항원으로서 사용되도록 시험관 내에서 단백질로 번역된다. 다른 실시 형태에서, 대체 대립유전자의 DNA 서열은 특이 항체의 생성을 유도하는 항원으로서 사용되는 대립유전자의 아미노산 서열을 나타내는 합성 웨პ티드의 생성 기준으로서 사용된다.

[0129]

일부 실시 형태에서, 항체는 표준 모노클로날 항체 기술에 의해 생성되거나, 재조합에 기초한 발현 시스템을 통해 생성된다. 일반적으로, 문헌[Abbas, Lichtman, and Pober, Cellular and Molecular Immunology, W. B. Saunders Co. (1991)]을 참조한다. 용어 "항체"는 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 무상 (intact) 항체 분자 및 항체 단편 또는 유도체, 예컨대 Fab 및 F(ab')²를 포함하는 것으로 의미된다. 이렇게 하여 생성된 항체는 항체를 생성시키도록 항원으로서 사용된 대립유전자형에 생성된 돌연변이 단백질에만 우선적으로 결합한다. 대립유전자 특이 항체를 생성하는 방법은 또한 그 전체 내용이 본 명세서에 참조로 포함되는 미국 특허 제 6,200,754호 및 미국 특허 제6,054,273호에 기재되어 있다.

[0130]

일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 항체는 인간화 항체이다. "인간화 항체"는 비인간 공여자(donor) 면역글로불린으로부터 유래된 이의 CDR을 갖는 유전자 조작된 항체 타입을 말하며, 분자의 잔존하는 면역글로불린 유래 부분은 하나 이상의 인간 면역글로불린(들)으로부터 유래된다. 일부 실시 형태에서, 프레임워크 지지 잔기 (framework support residue)를 변경하여, 결합친화성을 유지한다(예를 들어, 문헌[Queen et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson et al. Bio/Technology, 9:421 (1991)] 참조). 일부 실시 형태에서, 적절한 인간 수용자(acceptor) 항체는 공여자 항체의 뉴클레오티드 및 아미노산 서열에 대한 상동성에 따라, 통상적인 데이터베이스, 예를 들어, 카바트(KABAT)® 데이터베이스, 로스 알라모스(Los Alamos) 데이터베이스, 및 스위스 프로테인(Swiss Protein) 데이터베이스 중에서 선택되는 항체이다. 일부 실시 형태에서, 공여자 항체의 프레임워크 영역에 대한 상동성(아미노산 기준으로)을 특징으로 하는 인간 항체는 공여자 CDR의 삽입을 위해 중쇄 불변 영역 및/또는 중쇄 가변 프레임워크 영역을 제공하는데 적합하다. 일부 실시 형태에서, 경쇄 불변 또는 가변 프레임워크 영역을 공여할 수 있는 적절한 수용자 항체는 유사한 방식으로 선택된다. 일부 실시 형태에서, 수용자 항체 중쇄 및 경쇄는 동일한 수용자 항체에서 유래된다. 일부 실시 형태에서, 수용자 항체 중쇄 및 경쇄는 상이한 수용자 항체에서 유래된다. 종래 기술은 이러한 인간화 항체를 생성하는 여러가지 방법을 설명하고 있다 - 예를 들어, EP-A-0239400 및 EP-A-054951을 참조한다.

[0131]

일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드에 특이적인 항체는 당업계에 공지된 기술을 이용하여, 샘플, 예를 들어, 분석 샘플, 세포 샘플, 세포 추출물, 생물 샘플, 또는 환자 샘플에서 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드의 존재를 검출하는데 사용될 수 있다. 이러한 기술은 예를 들어, 웨스턴 블롯, 면역조직화학, 간접 면역형광법, 및 항체 마이크로어레이를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드를 특이적으로 인식하는 항체는 제3 세대 AR 억제제이다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드의 생물학적 활성을 억제하는, 돌연변이 AR 폴리펩티드를 특이적으로 인식하는 항체의 능력은 본 명세서에 기재된 제3 세대 AR 억제제의 동정 방법을 이용하여 측정될 수 있다.

[0132]

돌연변이 AR 폴리펩티드, 및 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 검출하기 위한 진단 분석

[0133]

대상의 돌연변이 AR 폴리펩티드 또는 대상의 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 검출을 포함하는 진단 방법이 본 명세서에 기재되어 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 AR 매개성 질환 또는 상태를 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 항안드로겐, 예컨대 제1 세대 또는 제2 세대 AR 길항체를 사용한 요법에 대하여 내성을 나타내는 암을 앓고 있는 대상을 스크리닝하는 단계, 항안드로겐, 예컨대 제1 세대 또는 제2 세대 AR 길항체를 사용한 치료에 관한 대상을 동정하는 단계, 항안드로겐 요법제, 예컨대 제1 세대 또는 제2 세대 AR 길항체가 투여되는 대상의 요법을 모니터링하는 단계, 항안드로겐 요법제, 예컨대 제1 세대 또는 제2 세대 AR 길항체가 투여

되는 대상의 요법을 최적화하는 단계, 및 이들의 조합에 관한 진단 방법이 사용된다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 제3 세대 AR 길항제를 사용한 요법에 관한 대상을 선택하는 단계를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 본 명세서에 기재된 제3 세대 AR 길항제를 대상에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 검출된 돌연변이 AR 폴리펩티드는 서열 번호 1에 기재된 야생형 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에 대응하는 위치에서의 변형을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 검출된 돌연변이 AR 폴리펩티드는 서열 번호 1에 기재된 야생형 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에 대응하는 위치에서의 류신으로의 아미노산 페닐알라닌의 치환을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 아미노산 위치 876에서의 변형을 포함하는 돌연변이 AR 폴리펩티드를 갖는 대상은 제1 세대 또는 제2 세대 길항제를 사용한 억제에 대하여 내성을 나타낸다.

[0134] 일부 실시 형태에서, 아미노산 위치 876에서의 변형을 포함하는 돌연변이 AR 폴리펩티드를 갖는 대상은 제1 세대 또는 제2 세대 길항제를 사용한 억제에 대하여 내성을 나타낸다. 일부 실시 형태에서, 아미노산 위치 876에서의 변형을 포함하는 돌연변이 AR 폴리펩티드를 갖는 대상은 제1 세대 및 제2 세대 길항제를 사용한 억제에 대하여 내성을 나타낸다. 일부 실시 형태에서, 아미노산 위치 876에서의 류신을 포함하는 돌연변이 AR 폴리펩티드를 갖는 대상은 제1 세대 및 제2 세대 길항제를 사용한 억제에 대하여 내성을 나타낸다. 일부 실시 형태에서, 아미노산 위치 876에서의 류신을 포함하는 돌연변이 AR 폴리펩티드를 갖는 대상은 제1 세대 또는 제2 세대 길항제를 사용한 억제에 대하여 내성을 나타낸다. 일부 실시 형태에서, 아미노산 위치 876에서의 변형을 포함하는 돌연변이 AR 폴리펩티드를 갖는 대상은 AR에 결합하는 CYP17A 억제제, 예를 들어 갈레테론 (TOK001), TAK-700 또는 아비라테론 아세테이트를 사용한 억제에 대하여 내성을 나타낸다. 일부 실시 형태에서, 아미노산 위치 876에서의 변형을 포함하는 돌연변이 AR 폴리펩티드를 갖는 대상은 AR에 결합하는 CYP17A 억제제, 예를 들어 갈레테론 (TOK001), TAK-700 또는 아비라테론 아세테이트를 사용한 억제에 대하여 내성을 나타낸다.

[0135] 일부 실시 형태에서, (a) AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는, 대상으로부터의 샘플을 분석하여, 암호화된 AR 폴리펩티드가 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 876에 대응하는 아미노산 위치에서 변형되는지를 결정하는 단계; 및 (b) 대상이 변형을 갖는 경우에 제2 세대 AR 길항제를 사용한 억제에 대하여 내성을 갖는 것으로 AR을 특징짓는 단계를 포함하는, 대상에서 제2 세대 AR 길항제를 사용한 억제에 대하여 내성을 나타내는 AR 폴리펩티드의 특성화 방법이 제공된다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 돌연변이 AR의 억제를 위해 본 명세서에 제공된 제3 세대 AR 길항제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 제2 세대 AR 길항제를 투여하지 않는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 대상이 변형을 갖지 않는 경우에 제2 세대 AR 길항제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 대상은 암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 전립선암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 거세 저항성 전립선암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 핵산 샘플을 대상으로부터 얻는 단계를 추가로 포함한다.

[0136] 일부 실시 형태에서, (a) AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는, 대상으로부터의 샘플을 분석하여, 암호화된 AR 폴리펩티드가 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 876에 대응하는 아미노산 위치에서 변형되는지를 결정하는 단계; 및 (b) 대상이 변형을 갖는 경우에 제1 세대 AR 길항제를 사용한 억제에 대하여 내성을 갖는 것으로 AR을 특징짓는 단계를 포함하는, 대상에서 제1 세대 AR 길항제를 사용한 억제에 대하여 내성을 나타내는 AR의 특성화 방법이 제공된다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 돌연변이 AR의 억제를 위해 본 명세서에 제공된 제3 세대 AR 길항제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 제2 세대 AR 길항제를 투여하지 않는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 대상이 변형을 갖지 않는 경우에 제2 세대 AR 길항제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 대상은 암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 전립선암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 거세 저항성 전립선암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 핵산 샘플을 대상으로부터 얻는 것을 추가로 포함한다.

[0137] 일부 실시 형태에서, (a) AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는, 대상으로부터의 샘플을 분석하여, 암호화된 AR 폴리펩티드가 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 876에 대응하는 아미노산 위치에서 변형되는지를 결정하는 단계; 및 (b) 대상이 변형을 갖는 경우에 CYP17A 억제제인 AR 길항제를 사용한 억제에 대하여 내성을 갖는 것으로 AR을 특징짓는 단계를 포함하는, 대상에서 CYP17A 억제제인 AR 길항제를 사용한 억제에 대하여 내성을 나타내는 AR의 특성화 방법이 제공된다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 돌연변이 AR의 억제를 위해 본 명세서에 제공된 제3 세대 AR 길항제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 제2 세대 AR 길항제를 투여하지 않는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 대상이 변형을 갖지 않는 경우에 제2 세대 AR 길항제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 대상은 암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 전립선암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 거세 저항성 전립선암을 앓고 있다.

은 거세 저항성 전립선암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, CYP17A 억제제는 갈레테론 (TOK001), TAK-700 또는 아비라테론 아세테이트이다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 핵산 샘플을 대상으로부터 얻는 것을 추가로 포함한다.

[0138] 일부 실시 형태에서, (a) AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는, 대상으로부터의 샘플을 분석하여, 암호화된 AR 폴리펩티드가 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 876에 대응하는 아미노산 위치에서 변형되는지를 결정하는 단계; 및 (b) 대상이 변형을 갖지 않는 경우에 제2 세대 AR 길항제를 사용한 요법에 대한 후보자로서 대상을 특징짓는 단계를 포함하는, 제2 세대 AR 길항제를 사용한 요법에 대한 대상을 선택하는 방법이 제공된다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 대상이 변형을 갖는 경우에 제2 세대 AR 길항제를 사용한 요법에 대한 후보자가 아닌 것으로서 대상을 특징짓는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 돌연변이 AR의 억제를 위해 본 명세서에 제공된 제3 세대 AR 길항제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 대상은 암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 전립선암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 거세 저항성 전립선암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 핵산 샘플을 대상으로부터 얻는 단계를 추가로 포함한다.

[0139] 일부 실시 형태에서, (a) AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는, 대상으로부터의 샘플을 분석하여, 암호화된 AR 폴리펩티드가 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 876에 대응하는 아미노산 위치에서 변형되는지를 결정하는 단계; 및 (b) 대상이 변형을 갖지 않는 경우에 제1 세대 AR 길항제를 사용한 요법에 대한 후보자로서 대상을 특징짓는 단계를 포함하는, 제1 세대 AR 길항제를 사용한 요법에 대한 대상을 선택하는 방법이 제공된다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 대상이 변형을 갖는 경우에 제1 세대 AR 길항제를 사용한 요법에 대한 후보자가 아닌 것으로서 대상을 특징짓는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 돌연변이 AR의 억제를 위해 본 명세서에 제공된 제3 세대 AR 길항제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 대상은 암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 전립선암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 거세 저항성 전립선암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 핵산 샘플을 대상으로부터 얻는 단계를 추가로 포함한다.

[0140] 일부 실시 형태에서, (a) AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는, 대상으로부터의 샘플을 분석하여, 암호화된 AR 폴리펩티드가 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 876에 대응하는 아미노산 위치에서 변형되는지를 결정하는 단계; 및 (b) 대상이 변형을 갖지 않는 경우에 CYP17A 억제제인 AR 길항제를 사용한 요법에 대한 후보자로서 대상을 특징짓는 단계를 포함하는, CYP17A 억제제인 AR 길항제를 사용한 요법에 대한 대상을 선택하는 방법이 제공된다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 대상이 변형을 갖는 경우에 CYP17A 억제제를 사용한 요법에 대한 후보자가 아닌 것으로서 대상을 특징짓는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 돌연변이 AR의 억제를 위해 본 명세서에 제공된 제3 세대 AR 길항제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 대상은 암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 전립선암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 거세 저항성 전립선암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, CYP17A 억제제는 갈레테론 (TOK001), TAK-700 또는 아비라테론 아세테이트이다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 핵산 샘플을 대상으로부터 얻는 단계를 추가로 포함한다.

[0141] 일부 실시 형태에서, (a) AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는, 대상으로부터의 샘플을 분석하여, 암호화된 AR 폴리펩티드가 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 876에 대응하는 아미노산 위치에서 변형되는지를 결정하는 단계; 및 (b) 대상이 변형을 갖는 경우에 제3 세대 AR 길항제를 사용한 요법에 대한 후보자로서 대상을 특징짓는 단계를 포함하는, 제3 세대 AR 길항제를 사용한 요법에 대한 대상을 선택하는 방법이 제공된다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 돌연변이 AR의 억제를 위해 본 명세서에 제공된 제3 세대 AR 길항제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 대상은 암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 전립선암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 거세 저항성 전립선암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 핵산 샘플을 대상으로부터 얻는 단계를 추가로 포함한다.

[0142] 일부 실시 형태에서, (a) AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는, 대상으로부터의 샘플을 분석하여, 암호화된 AR 폴리펩티드가 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 876에 대응하는 아미노산 위치에서 변형되는지를 결정하는 단계; 및 (b) 대상이 변형을 갖는 경우에 제2 세대 AR 길항제를 사용한 요법에 대하여 내성을 갖거나 내성을 가질 가능성이 있는 것으로 대상을 특징짓는 단계를 포함하는, 대상이 제2 세대 AR 길항제를 사용한 요법에 대하여 내성을 갖거나 내성을 가질 가능성이 있는지를 결정하는 방법이 제공된다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 돌연변이 AR의 억제를 위해 본 명세서에 제공된 제3 세대 AR 억제제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 대상은 암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 전립선암을

앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 거세 저항성 전립선암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 핵산 샘플을 대상으로부터 얻는 단계를 추가로 포함한다.

[0143] 일부 실시 형태에서, (a) AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는, 대상으로부터의 샘플을 분석하여, 암호화된 AR 폴리펩티드가 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 876에 대응하는 아미노산 위치에서 변형되는지를 결정하는 단계; 및 (b) 대상이 변형을 갖는 경우에 제1 세대 AR 길항제를 사용한 요법에 대하여 내성을 갖거나 내성을 가질 가능성이 있는 것으로 대상을 특징짓는 단계를 포함하는, 대상이 제1 세대 AR 길항제를 사용한 요법에 대하여 내성을 갖거나 내성을 가질 가능성이 있는지를 결정하는 방법이 제공된다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 돌연변이 AR의 억제를 위해 본 명세서에 제공된 제3 세대 AR 억제제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 대상은 암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 전립선암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 거세 저항성 전립선암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 핵산 샘플을 대상으로부터 얻는 단계를 추가로 포함한다.

[0144] 일부 실시 형태에서, (a) AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는, 대상으로부터의 샘플을 분석하여, 암호화된 AR 폴리펩티드가 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 876에 대응하는 아미노산 위치에서 변형되는지를 결정하는 단계; 및 (b) 대상이 변형을 갖는 경우에 CYP17A 억제제인 AR 길항제를 사용한 요법에 대하여 내성을 갖거나 내성을 가질 가능성이 있는 것으로 대상을 특징짓는 단계를 포함하는, 대상이 CYP17A 억제제인 AR 길항제를 사용한 요법에 대하여 내성을 갖거나 내성을 가질 가능성이 있는지를 결정하는 방법이 제공된다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 돌연변이 AR의 억제를 위해 본 명세서에 제공된 제3 세대 AR 억제제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 대상은 암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 전립선암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 거세 저항성 전립선암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, CYP17A 억제제는 갈레테론 (TOK001), TAK-700 또는 아비라테론 아세테이트이다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 핵산 샘플을 대상으로부터 얻는 단계를 추가로 포함한다.

[0145] 일부 실시 형태에서, (a) AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는, 대상으로부터의 샘플을 분석하여, 암호화된 AR 폴리펩티드가 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 876에 대응하는 아미노산 위치에서 변형되는지를 결정하는 단계; 및 (b) 대상이 변형을 갖는 경우에 제2 세대 AR 길항제를 사용한 요법에 대하여 내성을 갖거나 내성을 갖게 될 것으로 대상을 특징짓는 단계를 포함하는, 암 치료를 위해 제2 세대 AR 길항제가 투여된 대상이 요법에 대하여 내성을 발현하거나 발현할 것인지를 모니터링하는 방법이 제공된다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 돌연변이 AR의 억제를 위해 본 명세서에 제공된 제3 세대 AR 길항제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 대상은 암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 전립선암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 거세 저항성 전립선암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 핵산 샘플을 대상으로부터 얻는 단계를 추가로 포함한다.

[0146] 일부 실시 형태에서, (a) AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는, 대상으로부터의 샘플을 분석하여, 암호화된 AR 폴리펩티드가 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 876에 대응하는 아미노산 위치에서 변형되는지를 결정하는 단계; 및 (b) 대상이 변형을 갖는 경우에 제1 세대 AR 길항제를 사용한 요법에 대하여 내성을 갖거나 내성을 갖게 될 것으로 대상을 특징짓는 단계를 포함하는, 암 치료를 위해 제1 세대 AR 길항제가 투여된 대상이 요법에 대하여 내성을 발현하거나 발현할 것인지를 모니터링하는 방법이 제공된다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 돌연변이 AR의 억제를 위해 본 명세서에 제공된 제3 세대 AR 길항제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 대상은 암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 전립선암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 거세 저항성 전립선암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 핵산 샘플을 대상으로부터 얻는 단계를 추가로 포함한다.

[0147] 일부 실시 형태에서, (a) AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는, 대상으로부터의 샘플을 분석하여, 암호화된 AR 폴리펩티드가 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 876에 대응하는 아미노산 위치에서 변형되는지를 결정하는 단계; 및 (b) 대상이 변형을 갖는 경우에 CYP17A 억제제인 AR 길항제를 사용한 요법에 대하여 내성을 갖거나 내성을 갖게 될 것으로 대상을 특징짓는 단계를 포함하는, 암 치료를 위해 CYP17A 억제제인 AR 길항제가 투여된 대상이 요법에 대하여 내성을 발현하거나 발현할 것인지를 모니터링하는 방법이 제공된다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 돌연변이 AR의 억제를 위해 본 명세서에 제공된 제3 세대 AR 길항제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 대상은 암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 전립선암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 거세 저항성 전립선암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, CYP17A 억제제는 갈레테론 (TOK001), TAK-700 또는 아비라테론 아세테이트이다. 일부 실시 형태에서, 상

기 방법은 핵산 샘플을 대상으로부터 얻는 단계를 추가로 포함한다.

[0148] 일부 실시 형태에서, (a) AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는, 대상으로부터의 샘플을 분석하여, 암호화된 AR 폴리펩티드가 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 876에 대응하는 아미노산 위치에서 변형되는지를 결정하는 단계; 및 (b) 대상이 변형을 갖는 경우에 제2 세대 AR 길항제를 사용한 치료를 중지하거나, 대상이 변형을 갖지 않는 경우에 제2 세대 AR 길항제를 사용한 치료를 계속하는 단계를 포함하는, 암 치료를 위해 제2 세대 AR 길항제가 투여되는 대상의 요법을 최적화하는 방법이 제공된다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 핵산 샘플을 대상으로부터 얻는 단계를 추가로 포함한다.

[0149] 일부 실시 형태에서, (a) AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는, 대상으로부터의 샘플을 분석하여, 암호화된 AR 폴리펩티드가 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 876에 대응하는 아미노산 위치에서 변형되는지를 결정하는 단계; 및 (b) 대상이 변형을 갖는 경우에 제1 세대 AR 길항제를 사용한 치료를 중지하거나, 대상이 변형을 갖지 않는 경우에 제1 세대 AR 길항제를 사용한 치료를 계속하는 단계를 포함하는, 암 치료를 위해 제1 세대 AR 길항제가 투여되는 대상의 요법을 최적화하는 방법이 제공된다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 핵산 샘플을 대상으로부터 얻는 단계를 추가로 포함한다.

[0150] 일부 실시 형태에서, (a) AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는, 대상으로부터의 샘플을 분석하여, 암호화된 AR 폴리펩티드가 서열 번호 1에 기재된 아미노산 서열의 아미노산 위치 876에 대응하는 아미노산 위치에서 변형되는지를 결정하는 단계; 및 (b) 대상이 변형을 갖는 경우에 CYP17A 억제제인 AR 길항제를 사용한 치료를 중지하거나, 대상이 변형을 갖지 않는 경우에 CYP17A 억제제인 AR 길항제를 사용한 치료를 계속하는 단계를 포함하는, 암 치료를 위해 CYP17A 억제제인 AR 길항제가 투여되는 대상의 요법을 최적화하는 방법이 제공된다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 핵산 샘플을 대상으로부터 얻는 단계를 추가로 포함한다.

[0151] 일부 실시 형태에서, 변형된 AR은 제2 세대 AR 길항제, 예를 들어 ARN-509, 엔잘루타마이드 (MDV3100) 또는 RD162에 의한 완전 길항작용에 대하여 내성을 나타낸다. 일부 실시 형태에서, 제2 세대 AR 길항제, 예를 들어 ARN-509, 엔잘루타마이드 (MDV3100) 또는 RD162는 변형된 AR에 대한 작용제 활성을 나타낸다. 일부 실시 형태에서, 변형된 AR은 제1 세대 AR 길항제에 의한 완전 길항작용에 대하여 내성을 나타낸다. 일부 실시 형태에서, 변형된 AR은 CYP17A인 AR 길항제에 의한 완전 길항작용에 대하여 내성을 나타낸다.

[0152] 일부 실시 형태에서, 대상은 AR 의존성 또는 AR 매개성 질환 또는 상태를 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, AR 의존성 또는 AR 매개성 질환 또는 상태는 양성 전립선 비대증, 다모증, 여드름, 전립선의 아데노마 및 종양, AR 함유 양성 또는 악성 종양 세포, 하이퍼필로서티(hyperpilosity), 지루증, 자궁내막증, 다낭성 난소 증후군, 안드로겐성 탈모증, 성선기능저하증, 골다공증, 정자 형성 억제, 리비도, 악액질, 식욕 부진, 연령과 관련된 테스토스테론 레벨 저하를 위한 안드로겐 보충, 전립선암, 유방암, 방광암, 간암, 자궁내막암, 자궁암, 안면 홍조, 케네디병(Kennedy's disease), 근위축 및 근력 저하, 피부 위축, 뼈 손실, 빈혈, 동맥경화증, 심혈관 질환, 에너지 손실, 웰빙 손실(loss of well-being), 제2형 당뇨병 또는 복부지방 축적이다.

[0153] 일부 실시 형태에서, 대상은 암을 앓고 있다. 일부 실시 형태에서, 대상은 고령 종양에 걸려 있다. 일부 실시 형태에서, 암은 전립선암, 유방암, 간암, 또는 방광암이다. 일부 실시 형태에서, 암은 전립선암이다.

[0154] 일부 실시 형태에서, 샘플은 조직 유래의 것 또는 유기체 유래의 체액이다. 샘플은 전혈, 해리(dissociated)골수, 골수천자액, 흉수, 복막액(peritoneal fluid), 중추 척수액(central spinal fluid), 복강액(abdominal fluid), 혀액(pancreatic fluid), 뇌척수액, 뇌액, 복수(ascites), 심막액, 소변, 타액, 기관지 세정액, 땀, 눈물, 귀물(ear flow), 가래, 음낭수종액, 정액, 질분비물, 젖, 양수, 및 기도, 장관 또는 요생식로의 분비물을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 특정한 실시 형태에서, 샘플은 종양 생검 샘플이다. 특정한 실시 형태에서, 샘플은 림프계 또는 순환계의 일부이거나 이와 관련된 체액 또는 조직으로부터 유래된다. 일부 실시 형태에서, 샘플은 정액 혈액, 동맥 혈액, 말초 혈액, 조직 혈액, 제대혈 샘플인 혈액 샘플이다. 특정한 실시 형태에서, 샘플은 혈청 샘플이다. 일부 실시 형태에서, 샘플은 하나 이상의 순환 종양 세포 (CTC)를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 샘플은 하나 이상의 과종성 종양 세포 (예를 들어, 골수천자액 샘플의 DTC)를 포함한다.

[0155] 조직 및 체액 샘플에 포함되는 세포로부터의 핵산 및 단백질의 단리 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 특정한 실시 형태에서, 대상으로부터 얻어진 핵산 샘플은 대상으로부터의 종양 생검에 포함되는 세포로부터 단리된다. 특정한 실시 형태에서, 대상으로부터 얻어진 핵산 샘플은 골수천자액의 세포로부터 단리된다. 특정한 실시 형태에서, 대상으로부터 얻어진 핵산 샘플은 혈청 샘플에 함유된 세포로부터 단리된다. 특정한 실시 형태에서,

대상으로부터 얻어진 핵산 샘플은 램프액 샘플에 함유된 세포로부터 단리된다.

[0156] 일부 실시 형태에서, 샘플은 잘 알려진 루틴한 임상 방법을 이용하여 샘플을 얻는 적절한 수단에 의해 대상으로부터 얻어진다. 대상으로부터 체액 샘플을 얻는 절차는 잘 알려져 있다. 예를 들어, 전혈 및 램프액을 채취하여 처리하는 절차는 잘 알려져 있으며, 제공된 방법에 사용하기 위한 샘플을 얻기 위해 사용될 수 있다. 전형적으로, 혈액 샘플 채집을 위해, 항응고제 (예를 들어, EDTA, 또는 시트레이트 및 헤파린 또는 CPD (시트레이트, 포스페이트, 텍스트로스) 또는 동등한 물질)가 혈액 응고를 방지하기 위해 샘플에 첨가된다. 몇 가지 예에서, 혈액 샘플은 혈액 샘플의 응고를 방지하기 위해 소정량의 EDTA를 포함하는 채혈관에 채취된다.

[0157] 일부 실시 형태에서, 샘플은 조직 생검이며, 예를 들어 침생검, CT 유도하(CT-guided) 침생검, 흡인 생검, 내시경 생검, 기관지경 생검, 기관지 세정액, 절개 생검, 절제 생검, 편치 생검, 면도 생검, 피부 생검, 골수 생검, 및 고리전기절제술 (Loop Electrosurgical Excision Procedure; LEEP)에 의해 얻어진다. 전형적으로, 100 mg 보다 크지만, 예를 들어 100 mg 미만, 50 mg 이하, 10 mg 이하 또는 5 mg 이하와 같이 더 작을 수 있거나; 예를 들어 100 mg 초과, 200 mg 이상, 또는 500 mg 이상, 1 gm 이상, 2 gm 이상, 3 gm 이상, 4 gm 이상 또는 5 gm 이상과 같이 더 클 수 있는 비괴사성 멸균 생검 또는 표본이 얻어진다. 분석을 위해 추출된 샘플 사이즈는 수행되는 분석의 수, 조직 샘플의 건강 상태, 암의 종류, 및 환자의 상태를 포함하나 이에 한정되지 않는 다수의 인자에 따라 다르다. 일부 실시 형태에서, 조직은 멸균 용기, 예컨대 멸균관 또는 배양 플레이트에 배치되며, 임의로 적절한 배지에 침지된다. 전형적으로, 세포는 당업계에 잘 알려진 바와 같이, 기계적 수단 및/또는 효소 처리에 의해 세포 혼탁액으로 해리된다. 전형적으로, 세포가 수집된 다음에, 분석용 핵산의 단리를 위한 표준 절차가 행해진다.

[0158] 일부 실시 형태에서, 샘플은 예를 들어, 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 1주, 2주, 3주, 4주, 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 1년, 매일, 매주, 격월, 분기별, 1년에 2회 또는 매년과 같은 일정한 간격으로 대상으로부터 얻어진다. 일부 실시 형태에서, 샘플 채취는 하나 이상의 항암제를 사용한 치료와 관련하여, 소정 시간 또는 일정한 간격으로 행해진다. 일부 실시 형태에서, 샘플 채취는 AR 길항제, 예를 들어 제1 세대 또는 제2 세대 AR 길항제를 사용한 치료와 관련하여, 소정 시간 또는 일정한 간격으로 행해진다. 예를 들어, 샘플은 치료 전에, 치료 동안에, 또는 치료 후에 또는 연속적 치료 사이에 소정 시간 또는 일정한 간격으로 행해진다. 특정 예에서, 샘플은 항암요법제의 투여 전에 대상으로부터 얻어진 다음에, 치료가 행해진 후에 다시 일정한 간격으로 얻어진다. 특정 예에서, 샘플은 AR 길항제, 예를 들어 제1 세대 또는 제2 세대 AR 길항제, 요법제의 투여 전에 대상으로부터 얻어진 다음에, 치료가 행해진 후에 다시 일정한 간격으로 얻어진다. 일부 실시 형태에서, AR 길항제는 비칼루타마이드, 플루타마이드, 하이드록시플루타마이드, 널루타마이드, ARN-509, 엔잘루타마이드 (MDV3100), 및 RD162 중에서 선택된다. 일부 실시 형태에서, AR 길항제는 CYP17A 억제제이다. 일부 실시 형태에서, CYP17A 억제제는 갈레테론 (TOK001), TAK-700 또는 아비라테론 아세테이트 중에서 선택된다.

[0159] 체액 샘플량은 제공된 방법에서 AR 돌연변이의 검출에 적합한 양일 수 있다. 몇 가지 예에서, 체액 샘플량은 사용된 특정 분석법에 따라 다르다. 예를 들어, 특정 분석법은 예를 들어, 사용된 장치 또는 방법의 능력 및 분석법의 처리량 레벨이나 이에 한정되지 않는 인자에 따라 소량 또는 다량의 체액 샘플량을 필요로 할 수 있다. 몇 가지 예에서, 체액 샘플은 분석법의 적용 전에 적절한 배지에 희석된다. 몇 가지 예에서, 체액 샘플은 대상으로부터 얻어지며, 샘플의 일부 또는 분취량이 분석법에 사용된다. 일부 또는 분취량은 분석법의 적용 전에 적절한 배지에 희석될 수 있다.

[0160] 일부 실시 형태에서, 샘플은 포유류인 대상으로부터 얻어진다. 예시적인 포유류 대상은 영장류, 예컨대 인간, 꼬리 없는 원숭이 및 긴 꼬리를 가진 원숭이; 설치류, 예컨대 마우스, 래트, 래빗 및 페럿; 반추동물, 예컨대 염소, 암소, 사슴, 및 면양; 말, 피그, 개, 고양이 및 기타 동물을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 일부 실시 형태에서, 샘플은 환자로부터 얻어진다. 몇 가지 예에서, 환자는 인간 환자이다.

[0161] 일부 실시 형태에서, 대상으로부터 얻어진 핵산 샘플은 게놈 핵산 샘플이다. 일부 실시 형태에서, 대상으로부터 얻어진 핵산 샘플은 RNA 샘플이다. 일부 실시 형태에서, mRNA는 RNA 샘플 중의 총 RNA로부터 단리된다. 일부 실시 형태에서, RNA 샘플은 cDNA로 역전사된다. 일부 실시 형태에서, 게놈 핵산 샘플은 핵산 증폭법에 의해 증폭된다. 일부 실시 형태에서, 핵산 증폭법은 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)이다. 일부 실시 형태에서, 게놈 핵산 샘플은 AR 유전자에 특이적인 뉴클레오티드 프라이머 세트를 사용하여 증폭된다. 일부 실시 형태에서, 뉴클레오티드 프라이머 세트는 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876을 암호화하는 핵산 서열에 인접한다. 일부 실시 형태에서, 증폭 산물은 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876을 암호화하는 핵산이다. 일부 실시 형태에서, 서열 특이적 프라이머는 검출가능한 문자, 예컨대 제2 검출가능한 문자에 결합하는 형광 표지, 생물 발광 표지,

화학 발광 표지, 방사성 표지, 효소 표지, 검출가능한 기질, 또는 펩티드 또는 분자에 컨쥬게이트된다.

[0162] 일부 실시 형태에서, 분석은 핵산 샘플을 염기서열결정(sequencing)하는 것을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 핵산 샘플의 AR을 암호화하는 핵산이 먼저, 서열 특이적 프라이머를 사용하여 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)과 같은 방법에 의해 증폭된 다음에, 증폭된 PCR 단편이 염기서열결정된다. 본 명세서에 제공된 방법에 사용하는 예시적인 염기서열결정법은 당업계에 잘 알려져 있으며, 다이데옥시 또는 사슬 종결법, 맥삼-길버트 (Maxam-Gilbert) 시퀀싱, 대규모 병렬 시그너처 시퀀싱(massively parallel signature sequencing (또는 MPSS)), 폴로니 시퀀싱, 파이로시퀀싱(pyrosequencing), 일루미나 다이 시퀀싱 (Illumina dye sequencing), SOLiD (또는 라이게이션에 의한 염기서열결정) 시퀀싱, 이온 반도체 시퀀싱, DNA 나노볼 (nanoball) 시퀀싱, 헬리스코프 (heliscope) 시퀀싱, 및 단분자 실시간 (SMRT) 시퀀싱을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0163] 일부 실시 형태에서, 샘플은 순환 종양 DNA (ctDNA), RNA (ctRNA) 또는 마이크로RNA를 포함하는 혈장 또는 혈청 샘플이다 (예를 들어, 문헌[Chan et al. (2007) *Br J Cancer.* 96(5):681-5] 참조). 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR을 암호화하는 DNA는 BEAMing (비드, 증폭, 예멀젼, 자기) PCR 염기서열결정법(예를 들어, 문헌[Li et al. (2006) *Nat Methods.* 3(2):95-7]; 문헌[Li et al. (2006) *Nat Methods.* 3(7):551-9]; 및 문헌[Diehl et al. (2008) *Nat Med.* 14(9): 985-990] 참조)에 의해 평가된다. BEAMing은 개체 DNA 문자가 유중수형 예멀젼 중의 자기 비드에 부착된 다음에, 구획화된(compartmentalized) PCR 증폭이 행해지는 기술이다. 그 다음에 비드에 결합된 DNA의 돌연변이 상태를 돌연변이 또는 야생형 AR의 형광 대립유전자 특이적 프로브에 대한 혼성화에 의해 측정한다. 그 후에 유속 세포 분석법을 이용하여, 혈장 또는 혈청에 존재하는 돌연변이 DNA 레벨을 정량화한다 (예를 들어, 문헌[Higgins et al. (2012) *Clin Cancer Res* 18: 3462-3469] 참조).

[0164] 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR을 암호화하는 DNA의 존재를 검출하는 샘플의 분석은 야생형 AR이 아닌 돌연변이 AR을 암호화하는 핵산에 특이적인 서열 특이적 올리고뉴클레오티드 프로브를 이용한 돌연변이의 검출을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 분석은 (a) 샘플을 돌연변이 AR 핵산 서열 특이적 올리고뉴클레오티드 프로브와 접촉시켜, 돌연변이 핵산 서열이 샘플에 존재하는 경우, 프로브-DNA 복합체를 형성하는 단계, 및 (b) 프로브-DNA 복합체를 검출하는 단계를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 올리고뉴클레오티드 프로브는 AR 폴리펩티드의 아미노산 876에 대응하는 위치에서의 류신을 암호화하는 핵산에 특이적이다. 일부 실시 형태에서, 서열 특이적 프로브는 검출가능한 문자, 예컨대 제2 검출가능한 문자에 결합하는 형광 표지, 생물 발광 표지, 화학 발광 표지, 방사성 표지, 효소 표지, 검출가능한 기질, 또는 펩티드 또는 분자에 컨쥬게이트된다.

[0165] 일부 실시 형태에서, 단일 뉴클레오티드의 변화는 돌연변이 서열에 제한 부위를 형성시키는, PCR에 기초한 단편 증폭 다양성 서열 (PCR-based cleaved amplified polymorphic sequence; CAPS) 마커 (문헌[Michaels et al (1998) *Plant J.* 14(3):381-5]) 또는 예를 들어, 플루오로포어(fluorophore)이나, 이에 한정되지 않는 검출 가능한 부분(moiety)에 부착되는 서열 특이적 헤어핀(hairpin) 프로브 (문헌[Mhlanga and Malmberg (2001) *Methods* 25:463-471])를 사용하여 PCR에 의해 검출가능하다. 일부 실시 형태에서, 서열 특이적 프로브는 검출 가능한 문자, 예컨대 제2 검출가능한 문자에 결합하는 형광 표지, 생물 발광 표지, 화학 발광 표지, 방사성 표지, 효소 표지, 검출가능한 기질, 또는 펩티드 또는 분자에 컨쥬게이트된다. 일부 실시 형태에서, 올리고뉴클레오티드 프로브는 AR 폴리펩티드의 아미노산 876에 대응하는 위치에서의 류신을 암호화하는 핵산에 특이적이다.

[0166] 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR을 암호화하는 DNA의 존재를 검출하는 샘플의 분석은 올리고뉴클레오티드 어레이를 이용하여 행해진다 (예를 들어, 문헌[Hastie et al. (1999) *J Med Genet.* 36(10):730-6] 참조). 일부 실시 형태에서, 핵산을 포함하는, 대상으로부터의 샘플은 직접 칩에 혼성화된다. 일부 실시 형태에서, 핵산을 포함하는, 대상으로부터의 샘플은 예를 들어, 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR)이나, 이에 한정되지 않는 증폭법을 이용하여 증폭되며, 증폭된 핵산은 칩에 혼성화된다. 일부 실시 형태에서, 올리고뉴클레오티드 어레이는 마이크로칩 상에 포함된다. 일부 실시 형태에서, 단일 뉴클레오티드의 변화는 마이크로칩을 이용하여 검출가능하다.

[0167] 일부 실시 형태에서, 샘플의 분석은 돌연변이 AR 폴리펩티드에 특이적인 항체를 이용한 돌연변이의 검출을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드의 검출 방법은 대상으로부터의, AR 폴리펩티드를 포함하는 샘플을 얻는 단계 및 돌연변이 AR 폴리펩티드와의 결합에 특이적이며, 야생형 AR 폴리펩티드에 결합하지 않거나 낮은 친화성으로 결합하는 항체와 샘플을 접촉시켜 돌연변이 AR 폴리펩티드의 존재에 대하여 샘플을 시험하는 단계를 포함하며, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 항체-돌연변이 AR 폴리펩티드 복합체를 생성한다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 항체-돌연변이 AR 폴리펩티드 복합체를 검출하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시 형태

에서, 상기 방법은 검출 시약을 사용하여 항체-돌연변이 AR 폴리펩티드 복합체를 검출하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 특이 항체는 검출가능한 문자, 예컨대 제2 검출가능한 단백질 (예를 들어, 이차 항체)에 결합하는 형광 표지, 생물 발광 표지, 화학 발광 표지, 방사성 표지, 효소 표지, 검출가능한 기질, 또는 펩티드 또는 문자에 컨쥬게이트된다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 특이 항체의 결합은 검출가능한 문자를 분석함으로써 검출된다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 특이 항체의 결합은 이차 (예를 들어, 항 IgG) 항체를 사용하여 검출된다. 일부 실시 형태에서, 샘플은 종양 생검 샘플, 골수천자액, 혈액 샘플, 혈청 샘플, 또는 럼프액 샘플이다.

[0168] 돌연변이 안드로겐 수용체와 상호작용하는 분자의 동정

돌연변이 수용체를 억제하는 화합물 (즉, 제3 세대 AR 억제제 화합물)을 스크리닝하기 위해 돌연변이 AR 폴리펩티드를 사용하는 방법이 본 명세서에 제공된다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 암 치료용 제3 세대 AR 억제제 화합물의 동정에 사용된다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 제2 세대 AR 길항제, 예를 들어 ARN-509, 엔잘루타마이드 (MDV3100) 또는 RD162를 사용한 치료에 대하여 내성을 나타내는 전립선암과 같은 내성 암 치료용 제3 세대 AR 억제제 화합물의 동정에 사용된다.

일부 실시 형태에서, 제3 세대 AR 억제제 화합물을 동정하는 방법은 (a) 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드를 세포에서 발현하는 단계, (b) 세포를 시험 화합물과 접촉시키는 단계, 및 (c) 세포의 AR 활성 레벨을 검출하는 단계를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 세포는 세포를 시험 화합물과 접촉시키기 전에 또는 이와 동시에 AR 작용제와 접촉된다. 일부 실시 형태에서, 세포는 세포를 시험 화합물과 접촉시키기 전에 약 1시간, 2시간, 3시간, 4시간, 5시간, 6시간, 8시간, 10시간, 12시간, 14시간, 16시간, 18시간, 20시간, 22시간, 24시간 또는 그 이상 전에 AR 작용제와 접촉된다. 일부 실시 형태에서, 세포는 세포가 시험 화합물과 접촉됨과 동시에 AR 작용제와 접촉된다. 일부 실시 형태에서, AR 작용제는 메틸트라이에놀론 (R1881), DHT, 미볼레론 (Mb) 및 테스토스테론 중에서 선택된다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 서열 번호 1에 기재된 암생형 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에 대응하는 위치에서의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에 페닐알라닌을 포함하지 않는다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에서의 류신을 포함한다.

일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산으로 트랜스펙션될 수 있으며, AR 활성이 모니터링될 수 있는 세포주가 사용된다. 일부 실시 형태에서, 세포는 암생형 AR을 발현하지 않는다. 일부 실시 형태에서, 세포는 낮은 레벨의 암생형 AR을 발현한다. 일부 실시 형태에서, 세포는 내인성 돌연변이 AR 폴리펩티드를 발현한다. 일부 실시 형태에서, 내인성 돌연변이 AR 폴리펩티드는 암생형 AR 폴리펩티드의 아미노산 877에 대응하는 아미노산에서의 변형을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 내인성 돌연변이 AR 폴리펩티드는 아미노산 위치 877에서의 알라닌으로의 트레오닌의 치환인 변형 (T877A)을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 암생형 AR 폴리펩티드의 아미노산 874에 대응하는 아미노산에서의 변형을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 아미노산 위치 874에서의 타이로신으로의 히스티딘의 치환인 변형 (H874Y)을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 세포는 HeLa, CV1, COS7, HepG2, HEK-293, DU145, PC3, 및 TSY-PR1 중에서 선택된다. 일부 실시 형태에서, 세포주는 전립선암 세포주이다. 일부 실시 형태에서, 세포주는 CWR, LNCaP, VCaP 및 LAPC4 중에서 선택된다.

일부 실시 형태에서, 세포는 돌연변이 AR 폴리펩티드를 안정하게 발현한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR을 암호화하는 핵산은 세포 계놈에 통합된다.

일부 실시 형태에서, AR 활성 레벨은 AR 반응성 프로모터에 작동가능하게 연결된 리포터 유전자를 사용하여 검출된다. 일부 실시 형태에서, AR 반응성 프로모터는 돌연변이 AR 폴리펩티드가 결합하는 하나 이상의 안드로겐 반응 요소 (ARE)를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 프로모터는 프로바신 (Pb), 전립선 특이 항원 (PSA), 마우스 유방 종양 바이러스의 긴 말단 반복서열 (MMTV LTR), 지방산 합성효소 (FASN), STEAP4 (six transmembrane epithelial antigen of the prostate 4), 막관통 단백질 분해효소 (transmembrane protease), 세린 2 (TMPRSS2), 알파-1-산성 당단백질 1 (ORM1), 또는 인간 호메오박스 유전자 NKX3.1 프로모터 중에서 선택된다. 일부 실시 형태에서, 프로모터는 하나 이상의 ARE를 포함하는 합성 프로모터이다.

일부 실시 형태에서, AR 반응성 프로모터는 검출가능한 단백질을 암호화하는 적절한 리포터 유전자에 작동가능하게 연결된다. 예시적인 검출가능한 단백질은 루시페라제, 형광 단백질, 생물 발광 단백질, β -갈락토시다아제, 알칼리성 포스파타아제, 및 클로람페니콜 아세틸트랜스페라아제를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 일부 실시 형태에서, 적절한 대조군과 비교하여, 시험 화합물에의 노출 후의 리포터 유전자의 발현 감소는 시험 화합

물이 돌연변이 AR 폴리펩티드의 억제에 대하여 효과적임을 나타낸다. 일부 실시 형태에서, 대조군은 세포가 시험 화합물에 노출되기 전의 리포터 유전자의 기본적 발현이다. 일부 실시 형태에서, 리포터 유전자의 발현은 시험 세포로부터 제조된 세포 추출물을 사용하여 분석된다.

[0175] 일부 실시 형태에서, AR 활성 레벨은 세포의 하나 이상의 내인성 안드로겐 반응성 유전자의 발현을 측정함으로써 검출된다. 일부 실시 형태에서, 안드로겐 반응성 유전자는 안드로겐 처리에 반응하여 상향조절(즉, 유도)된다. 일부 실시 형태에서, 안드로겐 반응성 유전자는 안드로겐 처리에 반응하여 하향조절(즉, 억제)된다. 예시적인 안드로겐 반응성 유전자는 전립선 특이 항원 (PSA), 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), 프로스타신, 달팽이 상동체 2 (SLUG), 막관통 단백질 분해효소, 세린 2 (TMPRSS2), STEAP4 (six transmembrane epithelial antigen of prostate family member 4), FK506 결합 단백질 5 (FKBP5), 오로소뮤코이드 1/알파-1-산성 당단백질 1 (ORM1), 용질 캐리어 패밀리 (solute carrier family) 35 (SLC35F2/NOV), 인슐린 유사 성장 인자 I (IGF-1) IGF 결합 단백질-3 및 -5, CCAAT-인핸서 결합 단백질-δ, PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10), FASN, NKX3.1, AMIGO2, BDNF, CAMK2N1, HPGD, NCAPD3, PLD1, IL-15, IL-18, 및 ERBB2/HER2를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0176] 일부 실시 형태에서, AR 활성 레벨은 안드로겐 또는 AR 작용제에의 노출에 의해 유도되는 하나 이상의 내인성 유전자의 발현을 측정함으로써 검출된다. 일부 실시 형태에서, 적절한 대조군과 비교하여, 시험 화합물에의 노출 후의 하나 이상의 안드로겐 유도성 유전자의 발현 감소는 시험 화합물이 돌연변이 AR 폴리펩티드의 억제에 대하여 효과적임을 나타낸다. 예시적인 안드로겐 유도성 유전자는 전립선 특이 항원 (PSA), 프로스타신, 달팽이 상동체 2 (SLUG), 막관통 단백질 분해효소, 세린 2 (TMPRSS2), STEAP4 (six transmembrane epithelial antigen of prostate family member 4), FK506 결합 단백질 5 (FKBP5), 및 오로소뮤코이드 1/알파-1-산성 당단백질 1 (ORM1)을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 일부 실시 형태에서, 유도성 유전자의 발현은 AR 작용제의 존재 하에 평가된다. 일부 실시 형태에서, 세포는 시험 화합물에 앞서 또는 이것과 동시에 안드로겐 작용제와 접촉된다.

[0177] 일부 실시 형태에서, AR 활성 레벨은 안드로겐 또는 AR 작용제에의 노출에 의해 억제되는 하나 이상의 내인성 유전자의 발현을 측정함으로써 검출된다. 일부 실시 형태에서, 적절한 대조군과 비교하여, 시험 화합물에의 노출 후의 하나 이상의 안드로겐 억제성 유전자의 발현 증가 또는 발현 억제 실패는 시험 화합물이 돌연변이 AR 폴리펩티드의 억제에 대하여 효과적임을 나타낸다. 일부 실시 형태에서, 대조군은 세포가 시험 화합물에 노출되기 전의 유전자의 기본적 발현이다. 예시적인 안드로겐 억제성 유전자는 전립선 특이적 막 항원 (PSMA), 용질 캐리어 패밀리 35 (SLC35F2/NOV), IGF 결합 단백질-3 및 -5, CCAAT-인핸서 결합 단백질-δ, PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10), IL-15, IL-18, 및 ERBB2/HER2를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 일부 실시 형태에서, 억제성 유전자의 발현은 AR 작용제의 존재 하에 평가된다. 일부 실시 형태에서, 세포는 시험 화합물에 앞서 또는 이것과 동시에 안드로겐 작용제와 접촉된다.

[0178] 내인성 유전자의 발현의 측정 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예시적인 유전자 발현의 측정 방법은 단백질 분석법, 예를 들어 면역조직화학, 면역블로팅 (예를 들어, 웨스턴 분석), 크로마토그래피, 및 핵산 분석법, 예를 들어 폴리미라제 연쇄 반응 (PCR), 정량적 PCR (qPCR), 실시간 PCR (RT-PCR), 노던(Northern) 분석을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0179] 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드의 활성을 예를 들어, AR 공활성화 인자 결합 분석 (예를 들어, 면역침강 분석, 투 하이브리드 분석, 퀘르스터 (형광) 공명 에너지 전이 분석, 예를 들어 랜타스크린 (LanthaScreen)TM TR-FRET 안드로겐 수용체 공활성화 인자 분석), AR 입체형태 프로파일링 (conformational profiling) 분석 (예를 들어, 문헌[Joseph et al. (2009) PNAS 106(29):12178-12183] 참조), AR DNA 결합 분석 (예를 들어, 문헌[Roche et al. (1992) Mol. Endocrinol. 6(12):2229-35] 참조), 크로마틴 면역침강, N/C 말단 상호작용 분석 (예를 들어, 문헌[Hsu et al. (2005) Mol. Endocrinology 19(2) 350-361] 및 문헌[Ghali et al. (2003) J Clin Endocrinol Metab. 88(5):2185-93] 참조)이나, 이에 한정되지 않는 분석을 이용하여 측정된다.

[0180] 일부 실시 형태에서, 제3 세대 AR 억제제 화합물의 동정 방법은 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드의 3차원 결정 또는 용액 구조를 사용한 컴퓨터 지원 모델링을 이용하여 잠재적 제3 세대 AR 억제제 화합물을 선택하는 단계를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 서열 번호 1에 기재된 야생형 AR 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에 대응하는 위치에서의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드는 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에 페닐알라닌을 포함하지 않는다. 일부 실시 형태에서, 돌연

변이 AR 폴리펩티드는 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에서의 류신을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 돌연변이 AR 폴리펩티드를 시험 화합물과 접촉시키는 단계 및 시험 화합물과 돌연변이 AR 폴리펩티드의 상호작용을 검출하는 단계를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 돌연변이 AR 폴리펩티드와 상호작용하는 시험 화합물은 후보 제3 세대 AR 억제제 화합물로서 동정된다.

[0181]

일부 실시 형태에서, 제공된 방법에 사용되는 시험 화합물은 화합물 라이브러리의 구성원이다. 일부 실시 형태에서, 시험 화합물 라이브러리는 화합물의 적절한 제조 방법에 의해 생성된다. "시험 화합물 라이브러리"는 다양한 시험 화합물을 포함하는 패널을 말한다. 유기 소분자의 분자 라이브러리의 예시적인 합성 방법이 기술되어 있다 (문헌[Carell et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2059]; 문헌[Carell et al. (1994) Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33:2061]). 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 시험 화합물은 생물 라이브러리; 공간적으로 어드레스 가능한 평행 고상 또는 용액상 라이브러리, 디컨볼루션(deconvolution)을 요하는 합성 라이브러리법, '1-비드 1-화합물(one-bead one-compound)' 라이브러리법, 및 친화성 크로마토그래피 선택을 이용한 합성 라이브러리법을 비롯한 당업계에 공지된 조합 라이브러리법의 다수의 방법 중 어느 하나를 이용하여 얻어진다. 생물 라이브러리법은 웹티드 라이브러리에 제한되지만, 다른 4개의 방법은 웹티드, 비웹티드 올리고머 또는 화합물의 소분자 라이브러리에 적용가능하다 (문헌[Lam, K. S. (1997) Anticancer Drug Des. 12:145]). 기타 예시적인 분자 라이브러리의 합성 방법은 당업계, 예를 들어 문헌[Erb et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11422]; 문헌[Horwell et al. (1996) Immunopharmacology 33:68-]; 및 문헌[Gallo et al. (1994); J. Med. Chem. 37:1233-]에서 발견된다. 일부 실시 형태에서, 화합물의 라이브러리는 용액으로 (예를 들어, 문헌[Houghten (1992) Biotechniques 13:412-421]), 또는 비드 (문헌[Lam (1991) Nature 354:82-84]), 칩 (문헌[Fodor (1993) Nature 364:555-556]), 세균 (문헌[Ladner U.S. Pat. No. 5,223,409]), 포자 (문헌[Ladner USP '409]), 플라스미드 (문헌[Cull et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:1865-1869]) 또는 파지 (문헌[Scott and Smith (1990) Science 249:386-390]); (문헌[Devlin (1990) Science 249:404-406]); (문헌[Cwirla et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. 87:6378-6382]); (문헌[Felici (1991) J. Mol. Biol. 222:301-310]) 상에 제시된다. 일부 실시 형태에서, 조합 폴리펩티드는 cDNA 라이브러리로부터 생성된다. 활성을 스크리닝할 수 있는 예시적인 화합물은 웹티드, 핵산, 탄수화물, 유기 소분자, 및 천연물 추출물 라이브러리를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0182]

스크리닝법에 의해 동정되는 AR 억제제

[0183]

본 명세서에 제공된 스크리닝법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제는 AR 조절제이다. 일부 실시 형태에서, 제3 세대 AR 억제제는 AR 폴리펩티드의 적어도 하나의 활성을 억제하거나 감소시킨다. 예시적인 AR 활성을 공활성화 인자 결합, DNA 결합, 리간드 결합, 또는 핵 전좌를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 일부 실시 형태에서, 제3 세대 AR 억제제는 억제제의 부재 하에서의 AR 폴리펩티드의 활성과 비교하여, 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 100%로 AR 폴리펩티드의 활성을 억제한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 AR 역작용제, AR 길항제, AR 분해제(degrader), AR 수송(trafficking) 조절제 및/또는 AR DNA 결합 억제제이다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 AR 역작용제이다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 AR 길항제이다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 AR 분해제이다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 AR 수송 조절제이다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 AR DNA 결합 억제제이다. 일부 실시 형태에서, AR 억제제는 야생형 AR 폴리펩티드의 적어도 하나의 활성을 억제한다. 일부 실시 형태에서, AR 억제제는 돌연변이 AR 폴리펩티드의 적어도 하나의 활성을 억제한다.

[0184]

일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 발작 역치에 대하여 최소한의 전경련(pro-convulsant) 작용 및/또는 최소한의 영향을 미친다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 GABA 의존성 클로라이드 채널의 최소 조절을 나타낸다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 GABA 의존성 클로라이드 채널에 대한 최소 결합을 나타낸다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 GABA 의존성 클로라이드 채널의 최소 길항작용을 나타낸다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 GABA 의존성 클로라이드 채널과의 최소 상호작용을 갖는 AR 조절제이다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 GABA_A 의존성 클로라이드 채널과의 최소 상호작용을 갖는 AR 조절제이다.

이다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 GABA_A 의존성 클로라이드 채널과의 최소 상호작용 및/또는 최소 혈액 뇌 관문 투과를 갖는 AR 조절제이다. GABA 분석은 공지되어 있으며, 본 명세서에 참조로 포함되는 문헌[Ashok K. Mehta and Maharaj K. Ticku "Characterization of the Picrotoxin Site of GABA_A Receptors" *Current Protocols in Pharmacology* (2000) 1.18.1-1.18.17; Copyright© 2000 by John Wiley & Sons, Inc.]에 기재된 것들을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0185] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 AR 핵 전좌를 억제한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 안드로겐 반응 요소에 대한 AR DNA 결합을 억제한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 AR 반응성 프로모터에서의 공활성화 인자 동원을 억제한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 AR 과발현 전립선암 세포에서 작용제 활성을 나타내지 않는다.

[0186] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 거세 민감성 및 거세 저항성 전립선암 이종 이식 모델의 성장을 억제한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 야생형 AR을 발현하는 거세 민감성 및 거세 저항성 전립선암 이종 이식 모델의 성장을 억제한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 F876L 돌연변이를 갖는 돌연변이 AR을 발현하는 거세 민감성 및 거세 저항성 전립선암 이종 이식 모델의 성장을 억제한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 T877A 돌연변이 (예를 들어, LNCaP 세포로부터 생성된 이종 이식 종양)를 갖는 돌연변이 AR을 발현하는 거세 민감성 및 거세 저항성 전립선암 이종 이식 모델의 성장을 억제한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 야생형 AR 및 T877A 돌연변이 (예를 들어, LNCaP/AR 세포로부터 생성된 이종 이식 종양)를 갖는 돌연변이 AR을 발현하는 거세 민감성 및 거세 저항성 전립선암 이종 이식 모델의 성장을 억제한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 T877A 돌연변이를 갖는 돌연변이 AR 및 F876L 돌연변이를 갖는 돌연변이 AR을 발현하는 거세 민감성 및 거세 저항성 전립선암 이종 이식 모델의 성장을 억제한다.

약제학적 조성물

[0188] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 스크리닝법을 이용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제의 치료적 유효량을 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 일부 실시 형태에서, 의약의 제조를 위한, 본 명세서에 제공된 스크리닝법을 이용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제의 용도가 제공된다.

[0189] 일부 실시 형태에서, 제3 세대 AR 억제제를 포함하는 약제학적 조성물은 또한 적어도 하나의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 성분을 함유한다. 일부 실시 형태에서, 제3 세대 AR 억제제를 포함하는 약제학적 조성물은 정맥 주사, 피하 주사, 경구 투여, 또는 국소 투여용으로 제형화된다. 일부 실시 형태에서, 제3 세대 AR 억제제를 포함하는 약제학적 조성물은 정제, 환약, 캡슐, 액체, 혼탁액, 젤, 콜로이드, 분산액, 혼탁액, 용액, 에멀젼, 연고, 또는 로션이다.

[0190] 약제학적 조성물은 약제학적으로 사용될 수 있는 제제로의 활성 화합물의 가공을 촉진하는 하나 이상의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 성분을 사용하여 통상적인 방법으로 제형화된다. 적절한 제형화는 선택된 투여 경로에 의존한다. 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물의 개요가 예를 들어, 개시 내용이 본 명세서에 참조로 포함되는 문헌[Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Nineteenth Ed (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995)]; 문헌[Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975]; 문헌[Liberman, H.A. and Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, New York, N.Y., 1980]; 및 문헌[Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems, Seventh Ed.(Lippincott Williams & Wilkins 1999)]에서 발견될 수 있다.

[0191] 제3 세대 AR 억제제 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염, 및 적어도 하나의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 성분을 포함하는 약제학적 조성물이 본 명세서에 제공된다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 기재된 제3 세대 AR 억제제는 제3 세대 AR 억제제가 병용 요법에서와 같이, 다른 활성 성분과 혼합되는 약제학적 조성물로서 투

여된다. 다른 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 다른 약물 또는 약제, 담체, 보조제, 보존제, 안정제, 습윤제 또는 에멀젼화제, 용액 프로모터, 삼투압 조절용 염, 및/또는 완충제를 포함한다. 또 다른 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 다른 치료적으로 유용한 물질을 포함한다.

[0192] 본 명세서에 사용되는 약제학적 조성물은 제3 세대 AR 억제제 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염과, 다른 화학 성분 (즉, 약제학적으로 허용가능한 불활성 성분), 예컨대 담체, 부형제, 결합제, 충전제, 혼탁화제, 향미제, 감미제, 봉해제, 분산제, 계면활성제, 윤활제, 착색제, 희석제, 가용화제, 습윤제, 가소제, 안정제, 침투촉진제, 습윤제, 소포제, 산화방지제, 보존제, 또는 이들 중 하나 이상의 조합의 혼합물을 말한다. 약제학적 조성물은 화합물을 대상, 예컨대 포유류에게 투여하는 것을 용이하게 한다.

[0193] 치료적 유효량은 질환의 중증도, 대상의 연령 및 관련 건강상태, 사용된 화합물의 효능 및 기타 인자에 따라 크게 다를 수 있다. 화합물은 혼합물의 성분으로서 단독으로 또는 하나 이상의 치료제와 병용하여 사용될 수 있다.

[0194] 본 명세서에 기재된 약제학적 제제는 경구, 비경구 (예를 들어, 정맥내, 피하, 근육내), 비강내, 구강, 국소, 직장, 또는 경피 투여 경로를 포함하나 이에 한정되지 않는 적절한 투여 경로에 의해 대상에게 투여된다. 본 명세서에 기재된 약제학적 제제는 수분산액, 자기 유화 분산액, 고용체, 리포솜 분산액, 에어로졸, 고형 제형, 분말, 속방형 제제, 서방형 제제, 급속 용해성 제제, 정제, 캡슐, 환약, 지연 방출성 제제, 지속 방출성 제제, 박동성 방출 제제, 다중 미립자(multiparticulate) 제제, 및 혼합된 속방형 및 서방형 제제를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0195] 일부 실시 형태에서, 약제학적 조성물은 코르티코스테로이드, 항구토제, 진정제, 항암제, 항염증제, 키나제 억제제, HSP90 억제제, 및 히스톤 데아세틸라제 (HDAC) 억제제를 포함하나, 이에 한정되지 않는 하나 이상의 추가의 치료적 활성제를 추가로 포함한다.

[0196] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드의 치료적 유효량을 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 치료적 유효량을 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

치료법

[0198] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 질환 또는 상태의 치료를 위해 투여된다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 치료적 유효량을 포유류에게 투여하는 것을 포함하는, 포유류의 AR 의존성 또는 AR 매개성 질환 또는 상태의 치료 방법이 본 명세서에 기재된다.

[0199] 일부 실시 형태에서, AR 매개성 또는 AR 의존성이 질환 또는 상태를 앓고 있는 대상 (예를 들어, 인간)에게 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물을 투여하는 것을 포함하는 방법이 제공된다. 일부 실시 형태에서, AR 매개성 또는 AR 의존성이 질환 또는 상태의 치료용 의약의 제조를 위한, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물의 용도가 제공된다. 일부 실시 형태에서, AR 매개성 또는 AR 의존성이 질환 또는 상태의 치료를 위한, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물이 제공된다. 일부 실시 형태에서, 대상 (예를 들어, 인간)에게 일반적으로 제3 세대 AR 억제제 화합물 이외의 하나 이상의 추가의 치료적 활성제가 투여된다.

[0200] 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물 이외의 하나 이상의 추가의 치료적 활성제를 투여하는 것을 추가로 포함한다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물 이외의 하나 이상의 추가의 치료적 활성제는 호르몬, 호르몬 수용체 작용제 또는 길항제, 코르티코스테로이드, 항구토제, 진정제, 항암제, 항염증제, 키나제 억제제, HSP90 억제제, 히스톤 데아세틸라제 (HDAC) 억제제로부터 선택된다. 일부 실시 형태에서, 제3 세대 AR 억제제 화합물은 제3 세대 AR 억제제 화합물 이외의 하나 이상의 추가의 치료적 활성제에 앞서, 이와 동시에, 이후에, 또는 이와 간헐적으로 투여된다.

[0201] 일부 실시 형태에서, 생식선 자극 호르몬 방출 호르몬 (GnRH) 작용제 또는 길항제는 본 명세서에 제공된 제3 세대 AR 억제제 화합물과 병용하여 대상에게 투여된다. 일부 실시 형태에서, GnRH 수용체 작용제, 예컨대 름프롤라이드, 부세렐린 및 고세렐린은 본 명세서에 제공된 제3 세대 AR 억제제 화합물과 병용하여 대상에게 투여된다. GnRH 수용체 작용제는 호르몬 생성의 초기 급증 (즉, "임상 악화(clinical flare)"), 이어서 황체 형성 호르몬 생성 억제를 일으키며, 결국 전립선암 세포의 지속적 성장이 좌우되는 테스토스테론 및 다이하이드

로테스토스테론의 억제를 일으킨다. 일부 실시 형태에서, AR 의존성 또는 AR 매개성 질환 또는 상태, 예컨대 전립선암, 유방암, 방광암 또는 간세포 암의 치료를 위해, 본 명세서에 제공된 제3 세대 AR 억제제 화합물과 병용하여 생식선 자극 호르몬 방출 호르몬 (GnRH) 작용제 또는 길항제가 대상에게 투여된다. 일부 실시 형태에서, 거세 저항성 전립선암 (CRPC)의 치료를 위해 본 명세서에 제공된 제3 세대 AR 억제제 화합물과 병용하여 생식선 자극 호르몬 방출 호르몬 (GnRH) 작용제 또는 길항제가 대상에게 투여된다. 일부 실시 형태에서, GnRH 수용체 작용제를 사용한 치료에 의해 유발된 호르몬 생성의 초기 급증을 감소시키거나 억제하도록 본 명세서에 제공된 제3 세대 AR 억제제 화합물이 대상에게 투여된다. 일부 실시 형태에서, 제3 세대 AR 억제제 화합물은 GnRH 수용체 작용제 또는 길항제에 앞서, 이와 동시에, 이후에, 또는 이와 간헐적으로 투여된다.

[0202] 일부 실시 형태에서, AR 의존성 또는 AR 매개성 질환 또는 상태는 양성 전립선 비대증, 다모증, 여드름, 전립선의 아데노마 및 종양, 안드로겐 수용체 함유 양성 또는 악성 종양 세포, 하이퍼필로스터티, 지루증, 자궁내막증, 다낭성 난소 증후군, 안드로겐성 탈모증, 성선기능저하증, 골다공증, 정자 형성 억제, 리비도, 악액질, 식욕 부진, 연령과 관련된 테스토스테론 레벨 저하를 위한 안드로겐 보충, 전립선암, 유방암, 자궁내막암, 자궁암, 방광암, 간세포 암, 안면 홍조, 및 케네디병, 근위축 및 근력 저하, 피부 위축, 뼈 손실, 빈혈, 동맥경화증, 심혈관 질환, 에너지 손실, 웰빙 손실, 제2형 당뇨병 또는 복부지방 축적이다. 일부 실시 형태에서, AR 의존성 또는 AR 매개성 질환 또는 상태는 AR 의존성 또는 AR 매개성 암, 예를 들어 전립선암, 유방암, 방광암 또는 간(즉, 간세포) 암이다.

[0203] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 치료적 유효량을 포유류에게 투여하는 것을 포함하는, 포유류의 암의 치료 방법이 본 명세서에 기재된다. 일부 실시 형태에서, 암은 호르몬 의존성 암이다. 일부 실시 형태에서, 호르몬 의존성 암은 AR 의존성 암이다. 일부 실시 형태에서, 암은 전립선암이다. 일부 실시 형태에서, 암은 거세 저항성 전립선암이다. 일부 실시 형태에서, 암을 치료 방법은 적어도 하나의 항암제를 포유류에게 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0204] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 포유류의 전립선암을 치료하는데 사용되며, 포유류는 항암제를 사용한 치료를 받지 않았다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 포유류의 전립선암을 치료하는데 사용되며, 포유류는 화학요법 화합물을 사용한 치료를 받지 않았다.

[0205] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 포유류의 전립선암을 치료하는데 사용되며, 포유류에게 하나 이상의 항암제가 투여되었다. 예시적인 항암제는 제1 및 제2 세대 AR 길항제 (예를 들어, 비칼루타마이드, 플루타마이드, 하이드록시플루타마이드, 널루타마이드, ARN-509, 엔잘루타마이드 (MDV3100) 및 RD162)를 포함하나 이에 한정되지 않는 호르몬 치료제 및 호르몬 (예를 들어, 안드로겐) 생성을 억제하는 화합물, 예를 들어 갈레테론 (TOK001), TAK-700 또는 아비라테론 아세테이트, 화학요법 화합물, 대사길항물질, 항암 항체, 수술, 방사선, 및 온열(hyperthermal) 요법을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 포유류의 전립선암을 치료하는데 사용되며, 포유류에게 하나 이상의 화학요법 화합물이 투여되었다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 포유류의 전립선암을 치료하는데 사용되며, 포유류는 수술에 의해 치료되었다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 포유류의 전립선암을 치료하는데 사용되며, 포유류는 방사선 요법으로 치료되었다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 포유류의 전립선암을 치료하는데 사용되며, 포유류는 온열 요법으로 치료되었다.

[0206] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 포유류의 전립선암을 치료하는데 사용되며, 포유류에게 항암제를 사용한 하나 이상의 치료 사이클이 투여되었다.

[0207] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 치료적 유효량을 포유류에게 투여하는 것을 포함하며, 상기 화합물이 AR 역작용제, AR 길항제, AR 분해제, AR 수송 조절제, AR DNA 결합 억제제 또는 이들의 조합인 포유류의 암의 치료 방법이 본 명세서에 기재되어 있다.

[0208] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 치료적 유효량을 포유류에게 투여하는 것을 포함하며, 상기 화합물이 AR 역작용제인 포유류의 암의 치료 방법이 본 명세서에 기재되어 있다.

- [0209] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 치료적 유효량을 포유류에게 투여하는 것을 포함하며, 상기 화합물이 AR 길항제인 포유류의 암의 치료 방법이 본 명세서에 기재되어 있다.
- [0210] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 치료적 유효량을 포유류에게 투여하는 것을 포함하며, 상기 화합물이 AR 분해제인 포유류의 암의 치료 방법이 본 명세서에 기재되어 있다.
- [0211] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 치료적 유효량을 포유류에게 투여하는 것을 포함하며, 상기 화합물이 AR 수송 조절제인 포유류의 암의 치료 방법이 본 명세서에 기재되어 있다.
- [0212] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 치료적 유효량을 포유류에게 투여하는 것을 포함하며, 상기 화합물이 AR DNA 결합 억제제인 포유류의 암의 치료 방법이 본 명세서에 기재되어 있다.
- [0213] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용가능한 염의 치료적 유효량을 포유류에게 투여하는 것을 포함하며, 상기 화합물이 AR 단백질 합성 억제제인 포유류의 암의 치료 방법이 본 명세서에 기재되어 있다.
- [0214] 일부 실시 형태에서, 암은 전립선암이다. 일부 실시 형태에서, 암은 거세 저항성 전립선암이다. 일부 실시 형태에서, 전립선암은 ARN-509 내성 전립선암이다. 일부 실시 형태에서, 전립선암은 엔잘루타마이드 (MDV3100) 내성 전립선암이다. 일부 실시 형태에서, 전립선암은 RD162 내성 전립선암이다. 일부 실시 형태에서, 전립선암은 아비라테론 아세테이트 내성 전립선암이다. 일부 실시 형태에서, 전립선암은 갈레테론 (TOK001) 내성 전립선암이다. 일부 실시 형태에서, 전립선암은 TAK-700 내성 전립선암이다.
- [0215] 본 명세서에 기재된 약제학적 제제는 경구, 비경구 (예를 들어, 정맥내, 피하, 근육내), 구강, 국소 또는 경피 투여 경로를 포함하나 이에 한정되지 않는 다수의 투여 경로에 의해 다양한 방법으로 대상에게 투여 가능하다. 본 명세서에 기재된 약제학적 제제는 수분산액, 자기 유화 분산액, 고용체, 리포솜 분산액, 고형 제형, 분말, 속방형 제제, 서방형 제제, 급속 용해성 제제, 정제, 캡슐, 환약, 지연 방출성 제제, 지속 방출성 제제, 박동성 방출 제제, 다중 미립자 제제, 및 혼합된 속방형 및 서방형 제제를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 경구 투여된다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 정맥내 투여된다.
- [0216] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 국소적으로 투여된다. 이러한 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 다양한 국소적으로 투여 가능한 조성물, 예컨대 용액, 혼탁액, 로션, 젤, 페이스트, 샴푸, 스크럽, 러브(rub), 스미어(smear), 약용 스틱, 약용 붕대, 밤, 크림 또는 연고로 제형화된다. 이러한 약제학적 화합물은 가용화제, 안정제, 탄력성 향성제(tonicity enhancing agent), 완충제 및 보존제를 함유할 수 있다. 한 측면에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 항안드로겐 화합물은 피부에 국소적으로 투여된다.
- [0217] 다른 측면에서, AR 활성이 질환 또는 상태의 병상 및/또는 증상의 원인이 되는 질환, 장애 또는 상태를 치료하기 위한 의약의 제조에 있어서의 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물의 용도가 있다. 한 측면에서, 질환 또는 상태는 본 명세서에 규정된 질환 또는 상태 중 어느 하나이다.
- [0218] 상술한 측면 중 어느 하나에 있어서, (a) 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물의 유효량이 포유류에게 전신 투여되고/되거나; (b) 제3 세대 AR 억제제 화합물의 유효량이 포유류에게 경구 투여되고/되거나; (c) 제3 세대 AR 억제제 화합물의 유효량이 포유류에게 정맥내 투여되고/되거나; (d) 제3 세대 AR 억제제 화합물의 유효량이 포유류에게 주사에 의해 투여되고/되거나; (e) 제3 세대 AR 억제제 화합물의 유효량이 포유류에게 국소적으로 투여되고/되거나; (f) 제3 세대 AR 억제제 화합물의 유효량이 포유류에게 비전신적으로 또는 국소적으로 투여되는 추가의 실시 형태가 있다.
- [0219] 상술한 측면 중 어느 하나에 있어서, (i) 제3 세대 AR 억제제 화합물이 1회 투여되거나; (ii) 제3 세대 AR 억제제 화합물이 하루 동안에 걸쳐 다수회 포유류에게 투여되거나; (iii) 지속적으로; 또는 (iv) 연속적으로 투여되는 추가의 실시 형태를 비롯하여, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물의 유효량의 단회 투여를 포함하는 추가의 실시 형태가 있다.

- [0220] 상술한 측면 중 어느 하나에 있어서, (i) 제3 세대 AR 억제제 화합물이 단회 투여에서와 같이 연속적으로 또는 간헐적으로 투여되고; (ii) 다수회 투여 간의 시간이 6시간마다이며; (iii) 제3 세대 AR 억제제 화합물이 8시간마다 포유류에게 투여되고; (iv) 제3 세대 AR 억제제 화합물이 12시간마다 포유류에게 투여되며; (v) 제3 세대 AR 억제제 화합물이 24시간마다 포유류에게 투여되는 추가의 실시 형태를 비롯하여, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물의 유효량의 다수회 투여를 포함하는 추가의 실시 형태가 있다. 추가의 또는 대체 실시 형태에서, 상기 방법은 휴약 기간을 포함하며, 제3 세대 AR 억제제 화합물의 투여가 일시적으로 정지되거나, 투여되는 화합물의 투여량이 일시적으로 감소되고; 휴약 기간의 종료 시에, 화합물의 투여가 재개된다. 일부 실시 형태에서, 휴약 기간의 길이는 2일에서 1년간으로 다양하다.
- [0221] 또한 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물을 포유류에 투여하는 것을 포함하는 포유류의 AR 활성화를 감소시키는 방법이 제공된다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 포유류의 전립선 세포의 AR 활성화를 감소시키는 것을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 비전립선 세포의 AR 활성화를 감소시키는 것을 포함한다. 일부 실시 형태에서, AR 활성화를 감소시키는 방법은 안드로겐 수용체에 대한 안드로겐의 결합을 감소시키는 것을 포함한다. 일부 실시 형태에서, AR 활성화를 감소시키는 방법은 세포의 AR 농도를 감소시키는 것을 포함한다.
- [0222] 일부 예에서, AR 의존성 또는 AR 매개성인 질환 또는 상태의 치료용 의약의 제조에 있어서의 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물의 용도가 본 명세서에 개시되어 있다. 일부 실시 형태에서, 상기 질환 또는 상태는 전립선암이다. 일부 실시 형태에서, AR 의존성 또는 AR 매개성 질환 또는 상태가 본 명세서에 기재되어 있다.
- [0223] 일부 예에서, AR 의존성 또는 AR 매개성인 질환 또는 상태의 치료 또는 예방에 있어서의 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물의 용도가 본 명세서에 개시되어 있다. 일부 실시 형태에서, AR 의존성 또는 AR 매개성 질환 또는 상태가 본 명세서에 기재되어 있다.
- [0224] 본 명세서에 개시된 임의의 실시 형태에서, 포유류는 인간이다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 인간에게 투여된다.
- [0225] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 AR 활성을 약화시키거나 감소시키거나 제거시키는데 사용된다.
- [0226] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 방법에 의해 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 선택적 AR 조절제이다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 방법에 의해 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 AR에 대한 특이도가 높으며, 바람직한 조직 선택적인 약리학적 활성을 갖는다. 바람직한 조직 선택적인 약리학적 활성은 전립선 세포의 AR 길항제 활성 및 비전립선 세포의 AR 길항제 비활성을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 개시된 제3 세대 AR 억제제 화합물은 AR 작용제 활성이 무시해도 좋을 정도이거나 이를 전혀 나타내지 않는 항안드로겐이다.
- [0227] 일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된 AR 억제제 화합물의 활성 대사물, 토토머, 약제학적으로 허용가능한 용매화물, 약제학적으로 허용가능한 염 또는 프로드러그로부터 선택되는, 본 명세서에 개시된 방법에 의해 동정된 제3 세대 AR 억제제 화합물이 본 명세서에 나타나 있다.
- [0228] 일부 실시 형태에서, 제3 세대 AR 억제제 화합물을 포함하는 약제학적 조성물은 코르티코스테로이드, 항구토제, 진정제, 항암제, 항염증제, 키나제 억제제, HSP90 억제제, 및 히스톤 데아세틸라제 (HDAC) 억제제를 포함하나 이에 한정되지 않는 하나 이상의 추가의 치료제와 병용하여 투여된다. 일부 실시 형태에서, 제3 세대 AR 억제제 화합물을 포함하는 약제학적 조성물은 제1 및 제2 세대 AR 길항제 (예를 들어, 비칼루타마이드, 플루타마이드, 하이드록시플루타마이드, 널루타마이드, ARN-509, 엔잘루타마이드 (MDV3100) 및 RD162)를 포함하나 이에 한정되지 않는 호르몬 치료제, 호르몬 (예를 들어, 안드로겐) 생성을 억제하는 화합물, 예를 들어 갈레테론 (TOK001), TAK-700 또는 아비라테론 아세테이트를 포함하는 CYP17A 억제제, 화학요법 화합물, 대사길항물질, 항암 항체, 수술, 방사선, 및 온열 요법을 포함하나 이에 한정되지 않는 항암제와 병용하여 투여된다. 일부 실시 형태에서, 제3 세대 AR 억제제 화합물과 추가의 치료제는 동일한 조성물로 투여된다. 일부 실시 형태에서, 제3 세대 AR 억제제 화합물과 추가의 치료제는 동시에, 순차적으로 또는 간헐적으로 투여된다. 일부 실시 형태에서, 제3 세대 AR 억제제 화합물과 추가의 치료제는 동일한 투여 경로에 의해 투여된다. 일부 실시 형태에서, 제3 세대 AR 억제제 화합물과 추가의 치료제는 상이한 투여 경로에 의해 투여된다.

[0229]

키트/제품

[0230]

본 명세서에 기재된 진단 및 치료 용도에 사용하는 키트 및 제품도 본 명세서에 기재되어 있다. 이러한 키트는 담체, 패키지, 또는 바이알, 관 등과 같은 하나 이상의 용기를 수용하도록 구획화된 용기를 포함할 수 있으며, 각각의 용기(들)은 본 명세서에 기재된 방법에 사용되는 분리된 요소들 중 하나를 포함한다. 적절한 용기에는 예를 들어, 병, 바이알, 주사기 및 시험관이 포함된다. 용기는 예를 들어, 유리 또는 플라스틱을 포함한 허용 가능한 재료로 제조된다.

[0231]

일부 실시 형태에서, 본 명세서에 제공된 키트는 대상에서 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 검출하거나 대상에서 돌연변이 AR 폴리펩티드를 검출하기 위해 사용된다 (즉, 진단 키트). 일부 실시 형태에서, 키트는 제1 세대 또는 제2 세대 AR 길항제에 대하여 내성을 갖거나 내성을 가질 가능성이 있는 것으로 대상을 동정하거나, 제1 세대 또는 제2 세대 AR 길항제 요법에 대한 내성 발현을 모니터링하거나, 이들의 조합을 위해 제3 세대 AR 길항제를 사용한 치료에 대한 대상을 선택하기 위해 사용된다. 본 명세서에 제공된 키트는 대상으로부터의 세포에 있어서의 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 검출, 돌연변이 AR 폴리펩티드의 검출, AR 활성의 검출, 또는 이들의 조합을 위한 하나 이상의 시약을 포함한다. 예시적인 시약은 완충제, PCR 시약, 항체, 효소 염색용 기질, 크로마젠 또는 기타 재료, 예컨대 슬라이드, 용기, 마이크로타이터 플레이트, 및 임의로, 방법을 행하기 위한 사용설명서를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 당업자는 다수의 기타 가능한 용기 및 플레이트, 및 다양한 재료와 접촉하기 위해 사용될 수 있는 시약을 인지할 것이다. 키트는 또한 대조군 샘플, 예를 들어 핵산 또는 단백질, 예를 들어 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드 또는 본 명세서에 제공된 돌연변이 AR 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 키트는 내인성 안드로겐 유전자 발현 검출을 위한 하나 이상의 올리고뉴클레오티드 프라이머 세트를 포함한다.

[0232]

일부 실시 형태에서, 용기(들)는 임의로 조성물 중의 또는 본 명세서에 개시된 다른 제제와 병용된, 본 명세서에 기재된 방법에 의해 동정된 하나 이상의 제1 세대 또는 제2 세대 AR 길항제 또는 제3 세대 AR 억제제 화합물을 포함할 수 있다. 용기(들)는 임의로 멸균 액세스 포트를 갖는다(예를 들어, 용기는 정맥내 용액 백 또는 피하주사용 바늘에 의해 판통가능한 스토퍼를 갖는 바이알일 수 있음). 이러한 키트는 본 명세서에 기재된 방법에서의 이의 용도와 관련된 식별 설명서 또는 라벨 또는 사용설명서와 함께 화합물을 임의로 포함한다.

[0233]

키트는 전형적으로 본 명세서에 기재된 화합물의 사용을 위한 상업적 및 사용자 관점에서 바람직한 다양한 재료(예컨대, 임의로 농축 형태의 시약, 및/또는 장치) 중 하나 이상을 각각 가지고 있는 1종 이상의 추가의 용기를 포함할 것이다. 이러한 재료의 비제한적 예에는 완충제, 희석제, 필터, 바늘, 주사기; 담체, 패키지, 용기, 바이알 및/또는 내용물 및/또는 사용설명서가 열거된 튜브 라벨, 및 사용설명서가 있는 패키지 삽입물이 포함되나 이에 한정되지 않는다. 사용설명서 세트도 또한 전형적으로 포함될 것이다.

[0234]

라벨은 용기 상에 있거나 용기와 결합될 수 있다. 라벨을 형성하는 문자, 숫자 또는 기타 캐릭터가 용기 자체에 부착, 성형 또는 에칭되는 경우, 라벨은 용기 상에 있을 수 있고; 라벨이 예를 들어, 패키지 삽입물로서, 용기를 또한 수용하고 있는 리셉터클(receptacle)이나 캐리어 내에 존재할 경우, 라벨은 용기와 결합될 수 있다. 라벨은 내용물이 특정 치료 용도에 사용되는 것을 나타내기 위해 사용될 수 있다. 라벨은 또한, 본 명세서에 기재된 방법에서와 같은 내용물의 사용법을 나타낼 수도 있다.

[0235]

포장 재료, 본 명세서에 제공된 방법을 사용하여 동정된, 포장 재료 내의 제3 세대 AR 억제제 화합물, 및 화합물 또는 조성물, 또는 이들의 약제학적으로 허용가능한 염, 토토머, 약제학적으로 허용가능한 N-옥사이드, 약제학적 활성 대사물, 약제학적으로 허용가능한 프로드러그, 또는 약제학적으로 허용가능한 용매화물이 안드로겐 수용체의 효과를 감소, 약화 또는 제거시키는데 사용되거나, 안드로겐 수용체 활성의 감소 또는 제거에 의해 혜택이 얻어지는, 질환 또는 상태의 하나 이상의 증상의 치료, 예방 또는 개선을 위해 사용된다는 것을 나타내는 라벨을 포함하는 제품이 제공된다.

[0236]

항안드로겐 내성 세포주의 생성

[0237]

AR 길항제를 사용한 치료에 대하여 내성을 나타내는 전립선암 세포주의 생성 방법이 본 명세서에 제공된다. 일부 실시 형태에서, 전립선암 세포주는 ARN-509를 사용한 치료에 대하여 내성을 나타낸다. 일부 실시 형태에서, 전립선암 세포주는 엔잘루타마이드 (MDV3100)를 사용한 치료에 대하여 내성을 나타낸다. 일부 실시 형태에서, 제공된 방법에 의해 생성되는 내성 세포주는 내성 세포주를 생성하는데 사용되는 모세포주와 비교하여, 고 레벨의 AR을 발현한다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법에 의해 생성되는 내성 세포주는 모세포주와 비교하여, 약 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10배 또는 그 이상의 양의 AR을 발현

한다. 일부 실시 형태에서, 내성 세포주는 돌연변이 AR 단백질을 발현한다.

[0238] 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 전립선암 세포주(즉, 모세포주)를 AR 길항제와 접촉시켜, 세포를 소정 시간 동안 배양하는 것을 포함한다. 일부 실시 형태에서, 상기 방법은 소정 시간동안 AR 길항제의 농도를 증가시키면서 세포를 배양하는 것을 포함한다. 일부 실시 형태에서, AR 길항제의 농도는 약 0.1 μM 내지 약 100 μM , 예를 들어 1 μM 내지 약 10 μM 의 범위이다. 일부 실시 형태에서, 세포는 AR 길항제 0.8 μM , 1.5 μM , 3 μM 및 6 μM 에서 배양된다. 일부 실시 형태에서, AR 길항제의 농도는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 이상의 배수로 증가된다. 일부 실시 형태에서, AR 길항제의 농도는 3배로 증가된다. 일부 실시 형태에서, 세포는 AR 길항제의 존재 하에 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 1주, 2주, 3주, 4주, 1개월, 1.5개월, 2개월, 2.5개월, 3개월 또는 그 이상 배양된다. 일부 실시 형태에서, 세포는 분열되어, 2일마다, 3일마다, 4일마다, 5일마다, 6 일마다, 매주 또는 그 이상에서 리플레이팅된다. 일부 실시 형태에서, AR 길항제를 함유하는 배지는 매일, 2일마다, 3일마다, 4일마다, 5일마다, 6일마다, 매주 또는 그 이상에서 리프레시된다. 일부 실시 형태에서, AR 길항제는 제2 세대 길항제이다. 일부 실시 형태에서, AR 길항제는 ARN-509이다. 일부 실시 형태에서, AR 길항제는 엔잘루타마이드(MDV3100)이다.

[0239] 일부 실시 형태에서, 전립선암 세포주는 인간 전립선 선암 세포주이다. 일부 실시 형태에서, 전립선암 세포주는 LNCaP 세포주이다. 일부 실시 형태에서, 전립선암 세포주 안드로겐 수용체를 과발현한다. 일부 실시 형태에서, 전립선암 세포주는 LNCaP/AR(cs) 또는 LNCaP/AR(cs)-Luc이다.

실시예

[0241] 이들 실시예는 다만 예시를 목적으로 주어진 것으로, 본원에 제공된 청구범위의 범주를 한정하는 것은 아니다.

실시예 1: 생체 내에서의 약물 내성 세포주의 생성

[0243] 항 AR 화합물 ARN-509를 사용한 치료에 대하여 내성을 나타내는 세포주를 거세 저항성 인간 전립선 선암(LNCaP/AR(cs)) 이종 이식 종양을 가진 마우스의 생체 내에서 생성하였다. LNCaP/AR(cs) 세포주는 거세 저항성 전립선암을 모방하는(mimicking) LNCaP 모세포주와 비교하여, 안드로겐 수용체 (AR)를 3 내지 5배 과발현한다 (문헌[Chen et al. (2004) *Nature Medicine* 10:33-39]).

[0244] LNCaP-AR(cs) 이종 이식 종양을 거세한 6주령의 수컷 SCID 무모 비근교계(Hairless Outbred) 마우스 (SHO, Charles Rivers Laboratories)에서 성장시켰다. 50% 무혈청 RPMI 및 50% 마트리겔(Matrigel)TM 중의 1×10^6 개의 LNCaP-ARcs 세포를 거세한 지 3 내지 5일 후에 10마리의 마우스의 우측 옆구리에 피하 주사하였다 (100 μl /동물). 종양 크기를 매일 모니터링하였다. 종양의 평균 용적이 ~200 mm^3 에 도달한 때에(주사한 지 약 60일 후), 동물에게 QD 투여 쳐방(즉, 20 mM 시트레이트 완충액 (pH 4.0) 중의 15% 비타민 E-TPGS 및 65%의 0.5% w/v 카르복시메틸 셀룰로스(CMC) 용액 중에서 경구로)에 의해 비히클 단독 (n=1) 또는 30mg/kg ARN-509 (n=9)를 사용한 치료를 개시하였다. 처음에, ARN-509를 사용한 치료는 종양 퇴화를 일으켰다. 투여한 지 약 75일 후에, 단일 종양이 성장을 회복하여, 치료 개시 시보다 큰 크기로 진행되었다. 일단 내성 종양이 ~800 mm^3 에 이르면, 마우스를 안락사시켜, 종양을 적출하였다. 종양 세포를 3 mL 주사기를 사용하여 균질화에 의해 수동으로 분산시켰다. 종양 세포를 RPMI + 10% FBS 및 10 μM ARN-509에 배양하였다. 이러한 방법에 의해, 1개의 내성 세포주를 생성하였다.

실시예 2: 시험관 내에서의 약물 내성 세포주의 생성

[0246] 항 AR 화합물 ARN-509 및 MDV3100을 사용한 치료에 대하여 내성을 나타내는 세포주를 LNCaP 인간 전립선 선암 세포주를 사용하여 시험관 내에서 생성시켰다.

[0247] LNCaP (ATCC), LNCaP/AR(cs) (문헌[Guo et al. (2006) *Cancer Cell* 0:309-19]) 및 LNCaP/AR-Luc (문헌[Tran et al. *Science* (2009) 324(5928):787-90]; 문헌[E11wood-Yen et al. (2006) *Cancer Res.* 66:10513-6])를 10% FBS (Hyclone)를 보충한 RPMI 1640에서 유지하였다. LNCaP (ATCC), LNCaP/AR(cs) 또는 LNCaP/AR(cs)-Luc 세포를 ARN-509 또는 MDV3100의 농도를 증가시키면서 6개월간 배양하였다. 처음에, 세포 50 mL를 약 80,000개의 세포/mL의 농도로 225 cm^2 세포 배양 플라스크에 씨딩하여, 800 nM ARN-509 또는 MDV3100의 존재 하에 RPMI + 10% FBS에서 성장시켰다. 배지 및 약물을 주 2회로 변경하여, 세포를 필요에 따라 75 cm^2 세포 배양 플라스크에서 계대하였다. 약물 처리된 세포의 성장 속도가 미처리 대조군 세포의 성장 속도로 증가됨에 따라, 각 화합물의 농도를 약 1.5 μM 에서 약 6 μM 로 증가시켰다. 약물 선택 후 약 6개월 후에, 세포를 RPMI + 10% FBS 및 6 μM ARN-509 또는 MDV3100에 유지시켰다. 선택 후에, 10개의 독립적인 ARN-509 및 MDV3100 내성 세포주를 얻었다.

2개의 세포주는 ARN-509의 존재 하에 선택된 LNCaP (ATCC) 세포로부터 유래되었다. 4개의 세포주는 LNCaP/AR(cs)로부터 유래되었는데, 이들 중 2개의 세포주에 대해서는 ARN-509를 사용한 치료를 행하고, 2개의 세포주에 대해서는 MDV3100를 사용한 치료를 행하였다. LNCaP/AR(cs)-Luc 세포를 사용하여 4개의 내성 세포주를 유도하였는데, 이들 중 2개에 대해서는 ARN-509 치료를 행하고, 2개에 대해서는 MDV3100 치료를 행하였다.

[0248] 실시예 3: 약제 내성을 시험하기 위한 증식 분석

ARN-509 및 MDV3100 치료에 대한 세포주의 내성을 시험하기 위해 세포 증식 분석을 행하였다.

16 μ L/웰의 세포를 페놀 레드 비함유 RPMI 1640 (5% CSS 함유) 중에서 50,000개의 세포/mL의 밀도로 384-웰 세포 배양 플레이트 (플랫 클리어 바텀 블랙 폴리스티렌(Flat Clear Bottom Black Polystyrene) TC로 처리된 384 웰 플레이트 (Corning))에 씨딩하고, 37°C에서 2일간 배양하여, 모든 ARN-509 및 MDV3100 내성 세포주에 대하여 증식 분석을 행하였다. 작용제 분석에서, 각각의 화합물의 11개의 포인트 세미로그 희석액 (point semi-log dilution)을 배지에서 제조하여, 각 희석액 16 μ L를 세포에 첨가하였다. ARN-509, MDV3100 및 비칼루타마이드를 3.16×10^{-5} M 내지 3.18×10^{-10} M의 범위의 최종 농도로 행한 반면에, 합성 안드로겐 메틸트라이에놀론 (R1881)을 3.16×10^{-8} M 내지 3.18×10^{-13} M의 최종 농도 범위로 행하였다. 길항제 모드 분석에서, 화합물을 또한 200 pM R1881 (PerkinElmer, Waltham, MA) (최종 [R1881] = 100 pM)을 함유하는 배지에 희석한 다음에, 세포 (16 μ L)에 첨가하였다. 7일 후에, 16 μ L의 셀타이터-글로® 발광 세포 생존율 분석시료 (Promega, Madison, WI)를 세포 배양물에 직접 첨가하여, 상대 발광도(Relative Luminescence Unit(RLU))를 제조업자의 사용설명서에 따라 측정하였다.

작용제 모드 분석에서, 샘플의 생존율을 다음과 같이 계산하였다: % 생존율 = $100 \times ([RLU \text{ 샘플} - RLU \text{ 세포 비함유 배지}] / [RLU \text{ 1881 처리 세포} - RLU \text{ 세포 비함유 배지}])$ (표 1A). 길항제 모드 분석에서, 샘플의 생존율을 다음과 같이 계산하였다: % 생존율 = $100 \times ([RLU \text{ 샘플} - RLU \text{ 0일}] / [RLU \text{ R1881 처리 세포} - RLU \text{ 0일}])$ (표 1B).

[0252] [표 1A]

작용제 증식 분석 (% 생존율)

	R1881	비칼루타마이드	MDV3100	ARN-509
LNCaP	100.0	+	+	+
LNCaP/AR(cs)	100.0	+	+	+
부류 1	100.0	++	++	++
부류 2	100.0	+	++	++

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

[R1881] = 0.1 nM, [길항제] = 10 μ M

[0254] [표 1B]

길항제 증식 분석 (% 생존율)

	R1881	비칼루타마이드	MDV3100	ARN-509
LNCaP	100.0	+	+	+
LNCaP/AR(cs)	100.0	+	+	+
부류 1	100.0	++	++	++
부류 2	100.0	++	++	++

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

[R1881] = 0.1 nM, [길항제] = 10 μ M

증식 분석에서, ARN-509 및 엔잘루타마이드는 모두 3개의 LNCaP 모세포주에서 완전 증식성 길항제이었다 (표 1A, 도 1a). 내성 세포주를 2개의 별개의 부류로 분리하였다. 이들의 모세포주와는 달리, 제1 부류의 ARN-509- 및 MDV3100 내성 세포 (부류 1)는 첨가된 안드로겐의 부재 하에 증식한다. 세포의 리간드 비의존성 증식은 ARN-509, MDV3100 또는 비칼루타마이드의 존재 하에 변화되지 않는다. 합성 안드로겐, R1881은 고 농도에서 부류 1의 세포의 증식을 억제한다. 이러한 R1881의 증식 억제 활성은 MDV3100 또는 ARN-509에 의해 길항되는데, 이는 AR이 여전히 이를 세포주에서 MDV3100 및 ARN-509를 결합할 수 있음을 나타낸다.

부류 1의 내성 세포주는 LNCaP-AR(cs) 이종 이식 종양으로부터 유래된 1개의 세포주, ARN-509의 존재 하에 선택된 LNCaP/AR(cs) 세포로부터 유래된 2개의 세포주, MDV3100의 존재 하에 선택된 LNCaP/AR(cs) 세포로부터 유래된 2개의 세포주, ARN-509의 존재 하에 선택된 LNCaP/AR(cs)-Luc로부터 유래된 2개의 세포주, 및 MDV3100의 존

재 하에 선택된 LNCaP/AR(cs)-Luc로부터 유래된 1개의 세포주를 포함하였다.

[0258] 제2 부류의 MDV3100- 및 ARN-509 내성 세포주 (부류 2)는 이들의 모세포주와 유사하게, 계속해서 증식에 있어서 안드로겐 의존성을 나타낸다. 그러나, 모세포주에 대한 이들의 활성과는 달리, ARN-509 및 MDV3100은 부류 2의 세포주의 증식을 촉진시킬 수 있다. 그러나, 비칼루타마이드는 부류 2의 세포주의 증식을 촉진시키지 않았다. 부류 2의 내성 세포주는 ARN-509의 존재 하에 선택된 LNCaP 세포로부터 유래된 2개의 세포주 (LNCaP ARN-509r1 및 LNCaP ARN-509r2) 및 MDV3100의 존재 하에 선택된 LNCaP/AR(cs)-Luc로부터 유래된 1개의 세포주 (LNCaP ENZr2)를 포함하였다.

[0259] 부분 작용제 활성은 선택용으로 사용된 화합물과는 관계가 없으며; ARN-509 및 엔잘루타마이드는 내성 변이체를 유도하는데 사용되는 화합물에 관계없이 모든 3개의 세포주에서 부분 작용제 활성을 나타내었다. 증식 활성과 일치하게, ARN-509 또는 엔잘루타마이드는 이들 내성 세포주의 안드로겐 의존성 증식에 부분적으로만 길항하였다 (표 1B, 도 1b, 1c).

실시예 4: 약제 내성을 시험하기 위한 전사 리포터 분석

[0261] 리포터 유전자에 작동가능하게 연결된 ARE 반응 요소를 이용한 전사 리포터 분석을 행하여, ARN-509, MDV3100, 및 비칼루타마이드 처리에 대한 세포 내성을 시험하였다.

[0262] 100 μ L의 세포를 5% 차콜 스트립트(charcoal stripped) 혈청을 보충한 RPMI 1640 중에서 250,000개의 세포/mL의 밀도로 96-웰 세포 배양 플레이트에 씨딩하여, 37°C에서 하룻밤 동안 부착시켜, 모든 내성 세포주에 대하여 전사 리포터 분석을 행하였다.

[0263] 통합 안드로겐 반응성 리포터를 포함하는 LNCaP/AR(cs)-Luc 세포를 제외하고는, 세포를 제조업자의 프로토콜에 따라 리포펙틴(Lipofectin® (Life Technologies))을 사용하여 일시적으로 트랜스펙션하였다. LNCaP 및 LNCaP/AR(cs) 세포에, 428 ng 리포터 벡터 (pGL4 Pb-루시페라제 (pGL4 (Promega, Madison, WI) 중의 래트 프로바신 프로모터)), 50 ng pRL-CMV (정규화 벡터(Promega, Madison, WI)) 및 0.7 μ L 리포펙틴®을 사용하여, 삼중 트랜스펙션을 행하였다. 트랜스펙션 후에, 세포를 4시간 동안 인큐베이션하였다.

[0264] 그 다음에 세포를 시험 화합물 ARN-509, MDV3100 및 비칼루타마이드로 처리하였다. 작용제 분석에서, 화합물을 단계 희석하여, 화합물 50 μ L + RPMI 1640 + 5% 차콜 스트립트 FBS를 세포에 첨가하였다. 길항제 분석에서, 화합물을 단계 희석하여, 5% 차콜 스트립트 혈청을 보충한 RPMI + 3 nM R1881을 함유하는 화합물 50 μ L를 세포에 첨가하였다. 48시간의 인큐베이션 후에, 배지를 제거하여, 세포를 40 μ L의 용해 완충액(25 mM 트리스 포스페이트, 2 mM CDTA, 10% 글리세롤, 0.5% 트리톤(Triton) X-100, 2 mM DTT)에 용해시켰다. 40 μ L 루시페라제 완충액(20 mM 트리신, 0.1 mM EDTA, 1.07 mM ($MgCo_3$)₄ Mg(OH)₂ · 5H₂O, 2.67 mM MgSO₄, 33.3 mM DTT, 270 μ M 보호 A, 470 μ M 루시페린, 530 μ M ATP)의 첨가 직후에, 반딧불이 루시페라제 활성을 측정하였다. 40 μ L 코엘렌테라진 완충액(1.1 M NaCl, 2.2 mM Na₂EDTA, 0.22 M K₃PO₄ (pH 5.1), 0.44 mg/mL BSA, 1.3 mM NaN₃, 1.43 μ M 코엘렌테라진, 최종 pH를 5.0으로 조정함)의 첨가 후에, 레닐라 루시페라제를 측정하였다.

[0265] 증식 분석에서 동정된 두 부류의 ARN-509- 및 MDV3100 내성 세포주도 전사 분석에 상이한 특성을 나타내었다. pGL4 Pb-루시페라제 리포터를 이용한 일시적 트랜스펙션 분석 또는 통합 프로바신-루시페라제 리포터 (즉, LNCaP/AR(cs)-Luc 유래 세포)를 이용한 분석에서, ARN-509 및 MDV3100은 미처리 대조군과 비교하여 루시페라제 활성 저하에 의해 입증되는 바와 같이, 안드로겐 비의존성 부류 1의 내성 세포에서 효과적인 길항제이었다 (표 2). 그러나, 비칼루타마이드는 모세포와 비교하여, 부류 1의 내성 세포에서 작용제 활성 증가를 나타내었다. 부류 2의 내성 세포에서, MDV3100은 프로바신-루시페라제 리포터 분석에서 약한 부분 작용제이었지만, 비칼루타마이드 및 ARN-509는 작용제 활성을 나타내지 않았다.

[표 2A]

작용제 전사 리포터 분석 (% 최대 활성)				
	R1881	비칼루타마이드	MDV3100	ARN-509
LNCaP	>90	+	+	+
LNCaP/AR(cs)	>90	+	+	+
부류 1	>90	++	+	+
부류 2	>90	+	++	+

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

[R1881] = 10 nM, [길항제] = 50 μ M

[0268]

[표 2B]

길항체 전사 리포터 분석 (% 최대 활성)				
	R1881	비칼루타마이드	MDV3100	ARN-509
LNCaP	>90	+	+	+
LNCaP/AR(cs)	>90	+	+	+
부류 1	>90	++	+	++
부류 2	>90	+	++	+

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

[R1881] = 10 nM, [길항체] = 50 μM

[0269]

실시예 5: 내인성 유전자 전사 분석

[0270]

내인성 유전자 전사에 대한 R1881, MDV3100 및 비칼루타마이드 처리의 효과를 조사하였다.

[0271]

0.5 mL의 세포를 5% 차콜 스트립트 FBS (호르몬 결핍)를 함유하는 RPMI 중에서 500,000개의 세포/mL의 밀도로 24-웰 플레이트에 플레이팅하고, 세포를 37°C에서 3일간 증식시켜, 모든 내성 세포주에 대하여 내인성 유전자 전사 분석을 행하였다. 그 다음에 세포를 24시간 동안 10 nM R1881, 30 μM MDV3100 또는 30 μM 비칼루타마이드로 처리하였다.

[0272]

전체 RNA를 오럼(Aurum)TM 전체 RNA 단리 키트 (BIO-RAD, Hercules, CA)를 사용하여 단리하였다. RNA (1 μg)를 아이스크립트(iScript) cDNA 합성 키트 (BIO-RAD, Hercules, CA)를 사용하여 역전사하여, cDNA를 생성하였다. 어플라이드 바이오시스템즈 (Applied Biosystems) 7900HT 인스트루먼트(instrument) 및 SYBR 그린 PCR 마스터 믹스(Master Mix; Applied Biosystems, Foster City, CA)를 사용하여, 실시간 PCR을 행하였다. PCR 반응을 제조업자의 프로토콜, 및 95°C, 10분간의 서모사이클 프로토콜, 이어서 95°C, 15초간 및 58°C, 1분간의 40회 사이클에 따라 6 μL에서 행하였다. 안드로겐 반응성 유전자 (PSA, SLUG, TMPRSS2, STEAP4, FKBP5, ORM1, NOV, FASN, NKX3.1, AMIGO2, BDNF, CAMK2N1, HPGD, NCAPD3, PLD1) 발현을 GAPDH 발현으로 정규화하여, 모세포주의 비히를 처리에 대하여 상대적으로 표시하였다. 상대 발현 결과는 표 3A에 주어진다. PCR에 사용된 프라이머는 표 3B에 열거된다.

[0273]

유사한 화합물 및 부류 선택적 작용제 활성이 내인성 안드로겐 반응성 유전자에 대하여 관찰되었지만, 내인성 유전자와 관련하여 MDV3100의 전사 활성이 더욱 뚜렷하다 (표 3). 부류 1의 내성 세포에서, 비칼루타마이드는 강한 전사 활성을 나타내며, MDV3100은 약한 전사 작용제이다. 대조적으로, 부류 2의 내성 세포주에서, 비칼루타마이드는 약한 전사 작용제이지만, MDV3100은 시험한 유전자에 대하여 강한 전사 작용제 활성을 나타낸다.

[0274]

[표 3A]

내인성 유전자 전사 활성 (비히클의 배수)		PSA	SLUG	TMPRSS2	STEAP4	FKBP5	ORM1	NOV
LNCaP	DMSO	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	R1881	++	+++	++	++++	++	+++	--
	비칼루타마이드	+	+	+	+	+	-	+
	MDV3100	+	+	+	-	+	+	+
LNCaP/AR(cs)	DMSO	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	R1881	+++	+++	++	++++	++	++++	--
	비칼루타마이드	++	+	+	++	+	+++	+
	MDV3100	+	+	+	+	+	+	+
부류 1	DMSO	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	R1881	++	+++	+	++++	+++	++++	--
	비칼루타마이드	+	+++	+	+++	++	++	+
	MDV3100	+	+	+	+	+	+	+
부류 2	DMSO	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
	R1881	+++	+++	++	++++	+++	++++	--
	비칼루타마이드	+	+	+	+	+	+	+
	MDV3100	+++	+++	++	+++	++	+++	-

[R1881] = 10 nM, [길항체] = 30 μM

-- < 0.1, - = 0.1 ~ 1, + = 1 ~ 10, ++ = 10 ~ 50, +++ = 50 ~ 500, ++++ > 500

[0275]

[0277]

[표 3B]

전사 실시간 PCR 올리고뉴클레오티드 서열		
유전자	전방향 프라이머 서열	역방향 프라이머 서열
AMIGO2	AGAGACTCAGAGGCACCAT (서열 번호 20)	ATCAGCAAACACAGCAGCTC (서열 번호 21)
BDNF	AGAGCTGTGGATGAGGACAGAA (서열 번호 22)	AGGCTCAAAGGCACTGACTACT (서열 번호 23)
CAMK2N1	GACCAAGCGGTTGTATTGA (서열 번호 24)	TGCCCTGTCGGTCAATTTCAT (서열 번호 25)
FKBP5	CGGAGAACCAAACCGAAGG (서열 번호 26)	CTTGCCCCACAGTGAATGC (서열 번호 27)
HPGD	ACAGCAGCCGTTATTGTGCTTC (서열 번호 28)	TGGCATTCAGTCTCACACCACTGT (서열 번호 29)
NCAPD3	ACCACTACCACATCATCTCAAGGCA (서열 번호 30)	TGCTCTTCTTGCCAGATCCCTCGT (서열 번호 31)
NOV	GCCTTACCCCTTGCAGCTTAC (서열 번호 32)	GAGCATGCTGTCCACTCTGT (서열 번호 33)
ORM1	CTTGCAGCATTCAGTCAGATGT (서열 번호 34)	TTTCCTCTCCTCTCGTGTGCTT (서열 번호 35)
PLD1	GAGCCCTGCTACAGATGGTCA (서열 번호 36)	TGTCCTACAGCAGGACGAAG (서열 번호 37)
PSA	CCTCCTGAAGAACATGATTCC (서열 번호 38)	GAGGTCCACACACTGAAGTT (서열 번호 39)
SLUG	TTCTGGCTGGCCAACATAAGC (서열 번호 40)	ACACAAGGTAATGTGIGGGTCCGA (서열 번호 41)
STEAP4	CGGCAGGTGTTGTGTGAAAT (서열 번호 42)	AGAAGACACAGCACAGCAGACA (서열 번호 43)
TMPRSS2	TAGTGAAACCACTGTTCTGCCCA (서열 번호 44)	AGCGITCAGCACTCTGAGGTCTT (서열 번호 45)
FASN	CGCTCTGGTTCATCTGCTCTG (서열 번호 46)	TCATCAAAGGTGCTCTCGCTG (서열 번호 47)
NKX3.1	TGGAGAGGAAGTTCAAGCCATCAGA (서열 번호 48)	AGGAGAGCTGTTTCGCTTAGTCT (서열 번호 49)

[0278]

[0279] 별개의 실험에서, 하기 유전자의 유전자 발현을 LNCaP, LNCaP/AR(cs), LNCaP/AR-Luc, LNCaP ARN-509r1, LNCaP ARN-509r2 및 LNCaP/AR-Luc ENZr2 세포에서 분석하였다: PLD, CAM2KN, NOV, BDNF, AMIGO2, FASN, TMPRSS2, NKX3.1, PSA, FKBP5, HPGD, NCAPD3, SLUG, STEAP4, 및 ORM. 세포를 호르몬 결핍 배지에서 3일간 배양한 후에, 비히클, 1 nM R1881 또는 30 μ M 화합물로 처리하였다. 유전자 발현을 상술한 바와 같이 GAPDH로 정규화하였다. 결과는 표 4A 및 4B에 나타낸다.

[0280]

[표 4A]

LNCaP, LNCaP/AR(cs) 및 내성 세포주 전사

유전자	LNCaP				LNCaP/AR(cs)				LNCaP ARN-509r1			
	비히클	ARN-509	ENZ	R1881	비히클	ARN-509	ENZ	R1881	비히클	ARN-509	ENZ	R1881
AMIGO2	1.00	1.12	1.20	0.68	1.00	0.72	1.13	0.54	1.00	0.62	0.99	0.21
BDNF	1.00	1.09	0.85	0.40	1.00	0.85	1.13	0.48	1.00	0.90	1.58	0.31
CAM2KN1	1.00	1.17	1.39	0.13	1.00	0.80	1.11	0.05	1.00	0.37	0.59	0.01
FASN	1.00	1.34	1.24	5.58	1.00	0.75	1.19	7.11	1.00	1.04	1.53	3.12
FKBP5	1.00	0.99	1.04	54.95	1.00	0.99	1.71	97.01	1.00	2.58	9.45	53.45
HPGD	1.00	1.48	1.78	100.43	1.00	1.18	2.01	183.55	1.00	2.36	10.20	61.39
NCAPD3	1.00	1.16	1.20	104.69	1.00	0.91	1.22	93.05	1.00	1.29	3.12	90.51
NKX3_1	1.00	0.90	1.66	30.06	1.00	1.13	2.51	8.82	1.00	6.54	11.55	8.11
NOV	1.00	1.73	2.57	0.15	1.00	1.04	1.27	0.04	1.00	1.40	1.39	0.03
ORM1	1.00	0.71	1.13	873.10	1.00	0.84	3.58	3444.31	1.00	15.89	205.07	1296.13
PLD1	1.00	1.09	0.70	0.02	1.00	1.04	0.65	0.02	1.00	0.33	0.24	0.03
PSA	1.00	0.66	1.69	47.84	1.00	1.43	2.69	19.16	1.00	32.67	57.68	85.63
SLUG	1.00	1.27	2.35	129.79	1.00	1.03	2.06	89.88	1.00	4.66	42.52	164.28
STEAP4	1.00	0.78	1.54	639.15	1.00	0.90	1.95	1314.23	1.00	3.03	32.22	1184.45
TMPRSS2	1.00	0.77	1.68	22.16	1.00	1.06	2.36	17.51	1.00	10.20	23.75	37.27

유전자	LNCaP				LNCaP ARN-509r2			
	비히클	ARN-509	ENZ	R1881	비히클	ARN-509	ENZ	R1881
AMIGO2	1.00	1.12	1.20	0.68	1.00	0.67	0.63	0.55
BDNF	1.00	1.09	0.85	0.40	1.00	1.04	0.77	0.47
CAM2KN1	1.00	1.17	1.39	0.13	1.00	0.46	0.38	0.02
FASN	1.00	1.34	1.24	5.58	1.00	0.98	0.93	4.82
FKBP5	1.00	0.99	1.04	54.95	1.00	8.00	3.41	48.50
HPGD	1.00	1.48	1.78	100.43	1.00	1.49	4.56	59.30
NCAPD3	1.00	1.16	1.20	104.69	1.00	1.13	1.35	54.95
NKX3_1	1.00	0.90	1.66	30.06	1.00	3.73	6.28	10.20
NOV	1.00	1.73	2.57	0.15	1.00	1.39	0.71	0.07
ORM1	1.00	0.71	1.13	873.10	1.00	3.94	23.75	625.99
PLD1	1.00	1.09	0.70	0.02	1.00	0.81	0.29	0.02
PSA	1.00	0.66	1.69	47.84	1.00	1.91	2.48	7.89
SLUG	1.00	1.27	2.35	129.79	1.00	1.31	9.58	77.17
STEAP4	1.00	0.78	1.54	639.15	1.00	1.45	4.69	377.41
TMPRSS2	1.00	0.77	1.68	22.16	1.00	3.07	4.86	15.14

[0281]

[0282]

[표 4B]

LNCaP/AR-Luc 및 LNCaP/AR-Luc ENZr2 전사

유전자	LNCaP/AR-Luc				LNCaP/AR-Luc ENZr2			
	비히클	ARN-509	ENZ	R1881	비히클	ARN-509	ENZ	R1881
AMIGO2	1.00	1.13	1.44	0.54	1.00	0.99	0.78	0.49
BDNF	1.00	1.17	1.08	0.18	1.00	0.56	0.44	0.12
CAM2KN1	1.00	1.13	1.51	0.11	1.00	0.65	0.57	0.11
FASN	1.00	1.08	1.40	3.48	1.00	1.72	1.20	4.44
FKBP5	1.00	1.16	1.46	20.82	1.00	2.46	3.03	23.43
HPGD	1.00	1.88	2.51	2.41	1.00	1.22	1.61	1.39
NCAPD3	1.00	1.09	1.33	17.27	1.00	1.38	1.39	31.12
NKX3_1	1.00	1.14	1.68	11.24	1.00	4.82	5.21	10.13
NOV	1.00	2.55	1.95	0.47	1.00	1.21	1.20	0.27
ORM1	1.00	1.27	1.39	7.89	1.00	15.24	17.88	347.29
PLD1	1.00	1.45	1.33	0.15	1.00	0.46	0.74	0.21
PSA	1.00	0.60	0.44	2.10	1.00	4.59	3.48	16.91
SLUG	1.00	1.13	2.73	48.84	1.00	5.98	12.30	160.90
STEAP4	1.00	0.88	1.23	20.25	1.00	1.66	4.38	79.89
TMPRSS2	1.00	0.74	1.35	3.46	1.00	4.44	4.23	7.73

[0283]

[0284]

실시예 6: 내성 메카니즘 분석

[0285]

환자 유래의 전립선암 종양, 및 다수의 동물 및 시험관 내 모델의 어레이 CGH, mRNA 발현 프로파일링 및 서열 분석에 따르면, 다수의 경로가 거세 저항성 상태로의 진행에 관여되었음을 알았다. 거세 저항성 전립선암에서 동정된 가장 통상적인 활성화 경로 중 세가지는 PI3K, Raf 및 AR 경로이다. 본 실시예에서, Akt 및 Erk 인산화를 웨스턴 블로트로 평가하여, 각각, PI3K 및 Raf 경로의 활성화 상태를 평가하였다.

[0286]

부류 1 및 부류 2의 세포주에서의 약제 내성 모드를 평가하기 위해, 웨스턴 분석을 행하여, 거세 저항성 전립선암에서 AR 활성을 조절하는 것으로 알려지고 통상 활성화되는 몇몇 세포 신호전달 경로의 활성화 상태 및 AR 단백질 레벨을 평가하였다. AR, Akt, 인산화 Akt (Ser473), p44/42 MAPK (Erk1/2), 인산화 p44/42 MAPK

(Erk1/2) (Thr202/Tyr204), 튜불린 및 액틴의 상대 발현을 측정하였다.

[0287] 웨스턴 분석에서, 세포를 5% 차콜 스트립트 혈청을 보충한 RPMI 1640에서 3일간 증식시켰다. 세포를 홀트(Halt)TM 프로테아제 및 포스파타아제 억제제 각테일(Thermo Scientific)을 함유하는 변형된 방사성 면역침강 완충액(mRIPA; 10 mM 트리스, 150 mM NaCl, 1% (v/v) NP-40, 0.5% 데옥시콜레이트, 0.1% SDS, 5 mM EDTA, pH 7.4)에 용해시켰다. 정제된 용해물의 총 단백질을 로우리 어세이(Lowry Assay; 바이오라드(Biorad) DC 단백질 분석)에 의해 정량화하였다. NuPAGE[®] LDS 샘플 완충액 및 샘플 환원제를 용해물에 첨가하여, 10분간 70°C로 가열하였다. 총 세포 단백질 20 µg을 NuPAGE 4-12% 비스 트리스 아크릴아미드 젤 상에 분리하고, Xcel IITM 블롯 모듈(blot module; Invitrogen)을 사용하여 니트로셀룰로스막으로 이동시켰다. 막을 실온에서 30분간 블로킹 완충액(LI-COR, Lincoln, NE)에서 인큐베이션한 다음에, 안드로겐 수용체(Santa Cruz Biotechnology cat. No. SC-816)에 대한 일차 항체, Akt 및 Phospho-Akt(Ser473)(각각, Cell Signaling cat. No. 9272 및 4058), p44/42 MAPK(Erk1/2) 및 Phospho-p44/42 MAPK(Erk1/2)(Thr202/Tyr204) (각각, Cell Signaling cat. No. 4695 및 4376s) 및 튜불린 또는 액틴(각각, Sigma cat. No. T6199 및 A4700)을 사용하여 60분간 인큐베이션하였다. IRDye[®] 컨쥬게이트된 염소 항마우스 또는 래빗 IgG(LI-COR)를 사용하여 인큐베이션한 후에, 단백질 밴드를 오디세이(Odyssey)[®] 적외선 화상 시스템을 사용하여 정량화하였다.

[0288] 웨스턴 블롯에 의해, 부류 1의 내성 세포주의 AR 레벨이 LNCaP/AR(cs) 세포주에서 관찰된 것보다 약 2 내지 4배 높았다(도 2). 약 3배의 AR 레벨 증가가 생체 내에서의 거세 세팅에서 LNCaP 세포의 증식을 지지하기에 충분한 것과 유사하게, AR 레벨을 2 내지 4배로 더욱 상승시키는 것이 시험관 내에서 안드로겐의 부재 하에 증식을 향상시키기에 충분할 수 있다. 대조적으로, 부류 2의 내성 세포주의 AR 레벨은 모세포주에서 관찰된 것과 유사하였다. 따라서, 부류 2의 세포주에서의 엔잘루타마이드 및 ARN-509의 부분 작용제로의 전환은 AR 과발현으로 인한 것이 아니었다. 전체 및 인산화 Akt 및 Erk의 근소한 차가 어느 부류의 내성 세포주에서도 일관되지 않은 변화로 관찰되었다.

실시예 7: 돌연변이 AR 서열 결정

[0289] MDV3100 및 ARN-509가 부류 2의 내성 세포주의 전사 및 증식 작용제인 반면에, 비칼루타마이드는 길항제로서 존재한다. 부류 2의 내성 세포에서의 AR 발현은 모세포주와 유사하였다(실시예 6). 따라서, 부류 2의 내성 세포의 AR 서열을 결정하여, AR 리간드 결합 도메인의 돌연변이가 기능 획득 활성(gain of function activity)을 촉진시키는지를 확인하였다.

[0290] 부류 1 및 부류 2의 세포로부터 단리된 RNA의 역전사에 의해 생성된 cDNA(실시예 5 참조)를 주형으로서 사용하여, AR 서열을 결정하였다. 일련의 올리고뉴클레오티드를 사용하여, AR 리간드 결합 도메인 (c.2013-2757)을 포함하는 오버래핑 세그먼트를 제조업자의 프로토콜을 이용하여 퓨전(Phusion)[®] 폴리머라제 (New England Biolabs)를 사용한 PCR에 의해 형성하였다. 비특이적 밴드 및 비통합 올리고뉴클레오티드를 제거하여, PCR 산물을 젤 정제하였다. 정제된 PCR 산물을 내부 올리고뉴클레오티드를 사용하여 서열결정하였다.

[0291] 단일 핵산 돌연변이를 독립적으로 유래된 3개의 세포주의 뉴클레오티드 위치 2626에서의 AR 리간드 결합 도메인 내에서 동정하였다. 모든 세포주에서 동정된 미스센스 돌연변이는 티민 (T)에서 시토신 (C)으로의 변이이었으며, 암호화된 폴리펩티드의 아미노산 위치 876에서의 페닐알라닌 (F)을 류신 (L) (서열 번호 19)로 변환시킨다. 게다가, LNCaP/AR-Luc ENZr2 세포주로부터의 개별 서브클로닝 PCR 산물의 스크리닝은 모든 세포주에서 F876L 돌연변이가 내인성 AR 대립유전자에서 발생함을 나타내었다.

[0292] F876은 CRPC AR 돌연변이의 핫스팟(hotspot)인 AR 리간드 결합 포켓 영역의 헬릭스 11에 위치한다 (도 1d). 그러나, 다이하이드로테스토스테론의 17 α -OH기에 대한 수소 결합을 조절하는 T877 및 L701과는 달리, F876은 헬릭스 11 (F786, L880), 헬릭스 11과 12 사이의 루프 (F891) 및 헬릭스 3 (F697, L701)의 잔기에 의해 형성된 작은 소수성 코어의 원인이 된다. 유사한 잔기 및 소수성 리간드 상호작용이 에스트로겐 및 프로게스테론 수용체에서 보존되는 반면에, F876은 고 친화성 결합 또는 스테로이드 선택성에 관여하지 않았다. F876이 스테로이드 결합에 비교적 중요하지 않은 역할을 하는 것으로 예상되는 것과 일치하게, AR-F876L 돌연변이가 전립선암 또는 안드로겐 비감수성 집단에는 보고되어 있지 않다.

실시예 8: AR 결손 세포에서의 돌연변이 AR의 발현

[0293] F876L 돌연변이가 ARN-509 및 MDV3100에 대한 작용제 활성을 부여한다는 것을 확인하기 위해, 점 돌연변이를 전장 야생형 AR 및 LNCaP T877A 돌연변이 수용체와 관련하여 발생시켰다. F876L 및 F876L/T877A 돌연변이를 제조업자의 프로토콜에 따라, 쿼체인지 II 부위 특이적 돌연변이 유발 키트(QuickChange II Site-Directed

Mutagenesis Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA))를 사용하여 플라스미드 pcDNA3-AR에 발생시켰다.

[0296] 리포터 유전자에 작동가능하게 연결된 ARE 반응 요소를 사용한 전사 리포터 분석을 행하여, ARN-509, MDV3100 및 비칼루타마이드 처리에 따른 돌연변이 AR의 전사 활성을 시험하였다.

[0297] 100 μ L의 HEPG2 세포를 10% 차콜 스트립트 혈청을 보충한 MEM 중에서 250,000개의 세포/mL의 밀도로 96-웰 세포 배양 플레이트에 씨딩하여, 37°C에서 하룻밤 동안 부착시켜, 전사 리포터 분석을 행하였다.

[0298] 세포를 제조업자의 프로토콜에 따라 리포택틴® (Life Technologies)을 사용하여 일시적으로 트랜스펙션하였다. 378 ng 리포터 벡터 (4X ARE-루시페라제 또는 pGL4 Pb-루시페라제 (pGL4(Promega, Madison, WI) 중의 래트 프로바신 프로모터)), 50 ng pcDNA-AR (야생형 또는 돌연변이), 50 ng pRL-CMV (정규화 벡터) 및 0.7 μ L 리포택틴®을 사용하여, 삼중 트랜스펙션을 행하였다. 트랜스펙션 후에, 세포를 4시간 동안 인큐베이션하였다.

[0299] 인큐베이션 후에, 세포를 시험 화합물 ARN-509, MDV3100 및 비칼루타마이드로 처리하였다. 작용제 분석에서, 화합물을 1:6으로 희석하여, MEM + 5% 차콜 스트립트 FBS 중의 화합물을 50 μ L를 30 nM 내지 0.64 nM의 최종 농도 범위로 세포에 첨가하였다. 길항제 분석에서, 화합물을 1 nM R1881 (야생형 AR 경우) 또는 5 nM R1881 (F876L AR 경우)을 사용하여 단계 희석하였다.

[0300] 48시간의 인큐베이션 후에, 배지를 제거하여, 세포를 40 μ L의 용해 완충액(25 mM 트리스 포스페이트, 2 mM CDTA, 10% 글리세롤, 0.5% 트리톤 X-100, 2 mM DTT)에 용해시켰다. 40 μ L 루시페라제 완충액(20 mM 트리신, 0.1 mM EDTA, 1.07 mM ($MgCo_3$)₄ Mg(OH)₂ · 5H₂O, 2.67 mM MgSO₄, 33.3 mM DTT, 270 μ M 보호소 A, 470 μ M 루시페린, 530 μ M ATP)의 첨가 직후에, 반딧불이 루시페라제 활성을 측정하였다. 40 μ L 코엘렌테라진 완충액(1.1 M NaCl, 2.2 mM Na₂EDTA, 0.22 M K_xPO₄ (pH 5.1), 0.44 mg/mL BSA, 1.3 mM NaN₃, 1.43 μ M 코엘렌테라진, 최종 pH를 5.0으로 조정함)의 첨가 후에, 레닐라 루시페라제를 측정하였다.

[0301] 일시적 트랜스펙션 분석에서, 제2 세대 AR 길항제 ARN-509 및 MDV3100은 F876L 또는 F876L/T877A 돌연변이 AR과 관련하여 AR 의존성 전사 활성을 유도하지만, 비칼루타마이드에 의한 유도는 최소이었다 (표 5). 예를 들어, 4XARE-루시페라제 또는 Pb-루시페라제 리포터를 사용하는 HepG2 세포에서, 비칼루타마이드가 아니라, ARN-509 및 MDV3100이 F876L 또는 F876L/T877A 돌연변이 AR과 관련하여 AR 의존성 전사 활성을 유도하였다. 이는 부류 2의 세포주에서의 내성 메커니즘이 AR F876L 돌연변이임을 나타낸다.

[표 5]

AR 전사 활성 (DMSO 의 배수)			
R1881	비 칼루타마이드	MDV3100 (엔잘루타마이드)	ARN509
AR WT	+++	+	+
AR F876L	+++	+	++

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

[R1881] = 100 nM, [길항제] = 6.3 μ M

[0303]

[0304] 상기 결과를 확인하기 위해, 제2 실험을 4X-ARE-루시페라제 리포터에 대하여 행하였다. 본 실험에서, 제1 세대 항안드로겐인 닐루타마이드 및 하이드록시플루타마이드도 비칼루타마이드, ARN-509 및 엔잘루타마이드와 함께 비교하였다. AR 전사 리포터 분석을 실질적으로 약간의 변경을 가해 상술한 바와 같이 행하였다. 50 ng pCDNA3-AR 또는 pCDNA3-AR 돌연변이, 65 ng 4X ARE-루시페라제, 20 ng pRL (Promega), 및 25 ng pCMX를 사용하여, 삼중 트랜스펙션을 행하였다. 작용제 분석에서, 화합물을 단계 희석하여, 50 μ L의 화합물 + 차콜 스트립트 혈청을 보충한 RPMI 1640을 세포에 첨가하였다. 길항제 분석에서, 화합물을 단계 희석하여, 차콜 스트립트 혈청을 보충한 RPMI + 메틸트라이에놀론 (R1881)을 함유하는 화합물 50 μ L를 세포에 첨가하였다. 길항제 분석에서 사용된 최종 R1881 농도는 5nM R1881이 사용된 F876L을 제외하고는, 1 nM이었다.

[0305] 도 4에 나타낸 바와 같이, 야생형 AR과 관련하여, ARN-509 및 엔잘루타마이드는 4X-ARE 안드로겐 반응성 전사 리포터 분석에서 완전 길항제로, 최소 작용제 활성을 나타내었다. 그러나, AR-F876L 또는 AR F876L/T877A를 발현하는 세포에서, 엔잘루타마이드 및 ARN-509는 부분 전사 작용제이었다 (도 4a). 역으로, 제1 세대 항안드로겐인 비칼루타마이드, 닐루타마이드 및 하이드록시플루타마이드는 F876L 돌연변이에 대하여 최소 작용제 활성을 나타내었다 (표 6, 도 4) (Emax = % 최대 R1881 반응). 엔잘루타마이드 및 ARN-509는 CRPC 환자에서 제1 세대 AR 길항제에 대한 내성을 부여하거나 스테로이드 리간드 특이성을 확대시키는 AR 돌연변이인 T877A, L701H, H874Y 및 W741C에 대한 완전 길항제이었다.

[0306]

[표 6]

화합물	4X ARE 리포터 분석			
	WT IC ₅₀ (□ M)	WT Emax	F876L IC ₅₀ (□ M)	F876L Emax
ARN-509	0.79 ± 0.15	1.3 ± 0.3	0.09 ± 0.06	49.7 ± 11.1
엔잘루타마이드	1.12 ± 0.17	0.4 ± 0.1	0.13 ± 0.04	20.2 ± 5.2
비칼루타마이드	1.65 ± 0.93	10.0 ± 2.9	3.63 ± 0.04	0.7 ± 0.3
하이드록시풀루타마이드	0.36 ± 0.04	28.9 ± 5.0	2.60 ± 6.61	0.8 ± 0.2
닐루타마이드	1.11 ± 0.17	5.1 ± 2.1	7.59 ± 1.18	0.6 ± 0.1

[0307]

F876L 돌연변이의 DNA 결합 능력을 시험하기 위해, VP16-AR 융합 구축물을 형성하였다. 전장 인간 AR을 pVP16 (Clontech)에 서브클로닝하여, pVP16-AR을 생성하였다. AR 점 돌연변이를 제조업자의 프로토콜에 따라, 쿼체인 II 부위 특이적 돌연변이 유발 키트(Agilent Technologies, Santa Clara, CA)를 사용하여 VP16-AR에 발생시켰다.

[0309]

전사 분석을 실질적으로 상술한 바와 같이 행하였다. 35 ng pVP16-AR 또는 pVP16-F876L, 70 ng 4X ARE-루시페라제, 20 ng pRL (Promega), 및 35 ng pCMX를 사용하여, 삼중 트랜스펙션을 행하였다. 4X ARE-루시페라제 리포터 활성을 90 pM R1881 (야생형 VP16-AR의 경우) 또는 1 nM R1881 (F876L VP16-AR의 경우)의 부재 또는 존재 하에서의 화합물 농도 증가 시에 모니터링하였다. 루시페라제 활성을 상술한 바와 같이 측정하였다.

[0310]

수용체의 DNA 결합 능력을 모니터링하는 전사 리포터 분석을 반영한 야생형 VP16-AR 분석에서, 엔잘루타마이드 및 ARN-509는 완전 길항제이었다 (표 7, 도 4) (Emax = % 최대 R1881 반응). 그러나, VP16-AR-F876L과 관련하여, ARN-509 및 엔잘루타마이드는 AR DNA 결합을 촉진시켰다. 따라서, AR F876의 L로의 돌연변이는 제2 세대 항안드로겐인 엔잘루타마이드 및 ARN-509를 부분 작용제로 변환시키는데 충분하였다.

[0311]

[표 7]

화합물	AR-VP16			
	WT IC ₅₀ (□ M)	WT Emax	F876L IC ₅₀ (□ M)	F876L Emax
ARN-509	0.16 ± 0.06	3.98 ± 0.27	0.03 ± 0.02	53.98 ± 1.45
엔잘루타마이드	0.21 ± 0.07	2.65 ± 0.73	0.05 ± 0.01	34.32 ± 5.38
비칼루타마이드	0.18 ± 0.10	32.77 ± 5.76	2.51 ± 1.11	2.20 ± 1.35
하이드록시풀루타마이드	0.03 ± 0.01	42.28 ± 4.44	0.97 ± 0.27	5.36 ± 5.35
닐루타마이드	0.13 ± 0.08	33.53 ± 9.75	2.12 ± 0.68	2.90 ± 1.80

[0312]

실시예 9: 안정한 세포주 생성

[0314]

본 실시예에서, 세포주를 AR F876L 돌연변이의 안정한 발현으로 생성시켰다. pSR α F876L, pQCXIN-AR 및 pQCXIN-F876L 레트로바이러스를 먼저, 제조업자의 프로토콜에 따라, GP2-293 세포에 pVSV-G (Clontech)를 동시에 트랜스펙션(co-transfection)하여 생성시켰다.

[0315]

PC3 세포에 pQXIN-AR 또는 pQXIN-F876L 레트로바이러스를 형질도입하고 500 μg/mL 젠타마이신을 함유하는 RPMI 1640 배지 중에서의 선택에 의해, 야생형 또는 AR-F876L을 안정하게 발현하는 PC3 세포를 생성시켰다.

[0316]

LNCaP 세포에 pCDNA-F876L를 형질도입하거나 LNCaP 세포에 SR α F876L 레트로바이러스를 형질도입하여, AR-F876L을 안정하게 발현하는 LNCaP 세포를 생성시켰다. LNCaP/pCDNA-F876L의 각 클론을 400 μg/mL 젠타마이신 중에서 선택한 후에 단리하였다. LNCaP/SR α F876L 세포 풀(pool)을 400 mg/mL 젠타마이신 중에서 선택하였다.

[0317]

모든 세포주의 AR 단백질 발현을 AR N-20 항체 (Santa Cruz Biotechnology)를 사용한 웨스턴 분석에 의해 확인하였다.

[0318]

실시예 10: 평형 AR 결합 분석

[0319]

야생형 AR 대 F876L AR의 경쟁적 결합 분석을 상술한 바와 같이 야생형 인간 AR 또는 AR-F876L을 안정하게 발현하는 PC3 세포를 사용하여 문헌[Clegg et al. (2012) *Cancer Research* 72:1494-503]에 기재된 바와 같이 행하였다. Ki를 $K_i = IC_{50}/(1 + ([^3H-R1881]/K_d))$, $[^3H-R1881] = 0.6 \text{ nM}$ 로 계산하였다.

[0320]

평형 AR 결합 분석에서, ARN-509 및 엔잘루타마이드는 각각, 30 및 48배 보다 높은 친화성으로 돌연변이를 결합하였다 (표 8, 도 5) (R1881의 Kd: AR = 0.5 nM; AR-F876L = 0.64 nM). 따라서, AR에 대한 작용제 활성 증가는 야생형 및 F876L 수용체에 대한 결합 친화성 증가와 관련되어 있는데, 이는 작용제 확인에 의해 해리 상수 감소에 의한 고 친화성을 가능하게 함을 시사한다.

[0321]

[표 8]

화합물	AR 결합, WT K _i (nM)	AR 결합, F876L K _i (nM)
ARN-509	18.07 ± 7.46	0.68 ± 0.15
엔잘루타마이드	26.30 ± 12.77	0.60 ± 0.17
비칼루타마이드	26.56 ± 12.51	360.36 ± 283.85
하이드록시플루타마이드	14.56 ± 8.25	150.57 ± 55.10
닐루타마이드	17.74 ± 5.65	197.42 ± 9.26

[0322]

실시예 11: F876L 안정한 전립선암 세포주에 있어서의 AR 표적 유전자의 발현 및 상기 세포주의 증식

[0323]

상기에 나타낸 바와 같이, AR-F876L의 발현은 일시적 리포터에 기초한 분석에서 엔잘루타마이드 및 ARN-509 내성을 부여하는데 충분하였다. 본 실시예에서, 돌연변이를 안정하게 발현하는 전립선암 세포에서의 내인성 AR 표적 유전자 및 증식에 대한 F876L의 효과를 조사하였다. 2개의 LNCaP 세포주 (LNCaP/SR αF876L 및 LNCaP/pCDNAF876L)를 실시예 9에서 기재된 바와 같이 유전자 조작하여, AR-F876L을 LNCaP/AR(cs) 모델과 비교할만한 레벨로 과발현하였다.

[0324]

세포의 AR 레벨을 측정하기 위해, 단백질 추출물을 호르몬 결핍 배지에서 3일간 배양한 LNCaP, LNCaP/AR(cs), LNCaP/SR αF876L 및 LNCaP/pCDNAF876L 세포로부터 생성하였다. AR 단백질 레벨을 웨스턴 블롯에 의해 분석하였다. AR 레벨을 정량화하여 액틴으로 정규화하고, LNCaP 세포의 AR 발현에 대하여 상대적으로 나타내었다(도 6).

[0325]

내인성 표적 유전자 분석에서, LNCaP/AR(cs), LNCaP SR αF876L, 및 LNCaP/pCDNAF876L 세포를 호르몬 결핍 배지에서 3일간 배양한 후에, 비히클, 1 nM R1881, 또는 1 nM R1881의 존재 또는 부재 하에서의 1, 3, 10 및 30 μM ARN-509 또는 엔잘루타마이드로 처리하였다.

[0326]

증식 분석에서, LNCaP/AR(cs), LNCaP SR αF876L, 및 LNCaP/pCDNAF876L 세포를 상술한 바와 같이 호르몬 결핍 배지의 존재 하에 2일간 배양한 후에, 7일간 리간드 처리하였다. 길항제 분석에서, ARN-509 또는 엔잘루타마이드를 200 pM R1881 (100 pM 최종 농도)의 존재 하에 첨가하였다. 상술한 바와 같이 셀타이터-글로 발광에 기초한 생존율 분석에 의해, 증식을 정량화하였다.

[0327]

LNCaP/AR(cs) 세포에서, ARN-509 및 엔잘루타마이드는 AR 표적 유전자 또는 증식 활성 유도에 거의 영향을 미치지 않았다(도 7a, 표 9A). 두 길항제는 최고 농도에서의 이들의 작용제 활성에 일치하는 레벨로 R1881 유도성 전사 및 증식을 블로킹하였다(도 7b, 표 9B). 대조적으로, F876L-AR 발현 세포에서, 엔잘루타마이드 및 ARN-509는 전사 및 증식성 작용제 활성이 강력한 것으로 입증되었다(도 7a 및 7b, 표 9C 내지 9F).

[0328]

[표 9A]

LNCaP/AR(cs) 작용제 전사

유전자	비히클	1nM R1881	- R1881									
			엔잘루타마이드					ARN-509				
			0.3pM	1pM	3pM	10pM	30pM	0.3pM	1pM	3pM	10pM	30pM
AMIGO2	1.00	0.98	0.68	0.61	0.62	0.66	1.22	1.14	0.69	0.89	0.65	2.41
BDNF	1.00	0.86	1.04	0.92	0.88	0.95	0.98	1.15	0.93	1.03	1.03	1.80
CAM2KN1	1.00	0.04	0.80	0.70	0.71	0.64	0.64	0.90	0.76	0.99	0.78	1.56
FASN	1.00	4.12	0.47	0.32	0.29	0.31	0.58	0.46	0.40	0.42	0.41	1.30
FKBP5	1.00	100.51	0.91	0.62	0.75	0.61	0.85	0.99	0.71	0.91	0.75	1.87
HPGD	1.00	324.60	0.74	0.57	0.61	0.63	1.29	0.81	0.56	0.78	0.61	1.86
NCAPD3	1.00	95.54	0.66	0.57	0.47	0.56	0.79	0.72	0.74	0.73	0.74	1.34
NKK3.1	1.00	12.72	0.71	0.52	0.51	0.86	1.63	1.11	0.68	0.73	0.85	2.24
NOV	1.00	0.05	1.12	0.91	0.80	1.02	1.01	1.12	1.00	1.11	0.98	2.07
ORM1	1.00	6987.01	0.92	0.90	1.06	0.71	2.02	1.37	1.79	1.20	0.97	1.35
PLD1	1.00	0.03	0.77	0.62	0.63	0.56	0.56	1.28	0.66	0.88	0.65	1.33
PSA	1.00	22.14	0.42	0.32	0.38	0.74	1.60	0.44	0.49	0.58	0.61	1.13
SLUG	1.00	91.84	0.53	0.55	0.31	0.51	0.91	0.38	0.42	0.52	0.56	1.36
STEAP4	1.00	1498.46	0.75	0.73	0.52	1.16	1.28	0.94	0.77	1.05	0.56	1.01
TMPRSS2	1.00	35.42	0.75	0.53	0.63	0.89	1.45	0.99	0.64	1.04	0.62	2.78

[0330]

[0331]

[표 9B]

LNCaP/AR(cs) 길항제 전사

유전자	비히클	1nM R1881	+ 1nM R1881									
			엔잘루타마이드					ARN-509				
			0.3μM	1μM	3μM	10μM	30μM	0.3μM	1μM	3μM	10μM	30μM
AMIGO2	1.00	0.98	0.49	0.19	0.48	0.78	0.92	0.30	0.31	0.52	0.60	0.76
BDNF	1.00	0.86	0.61	0.28	0.63	0.99	1.12	0.43	0.35	0.67	0.74	0.88
CAM2KN1	1.00	0.04	0.04	0.06	0.27	0.50	0.56	0.04	0.06	0.19	0.43	0.42
FASN	1.00	4.12	1.30	0.42	0.71	0.46	0.59	1.92	1.52	1.08	0.60	0.64
FKBP5	1.00	100.51	23.51	5.64	3.32	1.41	1.50	33.14	22.49	12.56	2.74	1.08
HPGD	1.00	324.60	99.16	16.30	13.19	3.85	4.25	105.97	76.25	32.19	8.36	2.78
NCAPD3	1.00	95.54	23.74	4.35	3.14	1.29	1.27	43.93	32.00	15.57	2.39	0.96
NKX3.1	1.00	12.72	7.70	3.77	6.72	4.70	5.03	8.32	9.92	12.01	7.22	5.49
NOV	1.00	0.05	0.11	0.14	0.61	1.00	0.92	0.03	0.09	0.31	0.86	0.82
ORM1	1.00	6987.01	3521.95	503.02	257.85	43.91	22.70	5100.90	2679.73	1031.40	156.90	16.42
PLD1	1.00	0.03	0.02	0.02	0.13	0.42	0.54	0.02	0.02	0.04	0.11	0.32
PSA	1.00	22.14	22.76	8.82	11.75	6.59	5.65	19.09	21.75	23.57	12.90	7.20
SLUG	1.00	91.84	50.08	10.20	10.56	5.26	5.22	71.33	62.00	50.70	11.15	5.49
STEAP4	1.00	1498.46	585.81	109.37	74.44	13.61	7.79	1019.98	742.61	256.89	32.98	6.86
TMPRSS2	1.00	35.42	19.88	7.72	10.51	3.58	4.62	19.07	24.11	23.38	11.45	5.94

[0332]

[표 9C]

LNCaP/SR α F876L 길항제 전사

유전자	비히클	1nM R1881	- R1881									
			엔잘루타마이드					ARN-509				
			0.3μM	1μM	3μM	10μM	30μM	0.3μM	1μM	3μM	10μM	30μM
AMIGO2	1.00	0.29	0.58	0.32	0.47	0.40	0.31	0.27	0.47	0.23	0.34	0.27
BDNF	1.00	1.65	1.04	1.30	1.01	0.99	1.55	0.79	1.07	0.75	0.84	0.94
CAM2KN1	1.00	0.03	0.52	0.48	0.38	0.23	0.37	0.30	0.24	0.17	0.21	0.18
FASN	1.00	3.76	0.50	0.64	0.58	1.09	1.34	0.64	1.01	0.93	1.50	2.77
FKBP5	1.00	66.89	1.38	1.14	2.54	9.61	23.67	2.66	5.95	5.56	13.02	27.89
HPGD	1.00	182.19	0.68	0.96	2.79	18.98	55.76	4.18	7.90	10.12	25.79	69.22
NCAPD3	1.00	31.69	0.77	1.01	1.09	3.56	8.83	1.39	1.58	1.69	3.53	9.35
NKX3.1	1.00	10.80	4.26	5.54	7.05	11.94	14.20	7.12	9.47	7.96	9.85	12.67
NOV	1.00	0.06	0.55	0.28	0.55	0.42	0.21	0.27	0.51	0.31	0.29	0.17
ORM1	1.00	6535.38	2.17	4.85	18.77	242.08	2114.41	44.44	58.96	101.45	459.30	1357.12
PLD1	1.00	0.02	0.67	0.76	0.60	0.42	0.41	0.49	0.44	0.30	0.45	0.36
PSA	1.00	3.43	1.95	2.25	3.02	4.05	5.02	3.71	3.26	3.00	5.07	5.16
SLUG	1.00	99.20	1.21	1.55	3.28	16.87	107.64	5.56	5.91	8.15	26.35	56.48
STEAP4	1.00	1706.02	1.13	2.15	9.98	96.53	343.81	20.36	27.49	46.06	187.24	479.64
TMPRSS2	1.00	25.55	3.11	3.85	5.39	9.20	18.61	6.36	6.29	5.84	10.90	14.20

[0334]

[표 9D]

LNCaP/SR α F876L 길항제 전사

유전자	비히클	1nM R1881	+ 1nM R1881									
			엔잘루타마이드					ARN-509				
			0.3μM	1μM	3μM	10μM	30μM	0.3μM	1μM	3μM	10μM	30μM
AMIGO2	1.00	0.29	0.23	0.29	0.33	0.39	0.40	0.17	0.22	0.14	0.18	0.18
BDNF	1.00	1.65	0.53	0.64	0.62	0.51	0.71	0.74	0.76	0.57	0.50	0.63
CAM2KN1	1.00	0.03	0.08	0.12	0.19	0.24	0.32	0.03	0.03	0.06	0.11	0.17
FASN	1.00	3.76	1.29	1.22	0.85	0.94	1.58	2.23	2.03	1.39	1.30	2.66
FKBP5	1.00	66.89	17.90	14.89	10.21	17.33	40.52	36.57	39.48	26.46	29.94	22.71
HPGD	1.00	182.19	49.66	30.03	21.62	34.77	93.52	149.34	134.70	79.93	70.80	131.79
NCAPD3	1.00	31.69	6.34	4.28	2.21	3.44	13.64	19.83	15.47	8.71	6.50	11.82
NKX3.1	1.00	10.80	21.66	20.78	16.19	11.84	15.26	12.63	14.12	11.34	10.15	13.64
NOV	1.00	0.06	0.12	0.28	0.25	0.33	0.26	0.05	0.06	0.09	0.11	0.09
ORM1	1.00	6535.38	386.40	216.67	137.73	661.51	3496.87	3335.14	2343.29	1469.18	1608.16	3440.86
PLD1	1.00	0.02	0.04	0.08	0.14	0.37	0.48	0.01	0.01	0.02	0.08	0.20
PSA	1.00	3.43	5.84	5.63	4.47	4.54	4.64	4.93	4.38	4.59	5.28	4.17
SLUG	1.00	99.20	85.97	64.63	35.50	48.80	161.58	85.97	64.63	35.50	48.80	161.58
STEAP4	1.00	1706.02	259.94	147.25	83.20	275.88	645.04	259.94	147.25	83.20	275.88	645.04
TMPRSS2	1.00	25.55	14.05	13.81	11.78	12.92	20.19	14.05	13.81	11.78	12.92	20.19

[0336]

[0337]

[표 9E]

LNCaP/pCDNAF876L 작용제 전사

유전자	비히클 R1881	1nM R1881	- R1881									
			엔잘루타마이드					ARN-509				
			0.3μM	1μM	3μM	10μM	30μM	0.3μM	1μM	3μM	10μM	30μM
AMIGO2	1.00	0.92	1.28	0.82	0.87	0.72	0.91	1.07	0.86	1.25	0.60	1.55
BDNF	1.00	1.01	1.54	1.04	1.11	0.82	0.64	1.01	0.76	0.87	0.85	1.16
CAM2KN1	1.00	0.02	0.55	0.96	0.51	0.37	0.23	0.47	0.55	0.34	0.41	0.27
FASN	1.00	22.20	0.91	0.72	0.48	1.27	3.66	1.16	1.42	1.59	1.79	7.86
FKBP5	1.00	145.63	2.18	2.91	4.28	10.54	42.25	7.24	7.82	9.52	17.39	55.55
HPGD	1.00	854.42	4.70	6.32	13.26	26.78	105.81	15.36	19.27	29.25	47.33	173.82
NCAPD3	1.00	169.67	1.95	1.94	3.68	9.41	35.36	5.83	6.52	8.28	20.42	51.13
NKX3.1	1.00	9.67	3.76	3.71	3.57	4.69	8.12	6.07	5.72	5.93	7.05	11.69
NOV	1.00	0.08	1.73	1.62	2.19	0.88	0.49	1.24	1.01	0.82	0.86	0.72
ORM1	1.00	12816.69	116.91	195.36	659.73	2530.13	4760.77	932.41	1371.33	2307.29	3322.63	5541.08
PLD1	1.00	0.75	1.37	0.80	0.69	0.29	0.45	0.78	0.69	1.01	0.68	0.48
PSA	1.00	12.17	3.56	4.04	5.29	9.53	11.70	6.74	7.19	8.25	10.06	12.99
SLUG	1.00	268.77	1.99	3.53	4.74	14.91	55.93	7.84	8.70	10.91	21.21	71.08
STEAP4	1.00	3084.81	10.38	15.58	46.50	240.68	520.15	113.39	113.29	173.77	317.80	597.09
TMPRSS2	1.00	26.85	4.98	6.46	6.09	8.51	21.78	9.49	8.51	9.70	11.09	23.01

[0338]

[0339]

[표 9F]

LNCaP/pCDNAF876L 길항제 전사

유전자	비히클 R1881	1nM R1881	+ 1nM R1881									
			엔잘루타마이드					ARN-509				
			0.3μM	1μM	3μM	10μM	30μM	0.3μM	1μM	3μM	10μM	30μM
AMIGO2	1.00	0.92	0.51	0.43	0.39	0.49	0.52	0.24	0.31	0.43	0.41	0.40
BDNF	1.00	1.01	0.59	0.71	0.53	0.50	0.41	0.28	0.41	0.42	0.45	0.34
CAM2KN1	1.00	0.02	0.05	0.16	0.17	0.21	0.14	0.01	0.02	0.06	0.11	0.06
FASN	1.00	22.20	5.29	2.44	1.55	2.08	4.22	3.89	5.52	3.22	2.10	3.98
FKBP5	1.00	145.63	53.18	26.29	10.03	14.22	32.97	45.69	48.95	38.89	24.82	30.26
HPGD	1.00	854.42	149.44	59.67	21.66	35.90	96.55	192.05	170.69	107.79	73.28	87.03
NCAPD3	1.00	169.67	101.65	31.49	14.34	16.69	42.06	68.41	90.52	62.27	22.96	44.10
NKX3.1	1.00	9.67	8.53	7.05	5.69	5.54	7.61	3.08	5.95	5.42	4.81	5.24
NOV	1.00	0.08	0.08	0.17	0.32	0.49	0.39	0.02	0.10	0.12	0.26	0.18
ORM1	1.00	12816.69	4375.20	1581.76	587.00	1377.92	3765.54	4802.10	4943.10	3366.19	2576.38	2470.99
PLD1	1.00	0.75	0.08	0.12	0.09	0.11	0.12	0.04	0.12	0.05	0.06	0.04
PSA	1.00	12.17	16.08	12.73	7.92	8.12	14.27	10.36	14.01	12.21	10.27	13.14
SLUG	1.00	268.77	166.04	86.01	30.23	36.56	98.34	112.06	134.56	113.34	69.55	85.38
STEAP4	1.00	3084.81	524.97	156.24	47.11	92.80	214.69	633.57	587.91	376.66	195.78	232.63
TMPRSS2	1.00	26.85	19.03	16.05	8.14	8.92	15.32	12.13	15.75	14.19	12.99	12.67

[0340]

실시예 12: F876L 안정한 전립선암 세포주에 있어서의 AR 표적 유전자의 N과 C 발현의 상호작용 및 상기 세포주의 증식

[0341]

AR 아미노 말단과 AR 카르복시 말단의 상호작용은 완전 AR 트랜스활성화능(transactivation capacity)에 중요하다. 다수의 AR 완전 및 부분 작용제는 AF2 의존성 N-C 상호작용을 촉진시킨다. N-C 투 하이브리드 상호작용 분석을 행하여, ARN-509 및 엔잘루타마이드의 존재 하에서의 F87L 돌연변이의 AR N-말단과 C-말단의 상호작용을 평가하였다.

[0342]

pCDNA3-AR 및 pCDNA3-F876L로부터의 적절한 PCR 산물을 pM 및 pVP16 (Clontech)으로 서브클로닝하여, pM-AR1-660, pVP16-AR507-919 및 pVP16-F876L507-919를 생성하였다. N-C 말단 상호작용 분석에서, 50 ng pM-AR1-660, 75 ng pVP16-AR507-919 또는 pVP16-F876L507-919, 25 ng pMH100-Luc 및 10 ng pRL (Promega)을 사용하여, 삼중 트랜스펙션을 행하였다. 트랜스펙션된 세포를 4시간 동안 인큐베이션한 다음에, 리간드로 처리하였다. ARN-509 및 엔잘루타마이드를 8 μM로, R1881을 1nM로 분석하였다.

[0343]

이들의 전사 활성화 일치하게, 엔잘루타마이드 및 ARN-509는 야생형 AR이 아니라, AR-F876L의 N-C 상호작용을 향상시켰다 (도 8). 따라서, AF-F876L에 대한 ARN-509 및 엔잘루타마이드의 작용제 활성은 작용제 유사 AF-2 임체구조와 관련되어 있다.

[0344]

실시예 13: AR의 크로마틴 면역침강 분석

[0345]

안드로겐 조절 AR 표적 유전자의 전사 활성화는 작용제 유도성 DNA 결합 및 전사 공조절인자(transcriptional coregulator)의 후속 동원을 요구한다. ARN-509 및 엔잘루타마이드가 AR-F876L DNA 결합을 촉진한다는 것을 나타내는 VP16-AR 리포터 결과를 확인하기 위해, 본 발명자들은 R1881 및/또는 각각의 길항제로 처리된 세포로부터

터의 6개의 AR 표적 유전자의 크로마틴 면역침강 (ChIP) 분석을 행하였다.

[0347]

ChIP 분석을 문헌 [Joseph et al. (2009) PNAS USA 106:12178-83]에 기재된 바와 같이 행하였다. 간략하게, LNCaP/AR(cs) 및 LNCaP SR αF876L 세포를 10% CSS를 보충한 RPMI 1640에서 3일간 150 mM 디쉬(7×10^6 개의 세포(20 mL))에 플레이팅하였다. 세포를 1 nM R1881의 존재 또는 부재 하에 10 μM 길항제로 4시간 동안 처리하였다. 리간드 처리 후에, 포름알데히드를 1%의 최종 농도로 배지에 첨가하고, 10분간 인큐베이션하여, 글리신 (125 mM 최종 농도)으로 5분간 켄칭(quenching)하였다. 세포를 1X 훌트™ 프로테아제 및 포스파타아제 일회용 억제제 칙테일(1X PI, Thermo Scientific)을 함유하는 PBS로 3회 세정하고, 펠릿화하여, 1 mL RIPA 완충액(50 mM 트리스 pH 7.5, 0.15 M NaCl, 1% NP-40, 0.5% Na-데옥시콜레이트, 0.05% SDS, 1 mM EDTA, 1X PI)에 용해시켜, 평균 DNA 크기 단편이 ≈ 500 bp가 될 때까지 초음파처리하였다. 초음파처리된 가교 크로마틴을 3.3 mL RIPA로 희석하여, mL당 200 mg의 초음파처리된 연어 정자 DNA 및 mL 당 500 mg의 BSA를 함유하는 100 mL 50% 단백질 A/G 아가로스 슬러리(SC-2003, Santa Cruz Biotechnology)로 사전에 깨끗하게 하였다. 그 다음에, 1 mL의 사전에 깨끗하게 한 크로마틴을 4°C에서 2시간 동안 15 μg 항 AR (SC-816, Santa Cruz Biotechnology) 또는 정상 래빗 IgG (SC-2027, Santa Cruz Biotechnology)로 면역침강시켜, 50% 단백질 A/G 아가로스 비드 슬러리 100 mL를 첨가하여, 4°C에서 하룻밤 동안 인큐베이션하였다. 비드를 순차적으로 저염 농도 완충액 (50 mM HEPES pH 7.8, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% 트리톤 X-100, 0.1% Na-데옥시콜레이트, 0.1% SDS), 고염 농도 완충액 (500 mM NaCl을 함유하는 저염과 동일함), LiCl 완충액(20 mM 트리스 pH 8.0, 1 mM EDTA, 250 mM LiCl, 0.5% NP-40, 0.5% Na-데옥시콜레이트), 및 TE 완충액(50 mM 트리스 pH 8.0, 1 mM EDTA)로 2회 세정하였다. 모든 세정 단계를 1X PI의 존재 하에 행하였다. 단백질-DNA 복합체를 65°C에서 2회 15분간 225 mL 용출 완충액 (50 mM 트리스 pH 8.0, 1 mM EDTA, 1% SDS)으로 용출시켰다. 용출된 단백질-DNA 복합체를 65°C에서 하룻밤 동안 NaCl의 존재 하에 역 가교시켜, 추가로 42°C에서 1시간 동안 EDTA 및 프로테이나아제 K로 처리하였다. DNA 단편을 QIAquick PCR 정제 키트(Qiagen)를 사용하여 10 mM 트리스 pH 8.5로 정제하고, 희석하여, ROX (Bio-Rad)를 함유한 iTaq SYBR 그린 수퍼믹스(Green Supermix)를 사용하여 실시간 PCR로 분석하였다. 샘플을 ABI 7900HT 인스트루먼트에서 증폭시켰다. 올리고뉴클레오티드 프라이머 서열은 표 8에 열거된다.

[0348]

[표 8]

ChIP 실시간 PCR 올리고뉴클레오티드 서열		
유전자	전방향 프라이머 서열	역방향 프라이머 서열
PSA E2	ACCTGCTCAGCCTTTGCTCTGAT (서열 번호 50)	AGATCCAGGCTTCTTACTGTCTT (서열 번호 51)
PSA D1	ATTCTGGTTGGGAGTGCAGGAA (서열 번호 52)	AGGAGACATGCCAGGATGAAACA (서열 번호 53)
STEAP4	ACTAGGCAGGACATTGACATCCCA (서열 번호 54)	ACAGTAAACCTCTCCACACATGGC (서열 번호 55)
FASN	TATGACACCCAGGGCTTCGTTCA (서열 번호 56)	TAACGTTCCCTGCGCGTTACAGA (서열 번호 57)
TMPRSS2	TCCCCAAATCCTGACCCCCA (서열 번호 58)	ACCAACACAGCCCCCTAGGAGA (서열 번호 59)
NKX3.1	ACAGGGTGGCCCAAATAGAAC (서열 번호 60)	CCTGTCTTGGACAAGCGGAGA (서열 번호 61)
ORM1	GGGTCAATTCCACCACCTCAAACA (서열 번호 62)	GGAGAAAAGGCCTTACAGTAGTCTC (서열 번호 63)

[0349]

LNCaP/AR(cs) 세포에서, R1881은 AR DNA를 촉진시켰다(도 9). VP16-AR 리포터 데이터와 일치하게, ARN-509 및 엔잘루타마이드는 AR DNA 결합 LNCaP/SR αF876L 세포를 촉진시켰다. R1881의 존재 하에, 모든 길항제는 R1881 자극성 AR DNA 결합을 2개의 세포주에서의 이들의 부분 작용제 또는 길항제 활성과 일치하는 레벨로 억제하였다 (추가 도면 S9).

[0351]

실시예 14: AR F876L의 생체 내 효과

[0352]

F876L 변경이 생체 내에서 엔잘루타마이드 및 ARN-509에 대한 내성을 부여하는지를 결정하기 위해, F876L AR을 안정하게 발현하는 LNCaP 세포주를 수립된 거세한 면역결핍 마우스 및 종양에 피하주사(s.c.)하였다.

[0353]

모든 동물 연구를 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committees)에 의해 승인된 프로토콜에 따라 행하였으며, 연구에서 인간의 적절한 동물 사용에 관한 운영 가이드라인을 따랐다. 생체 내에서의 이종 이식 실험을 SCID 무모 비근교계(SHO) 수컷 마우스(Charles River Laboratories)에서 행하였다. 마우스를 아이소플로란 마취 하에 거세하여, 회복하는데 7 내지 10일이 주어졌다. LNCaP/AR(cs) 또는 LNCaP/SR α

F876L 세포(상술한 바와 같음)를 50% RPMI, 50% 마트리젤 (BD Biosciences)에 혼탁시키고, 3×10^6 개의 세포/이종 이식을 $100 \mu\text{L}$ 의 용량으로 주사하였다. 동물을 종양 증식이 뚜렷해질 때까지 매주 관찰하였다. 주사 후 40 내지 60일 후에, 동물을 무작위로 동등한 전신 종양 조직량(tumor burden) 평균 ($150\text{--}250 \text{ mm}^3$) 및 범위의 코호트로 나누었다. 모든 화합물을 $30 \text{ mg/kg}/\text{일}$ 화합물의 투여량으로 경구 섭식에 의해 매일 투여하였다. 모든 LNCaP/AR(cs) 이종 이식 연구에서, ARN-509 및 엔잘루타마이드 약물 스톡을 18% PEG-400, 1% 트윈(Tween)-80 및 1% 포비돈에서 준비하여, 20 mM 시트레이트 완충액 (pH 4.0) 중의 15% 비타민 E-TPGS 및 65% 의 $0.5\% \text{ w/v}$ CMC 용액으로 투여하기 위해 제형화하였다. ARN-509 및 엔잘루타마이드 약물 동태를 상술한 바와 같이 연구 종료 시에 평가하였다(문헌[Clegg et al. (2012) *Cancer Research* 72:1494-503]).

- [0354] 시험관 내에서의 데이터와 일치하게, $30 \text{ mg/kg}/\text{일}$ 의 ARN-509도 엔잘루타마이드도 LNCaP/AR/SR αF876L 종양의 증식에 영향을 미치지 않았다(도 10). 이러한 활성 부족은 28일간 혈장 약물 레벨을 정량화한 바, 이전의 LNCaP/AR 이종 이식 연구와 일치하였기 때문에, 예상외로 낮은 화합물 노출과 함수 관계가 아니었다(표 9). 게다가, 병행 실험에서, ARN-509 $30 \text{ mg/kg}/\text{일}$ 은 이전의 결과와 일치하게, LNCaP/AR(cs) 모델에서 강력한 항종양 활성을 나타내었다(도 10).

[0355] [표 9]

LNCaP/SR αF876L 이종 이식 약물 동태

화합물	용량	C_{24} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	$T_{1/2}$ (hr)	AUC_{0-24} ($\mu\text{g} \cdot \text{hr}/\text{mL}$)	C_{\max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	T_{\max} (hr)
엔잘루타마이드	30 mg/kg	9.14	9.9	527.3	33.5	1.0
ARN-509	30 mg/kg	1.02	7.1	98.9	9.11	1.0

[0356]

실시예 15: 점진적 진행성 거세 저항성 전립선암 (CRPC)에 걸린 환자의 ARN-509의 오픈 라벨, 단계 1/2 안전성, 약물 동태, 및 개념 증명 연구

- [0358] 본 연구에서, DNA를 전립선암에 관한 단계 1/2 임상 연구 ARN-509 치료에 참여하는 환자의 29개의 환자 혈장 샘플로부터 단리하였다. 이들을 애멜전 PCR에 기초한 BEAMing 테크놀러지(Technology) 방법(문헌[Dressman et al. (2003) PNAS USA100:8817-22])을 이용하여 분석하였다. BEAMing은 인간 혈장으로부터 유래된 ctDNA의 PIKC3a 및 K-ras와 같은 드라이버 종양 유전자에서 다양한 종양 유래 돌연변이를 검출하는데 성공적으로 사용되어 왔다(문헌[Diehl et al. (2008) *Nature Medicine* 14:985-90]). AR F876L 돌연변이를 시험된 29개의 환자 샘플 중 3개에서 동정하였다.

- [0359] 행해진 임상 연구는 ARN-509의 안전성, 약물 동태 (PK) 및 항종양 효과의 예비적 증거를 측정하기 위한, 점진적 진행성 CRPC에 걸린 적격 환자에게 외래 환자로서 ARN-509를 경구 투여한 9개의 용량 레벨에 대한 복수 기관에 의한 인간 초회 투여(first in man)의 단계 1/2, 용량 증가 및 개념 증명 연구이었다.

- [0360] mCRPC에 걸린 환자를 표준 3×3 용량 증가 기준을 이용하여 용량 레벨 당 3 내지 6명의 환자로 된 코호트의 용량 레벨에 연속적으로 할당하였다.

- [0361] 목적은 환자 중 최대 30%에서 용량 제한 독성(DLT)에 이르는 ARN-509의 최대 내성 용량(MTD) 및/또는 추천 단계 2 용량(RP2D)을 측정하는 것이었다. DLT는 CTCAE V4.0에 의해 규정되고, ARN-509 치료와 관련된 것으로 평가되는 것으로, 일반적으로 등급 1 또는 고 빈도 발작, 등급 3-4 비혈액학적 독성 (GI 독성은 최대 약물 요법에도 불구하고 등급 3-4에서 지속되어야 함) 및/또는 등급 4, 5일 이상의 기간의 혈액학적 독성으로서 규정된다. 연구 설계의 개략도는 도 11에 주어진다.

- [0362] 사전 동의서에 서명한 적격 환자를 처음에 용량 증가 코호트에 등록하였으며, ARN-509의 단회 경구 투여 후에, 1주간 관찰 기간(PK주)을 가지게 될 것이다. 허용되지 않는 독성이 관찰되지 않은 것을 가정하여, 사이클 1의 제1 일에 지속 투여를 개시하였다.

- [0363] 각 용량 레벨에서 최소 3명의 대상을 사이클 1의 28일째에 DLT를 모니터링하였다. 각 용량 레벨에서 첫번째 3명의 환자에서 DLT가 관찰되지 않으면, 후속 등록을 다음 용량 레벨로 진행하였다. 2명 이상의 환자가 소정 용량 레벨에서 DLT를 경험하거나 임의의 등급의 1회의 발작이 소정 용량 레벨에서 관찰되면, 용량 증가를 중지하고, MTD를 이전의 용량 레벨로서 규정하였다. DLT가 관찰되지 않으면, RP2D를 ARN-509의 전체 약물 동태 및 안전성 프로파일에 기초하여, 최적 생물학적 용량을 전임상 데이터로부터 결정하였는데, 반드시 MTD라고 할 수 없다.

- [0364] 개시 용량은 $30 \text{ mg}/\text{일}$ 이며, 매일 60 mg , 90 mg , 120 mg , 180 mg , 240 mg , 300 mg , 390 mg , 및 480 mg 으로 증가

되었다. 이들 용량 레벨이 예상된 약리학적 활성 용량 범위에 걸치며, 전임상 독성 결과에 의해 나타낸 안전역 (safety margin) 내에 있는 것으로 예상되었다.

[0365] RP2D로서 240 mg을 선택한 후에, 추가의 적격 환자를 MTD 및/또는 RP2D에서 3개의 동시 확장 코호트로 구성되는 연구의 단계 2 부분에 등록하여, 추가의 안전성 정보를 모으고 항종양 활성의 초기 신호를 제공하였다. 3개의 확장 코호트는 하기를 포함하였다:

1. 비전이성 CRPC 미치료 (화학요법 및 아비라테론 치료를 받지 않은 비전이성 CRPC에 걸린 50명의 환자);

2. 전이성 CRPC 미치료 (화학요법 및 아비라테론 치료를 받지 않은 mCRPC에 걸린 20명의 환자); 및

3. 전이성 CRPC 아비라테론 치료 (10 내지 20명의 환자).

mCRPC에 걸린 각 환자가 적어도 3회 사이클(12주)의 지속적인 치료를 받으며, 비전이성 CRPC에 걸린 각 환자가 적어도 4회 사이클 (16주)의 지속적인 치료를 받을 것으로 예상되었다. 프로토콜에 의해 규정된 질환 진행 또는 허용되지 않는 독성에 관해서는 언제든지 치료를 중지하였다. 종양 평가를 mCRPC에 걸린 환자에게 3회 사이클마다(12주), 비전이성 CRPC에 걸린 환자에게 4회 사이클마다(16주) 행하였다. 안전성을 초기 투여로부터 최종 투여 후의 적어도 4주까지 또는 약물 관련 독성의 분해시까지, 또는 독성이 비가역적으로 간주될 때까지 종에서 어느 쪽이든 긴 것으로부터 평가하였다. 심실 재분극에 대한 ARN-509의 효과 및 ARN-509의 흡수에 대한 음식물의 효과를 선택된 임상 부위에서 단계 2의 확장 단계에서 평가하였다.

[0370] 현 ARN-509 임상 연구에 BEAMing 기술을 이용한 샘플의 분석이 아이노스틱스 게엠베하(Inostics GMBH)에 의해 행해졌다. 혈액을 K2-EDTA 진공관에 채취하여, 수회 천천히 반전시켜 완전히 혼합하였다. 30분 이내에, 채혈관을 15분간 2000 x g으로 회전시켰다. 혈장을 디캔테이션하여, 냉동 보관 튜브에 옮겼다. 디캔테이션 90분 이내에, 혈장을 분석시까지 -70°C 이하로 보관하였다. 문헌[Diehl et al. (2008) *Nature medicine* 14:985-90]에 기재된 바와 같이, 300 내지 500 μl 혈장 분취량으로부터 DNA를 정제하여 추출하였다. 돌연변이 검출을 상기 문헌(Diehl 등)에 기재된 바와 같이 BEAMing 기술에 따라 행하였다. 간략하게, 초기 PCR 단계에서, 표적 영역 (~100 bp)을 tag 서열을 갖는 유전자 특이적 프라이머를 이용하여 증폭시켜, 프라이머로 코팅된 자기 비드를 포함하는 에멀젼 PCR로 처리하였다. 에멀젼 PCR 후에, 야생형 및 돌연변이 비드의 식별을 대립유전자 특이적 혼성화에 이어서, 유속 세포 분석법에 의해 행하였다. 유속 세포 분석법 결과를 FCS 익스프레스(Express; De Novo Software, Los Angeles, CA)를 이용하여 분석하여, 야생형 대립유전자에 대한 돌연변이 대립유전자의 비를 정량화하였다.

[0371] 샘플을 야생형 AR 또는 3개의 단일 점 돌연변이 대립유전자의 존재에 대하여 분석한 바, F876L (서열 번호 18에 기재된 서열을 암호화하는 AR 핵산과 관련하여, 각각 t2988c, c2990a, 및 c2990g (또는 t2626c, c2628a, 및 c2928g)을 발생시켰다. 분석된 돌연변이 및 BEAMing 방법의 기술 감도는 표 10에 나타낸다. 검출을 위해, 빈도는 분석 당 사용된 게놈 등가물의 총량을 초과해야 한다. 예를 들어, 샘플에 1,000개의 게놈 등가물이 존재하지만, 계산된 돌연변이 DNA 문자의 분율이 0.02% (5,000개의 야생형 대립유전자 중 1개의 돌연변이 대립유전자)인 경우에, 샘플은 야생형으로서 스코어된다.

[0372] [표 10]

BEAMing 분석에 의해 모니터링된 AR 뉴클레오티드 변화			
뉴클레오티드 위치	뉴클레오티드 변화	아미노산 위치	아미노산 변화
c.2626	t > c	876	F>L
c.2628	c > a	876	F>L
c.2628	c > g	876	F>L

[0373]

결과

[0375] 모든 용량군에 걸친 환자의 일부는 베이스라인과 비교하여, PSA의 12주 ≥ 50% 감소를 나타내는 14/30 환자와 PSA 반응을 나타내었다. 스크리닝한 29명의 환자에 대한 PSA 반응은 도 12에 나타낸다. 치료 전 및 치료 중의 혈장 샘플을 분석하였다. BEAMing 분석 시간은 PSA 반응 라인의 종점으로 표시된다. 29명 환자 중 18명은 분석 시에 베이스라인을 초과하는 PSA를 가졌는데, 이는 ARN-509에 대하여 내인성 또는 획득 내성을 나타낸다.

[0376] 3개의 프로브를 설계하여, F876L 아미노산 치환을 암호화할 수 있는 3개의 뉴클레오티드 변화를 모니터링하였다. 돌연변이 서열 및 야생형 DNA를 이용한 희석 혼합 실험은 0.02%의 기술 감도(5000개의 야생형 중에서 1개의 돌연변이 서열을 검출할 가능성)를 나타내었다. 29명의 ARN-509로 치료된 환자의 혈장 샘플의 초

기 스크리닝에서, 돌연변이 증거가 3명의 환자에서 검출되었다(표 11 및 12). BEAMing 분석 시에, 환자 7 및 10은 PSA 레벨이 베이스라인을 초과하였지만, 환자 13은 PSA가 최저 치료 상태(treatment nadir)를 넘어서 상승하는 증거를 나타낸다(도 13). 모든 3명의 환자에서, 뉴클레오티드 변화 c2628a를 검출하였다. 이들 3명 중 1명의 환자(환자 10)에서, t2626c 돌연변이도 검출되었는데, 다클론성 질환을 나타낸다. F876L 암호화 돌연변이는 치료전 샘플(0/29)에서 검출되지 않았는데, 이는 ARN-509 치료 전에 존재한다면, 검출 한계 미만으로 존재하거나 돌연변이가 ARN-509 치료 중에 새로 발생했다는 것을 시사한다. 어느 하나의 시나리오에서, 데이터는 ctDNA에서 검출하기에 충분한 레벨로 돌연변이 대립유전자를 갖는 병변의 선택적 성장이 ARN-509로의 만성 노출에 의존하며, PSA 상승과 관련되어 있다는 가설을 지지한다. F876L과 진행성 질환과의 관련성을 더욱 확립하기 위해, 본 발명자들은 초기 스크리닝 시에 양성으로 스코어링된 3명의 환자로부터 추가의 시점에서 취한 혈장 샘플을 분석하였다(표 12). 환자 10에서, 돌연변이는 분석된 1개의 다른 시점에서 검출되지 않았다(사이클 4; PSA T0의 102%). 환자 13에서, 돌연변이는 사이클 4 (PSA 베이스라인의 16.2%) 또는 사이클 12에서 검출되지 않았다(환자는 사이클 11에서 양성으로 스코어링되었다). 사이클 11에서의 돌연변이 서열은 검출 한계에 도달하였으며, 단일 돌연변이 문자의 증폭을 통해 발생하는 것으로 평가된다. 환자 13의 PSA가 사이클 11 및 12에서의 최저 치료 상태로부터 서서히 상승하지만, 두 시점에서 PSA는 여전히 연구 개시의 >60% 미만이므로, 노골적인 내성이 아직 나타나지 않았다. 검출 한계에서의 돌연변이 서열의 동정은 아마도 지속적인 선택압 하에 확장될 가능성이 있으며, 결국 진행성 질환에 이르게 하는 비교적 드문 돌연변이 클론의 존재를 반영한다.

[0377]

환자 7의 비교적 긴 치료 기간을 고려하면, 뚜렷한 PSA 감소 시에 추가의 시점으로부터의 혈장; (베이스라인으로부터 > 90% 감소; 사이클 4, 8 및 10) 및 이의 최저 상태로부터 초기 PSA 상승 시의 혈장(사이클 15 및 19) (도 13)을 분석하였다. 흥미롭게도, 돌연변이는 치료 사이클 4, 8 및 10로부터의 3개의 샘플에서 검출되지 않은 반면에, c2628a 돌연변이는 초기 PSA 상승(사이클 15 및 19)으로부터 분석된 2개의 샘플에서 검출되었다. 이러한 임상 데이터는 전임상 데이터와 일치하는데, 이는 F876L 아미노산 변화가 ARN-509에 대한 내성을 부여하는데 충분하다는 것을 나타낸다.

[0378]

[표 11]

F876L 양성 환자로부터의 BEAMing 결과

환자	치료 사이클*	PSA [0 일제의 %]	유전자형 결정(Genotypic Call)	돌연변이 빈도 [돌연변이/w.t. 비드 x 100]		
				c2990a	c2990g	t2988c
7	0	100	야생형	-	-	-
7	4	1.4	야생형	-	-	-
7	8	3.3	야생형	-	-	-
7	10	5.6	야생형	-	-	-
7	15	41.2	돌연변이	0.162	-	-
7	19	97.2	돌연변이	5.005	-	-
7	22	281.0	돌연변이	1.002	-	-
10	0	100	야생형	-	-	-
10	4	102	야생형	-	-	-
10	7	245	돌연변이	0.051	-	0.12
13	0	100	야생형	-	-	-
13	4	16.2	야생형	-	-	-
13	11	31.7	돌연변이	0.065	-	-
13	12	39.5	야생형	-	-	-

*치료 사이클은 4 주간이었음; 사이클 0은 치료전 시점임.

[0379]

[0380]

[표 12]

ARN-509-001 환자의 일차 F876L BEAMing

환자	12 주 PSA 반응	BEAMing 분석 치료 사이클*	BEAMing 분석 시의 PSA [베이스라인의 %]	베이스라인 유전자형 결정 [#]	치료 중의 유전자형 결정
1	30.49	19	195.4	w.t.	w.t.
2	-61.8	10	337.08	w.t.	w.t.
3	22.7	4	122	w.t.	w.t.
4	12.4	5	134	w.t.	w.t.
5	-70.65	8	16	w.t.	w.t.
6	-90.02	10	84.6	w.t.	w.t.
7	-98.6	22	281	w.t.	돌연변이
8	-62.2	16	10.2	w.t.	w.t.
9	26.38	7	185	w.t.	w.t.
10	2.33	7	245	w.t.	돌연변이
11	-49.76	8	143.88	w.t.	w.t.
12	-56.65	7	99.47	w.t.	w.t.
13	-83.79	11	31.7	w.t.	돌연변이
14	-43.21	11	150.5	w.t.	w.t.
15	164.14	3	220	w.t.	w.t.
16	89.09	4	189	w.t.	w.t.
17	-45.86	4	54.14	w.t.	w.t.
18	-95.65	6	7.34	w.t.	w.t.
19	-71.19	11	196.86	w.t.	w.t.
20	-30.88	21	89.3	w.t.	w.t.
21	-74.43	10	46.91	w.t.	w.t.
22	-82.7	25	0.19	w.t.	w.t.
23	97.78	8	222.46	w.t.	w.t.
24	-74.86	25	4.89	w.t.	w.t.
25	-30.07	12	161	w.t.	w.t.
26	96.51	5	214.85	w.t.	w.t.
27	-0.89	13	20.69	w.t.	w.t.
28	-33.59	10	126	w.t.	w.t.
29	-58.44	13	105	w.t.	w.t.

[0381]

실시예 16: 약물 스크리닝용 세포주의 생성 방법

[0382]

안드로겐 수용체의 F876L 돌연변이와 관련하여 AR 길항제 활성을 보유하는 화합물을 동정하기 위해, 상술한 바와 같은 다수의 시험관 내 및 생체 내에서의 분석을 채택한다.

[0383]

시험관 내 세팅에서, 실시예 8에 기재된 것과 유사한 일시적 트랜스펙션 전사 분석을 이용하여, 작용제 활성이 없고, 야생형 및 F876L 돌연변이 AR 전사 활성에 완전히 길항하는 화합물을 동정한다. AR 전사 활성이 모니터링될 수 있는 HEPG2 세포 또는 진핵 세포를 본 스크리닝에 사용한다.

[0384]

일시적 트랜스펙션의 대안으로서, 전사 리포터 및 F876L AR이 다수의 세포주에 안정하게 통합되어, 화합물을 스크리닝하는데 사용된다. 플라스미드 (즉, pCDNA3.1)의 사용을 통한 돌연변이 F876L AR의 안드로겐 감수성 전립선암 세포주, 예컨대 LNCaP, LaPC4 또는 VCaP로의 안정한 통합 또는 바이러스에 기초한 통합(viral based integration)에 의해, 전사, 증식 및 이종 이식 세팅에 있어서의 화합물의 스크리닝 및 평가를 할 수 있다. 간략하게, F876L AR은 레트로바이러스 발현 벡터, 예컨대 pQXIP (Clontech, Mountain View, CA)로 클로닝된다. 그 다음에, 생성된 플라스미드를 사용하여, 제조업자의 프로토콜에 따라, 안정하게 형질전환된 세포주의 생성에 사용되는 고역가 바이러스 스톡을 생성한다. 생성된 세포주는 실시예 4에 기재된 일시적 트랜스펙션 전사 분석, 실시예 5에 기재된 내인성 유전자 전사 분석, 실시예 3에 기재된 증식 분석 또는 실시예 1에 기재된 이종 이식 연구에 사용된다.

[0385]

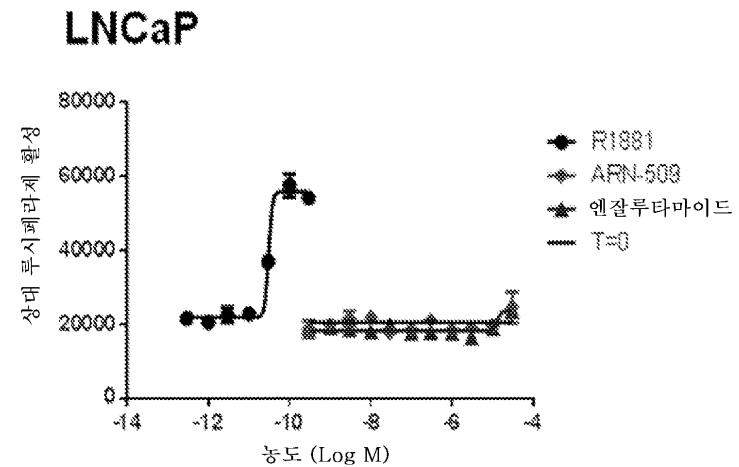
대안적으로, 세포는 AR 반응성 리포터, 예컨대 Cignal Lenti AR 리포터(Qiagen, Valencia, CA)의 안정한 통합에 의해 더욱 변형되어, 일시적 트랜스펙션 필요 없이 리포터에 기초한 화합물 스크리닝을 행할 수 있다.

[0386]

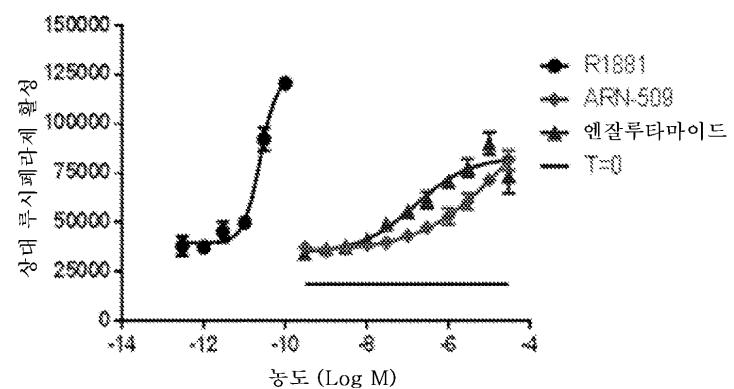
본 명세서에 기재된 실시예 및 실시 형태는 다만 예시를 목적으로 하며, 당업자에게 제안된 다양한 변형 또는 변경이 본원의 사상 및 범위, 및 첨부된 특허청구범위의 범주 내에 포함될 것이다.

도면

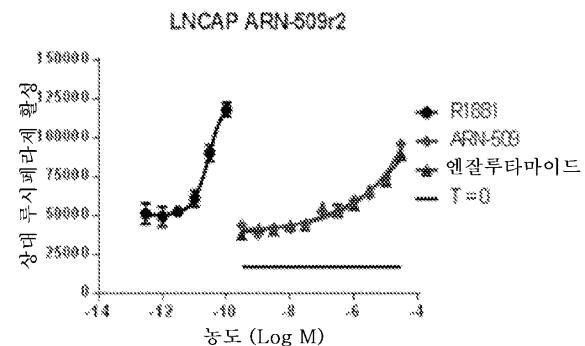
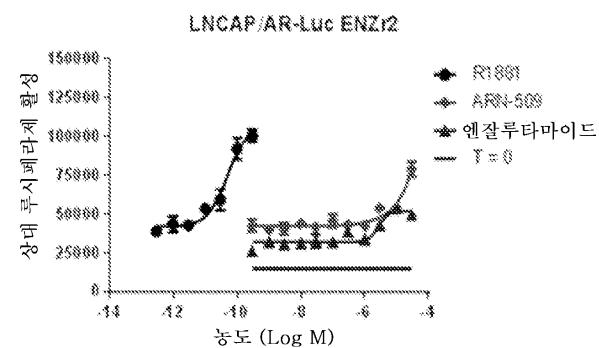
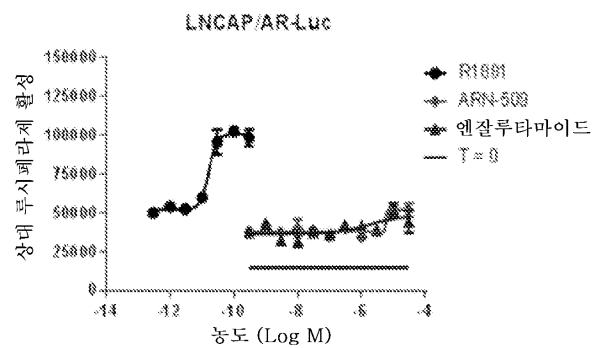
도면 1a



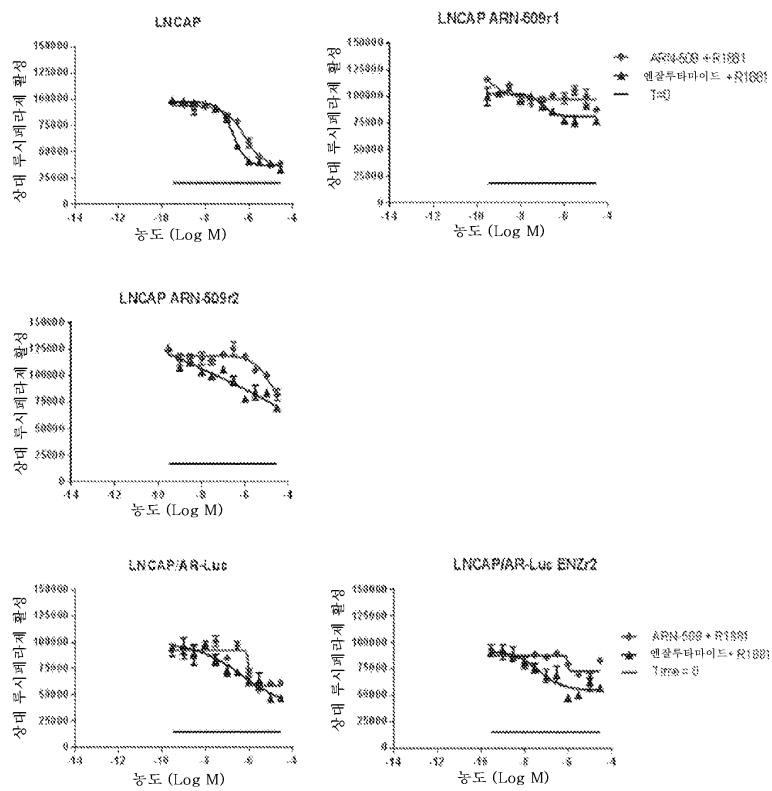
LNCaP ARN-509r1



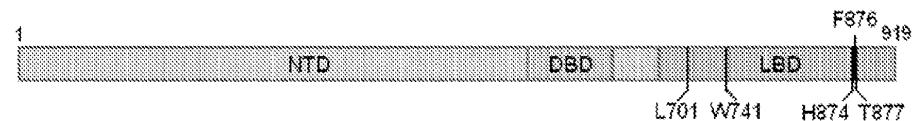
도면 1b



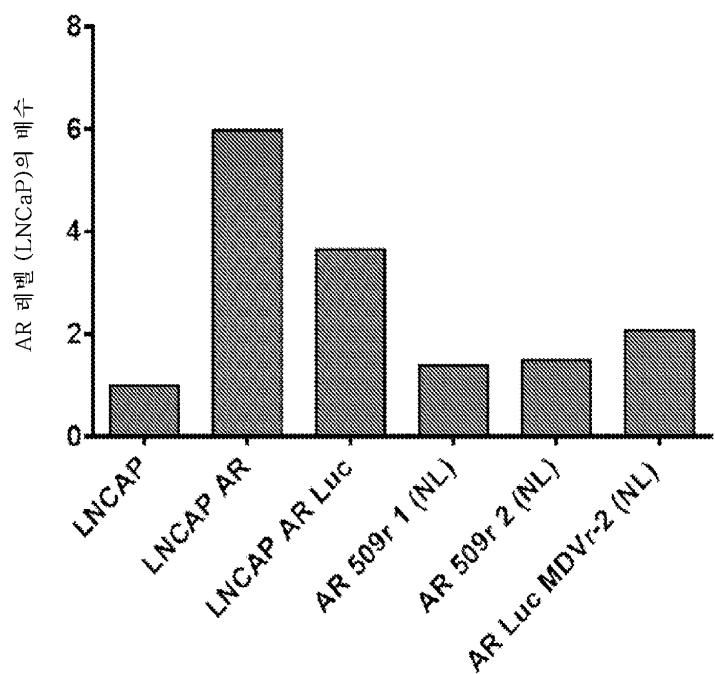
도면 1c



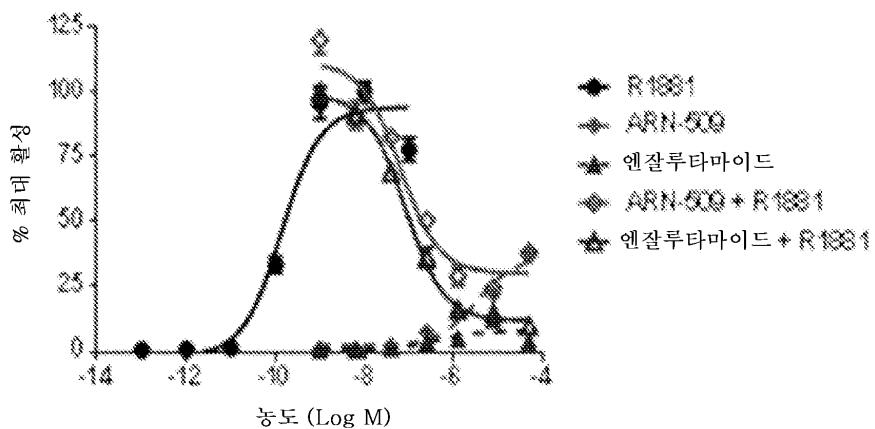
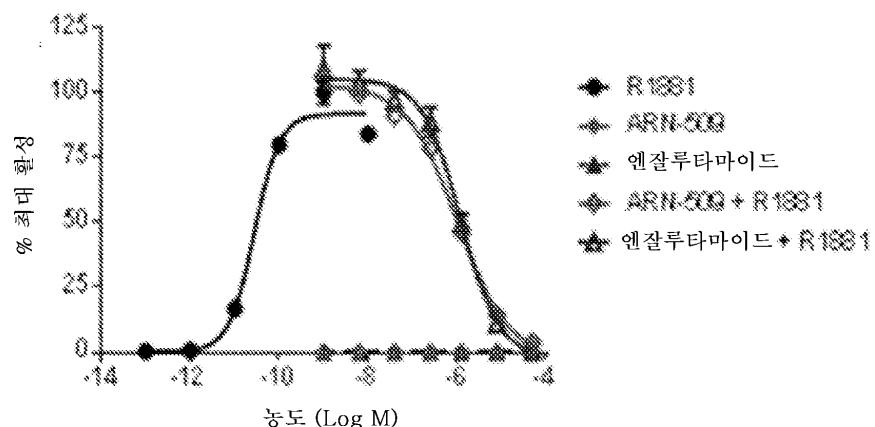
도면 1d



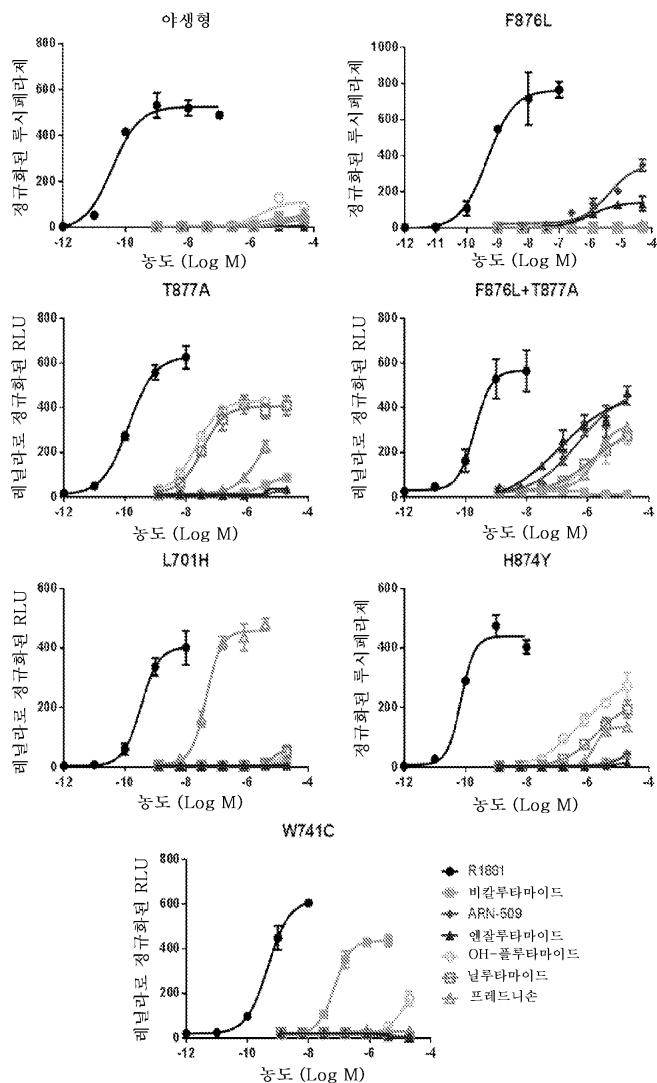
도면2



도면3a

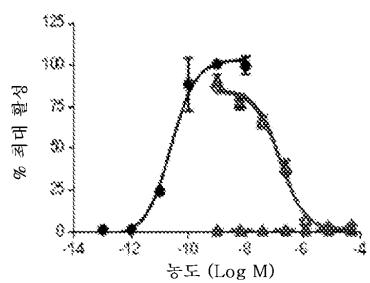


도면3b

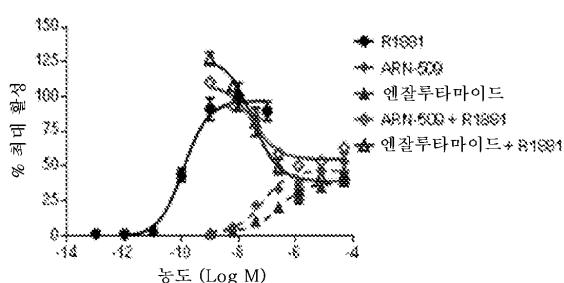


도면4

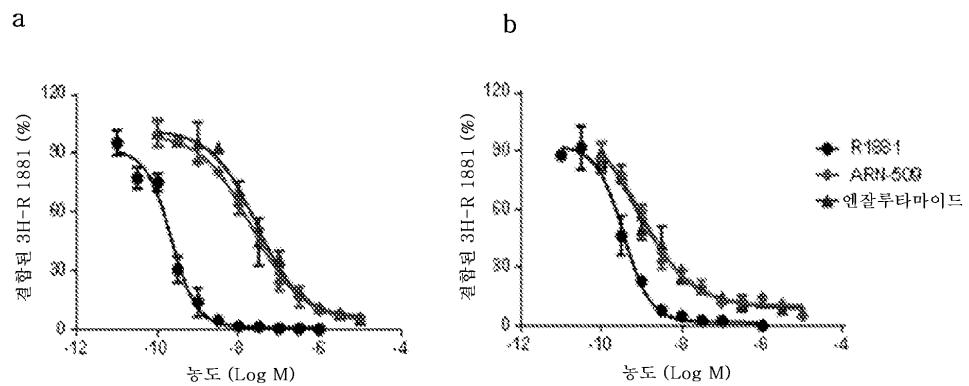
a



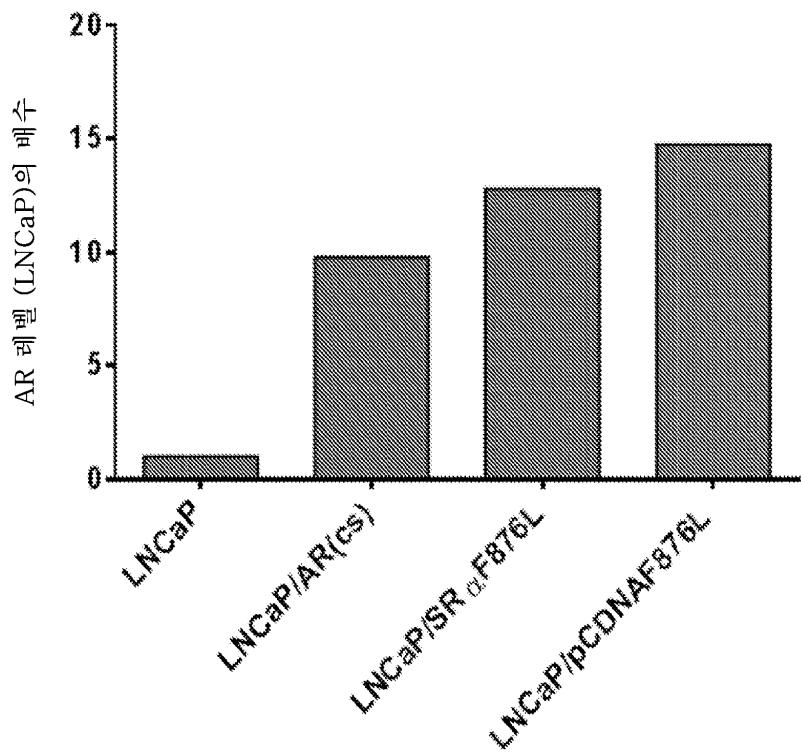
b



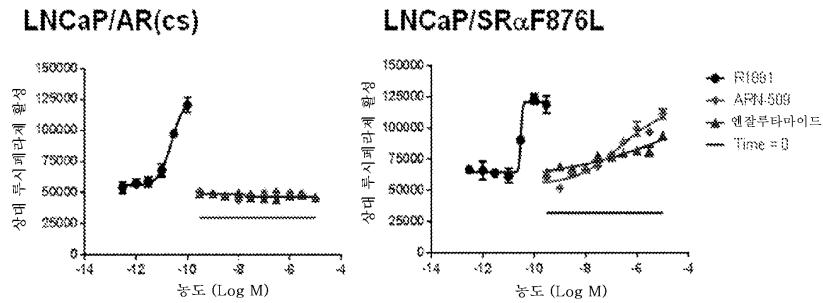
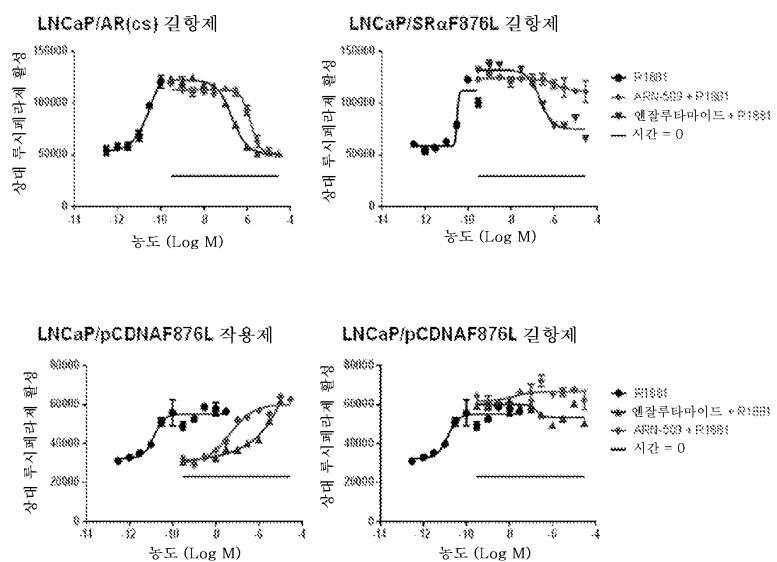
도면5



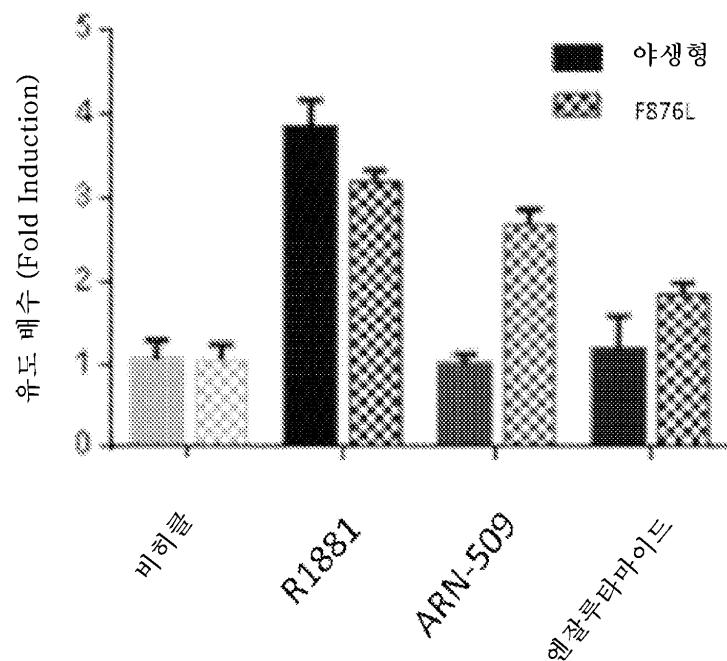
도면6



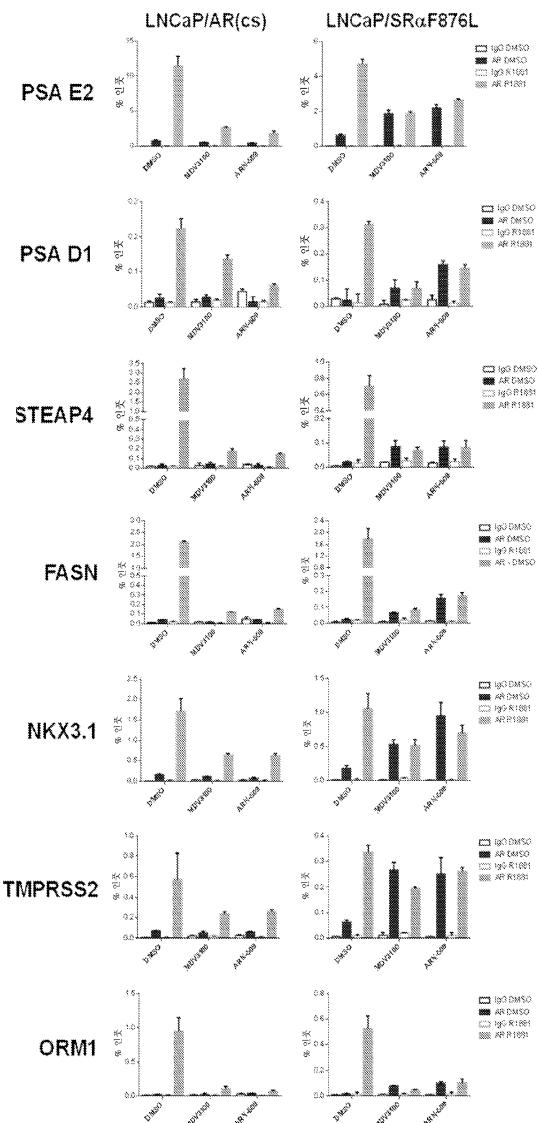
도면7

a**b**

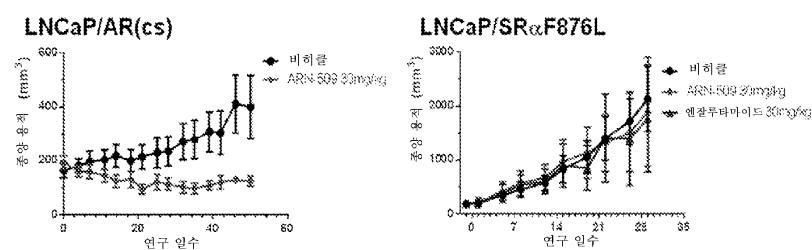
도면8



도면9

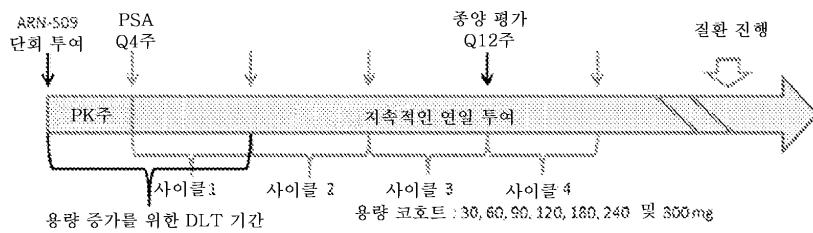


도면10

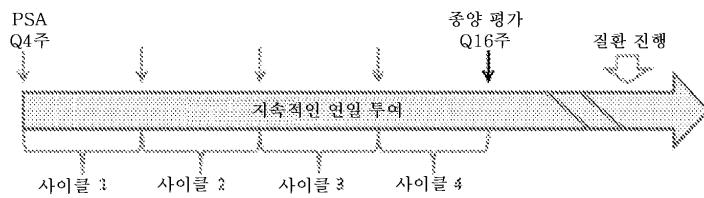


도면11

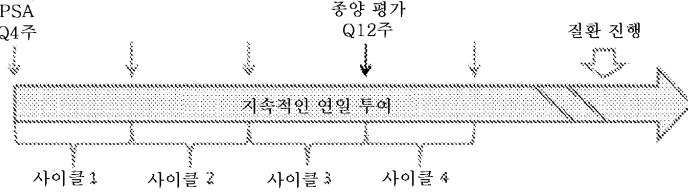
용량 증가 코호트: 전이성 CRPC



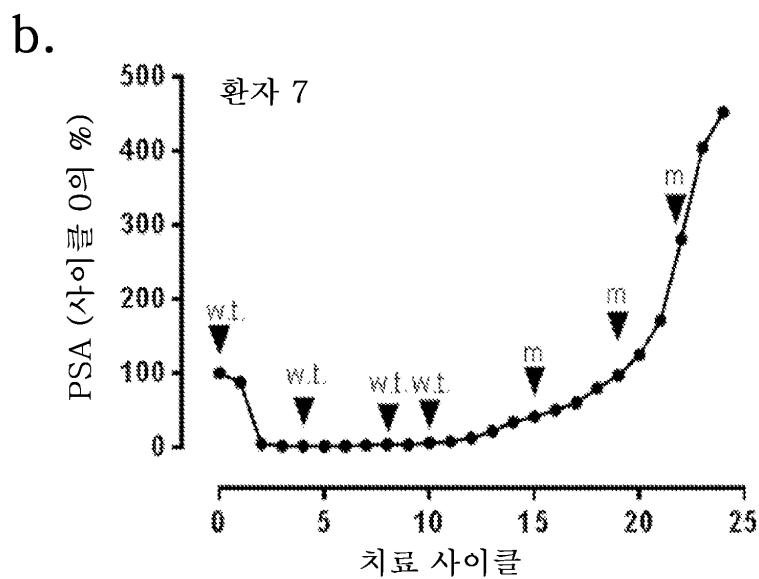
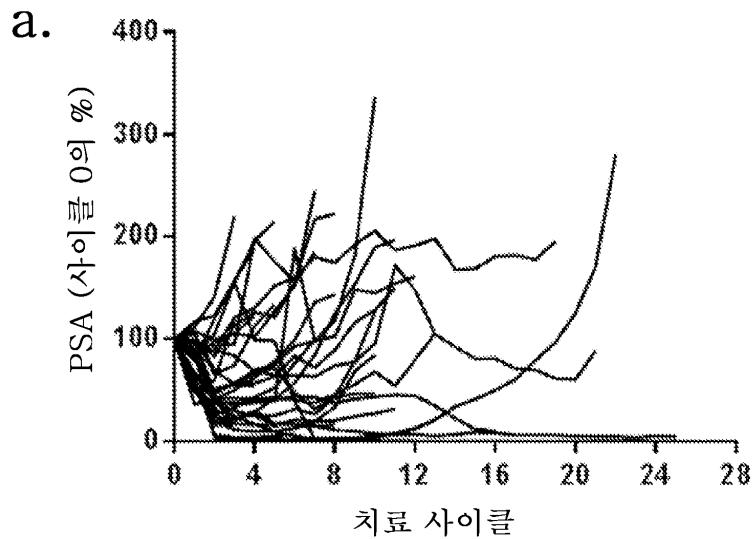
확장 코호트: 비전이성 CRPC



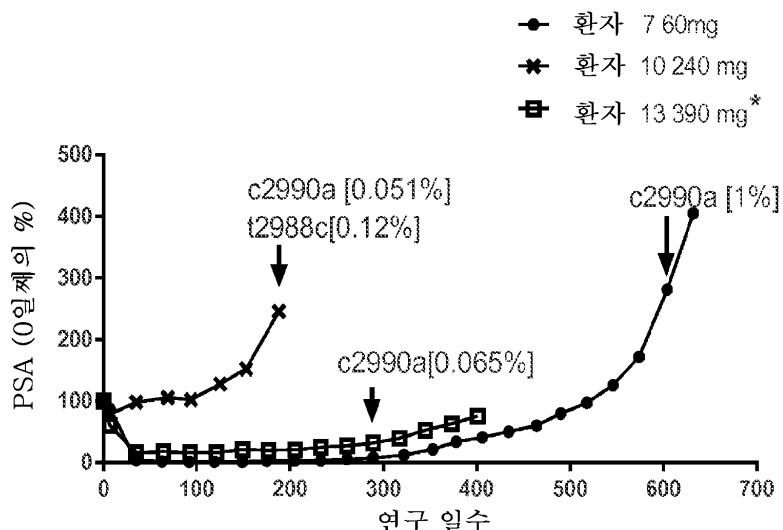
확장 코호트: 전이성 CRPC



도면12



도면13



* 2개의 사이클 후에 240 mg으로 전환됨

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Aragon Pharmaceuticals, Inc.

Joseph, James David

Hager, Jeffrey H.

Sensintaffar, John Lee

Lu, Nhin

Qian, Jing

Smith, Nicholas D.

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR DETERMINING RESISTANCE TO ANDROGEN

RECEPTOR THERAPY

<130> 38937-725.601

<150> 61/676,842

<151> 2012-07-27

<150> 61/783,763

<151> 2013-03-14

<150> 61/829,123

<151> 2013-05-30

<160> 63

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 919

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Glu Val Gln Leu Gly Leu Gly Arg Val Tyr Pro Arg Pro Pro Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Ile Gln Asn Pro Gly Pro Arg His Pro Glu Ala Ala Ser Ala Ala

35 40 45

Pro Pro Gly Ala Ser Leu Leu Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln

50 55 60

Gln Glu Thr

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Cys Val Pro Glu Pro Gly Ala Ala Val Ala Ala Ser Lys Gly Leu Pro

130 135 140

Gln Gln Leu Pro Ala Pro Pro Asp Glu Asp Asp Ser Ala Ala Pro Ser

145 150 155 160

Thr Leu Ser Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro Gly Leu Ser Ser Cys Ser

165 170 175

Ala Asp Leu Lys Asp Ile Leu Ser Glu Ala Ser Thr Met Gln Leu Leu

180 185 190

Gln Gln Gln Gln Gln Glu Ala Val Ser Glu Gly Ser Ser Ser Gly Arg

195 200 205

Ala Arg Glu Ala Ser Gly Ala Pro Thr Ser Ser Lys Asp Asn Tyr Leu
 210 215 220
 Gly Gly Thr Ser Thr Ile Ser Asp Asn Ala Lys Glu Leu Cys Lys Ala
 225 230 235 240
 Val Ser Val Ser Met Gly Leu Gly Val Glu Ala Leu Glu His Leu Ser
 245 250 255
 Pro Gly Glu Gln Leu Arg Gly Asp Cys Met Tyr Ala Pro Leu Leu Gly
 260 265 270
 Val Pro Pro Ala Val Arg Pro Thr Pro Cys Ala Pro Leu Ala Glu Cys
 275 280 285
 Lys Gly Ser Leu Leu Asp Asp Ser Ala Gly Lys Ser Thr Glu Asp Thr
 290 295 300
 Ala Glu Tyr Ser Pro Phe Lys Gly Gly Tyr Thr Lys Gly Leu Glu Gly
 305 310 315 320
 Glu Ser Leu Gly Cys Ser Gly Ser Ala Ala Ala Gly Ser Ser Gly Thr
 325 330 335
 Leu Glu Leu Pro Ser Thr Leu Ser Leu Tyr Lys Ser Gly Ala Leu Asp
 340 345 350
 Glu Ala Ala Ala Tyr Gln Ser Arg Asp Tyr Tyr Asn Phe Pro Leu Ala
 355 360 365
 Leu Ala Gly Pro Pro Pro Pro Pro His Pro His Ala Arg
 370 375 380
 Ile Lys Leu Glu Asn Pro Leu Asp Tyr Gly Ser Ala Trp Ala Ala Ala
 385 390 395 400
 Ala Ala Gln Cys Arg Tyr Gly Asp Leu Ala Ser Leu His Gly Ala Gly
 405 410 415
 Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Ser Pro Ser Ala Ala Ala Ser Ser Ser
 420 425 430
 Trp His Thr Leu Phe Thr Ala Glu Glu Gly Gln Leu Tyr Gly Pro Cys
 435 440 445
 Gly Gly

450	455	460
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Glu Ala Gly Ala Val Ala Pro Tyr		
465	470	475
Gly Tyr Thr Arg Pro Pro Gln Gly Leu Ala Gly Gln Glu Ser Asp Phe		
485	490	495
Thr Ala Pro Asp Val Trp Tyr Pro Gly Gly Met Val Ser Arg Val Pro		
500	505	510
Tyr Pro Ser Pro Thr Cys Val Lys Ser Glu Met Gly Pro Trp Met Asp		
515	520	525
Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Gly Asp Met Arg Leu Glu Thr Ala Arg Asp		
530	535	540
His Val Leu Pro Ile Asp Tyr Tyr Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys Leu		
545	550	555
Ile Cys Gly Asp Glu Ala Ser Gly Cys His Tyr Gly Ala Leu Thr Cys		
565	570	575
Gly Ser Cys Lys Val Phe Phe Lys Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln Lys		
580	585	590
Tyr Leu Cys Ala Ser Arg Asn Asp Cys Thr Ile Asp Lys Phe Arg Arg		
595	600	605
Lys Asn Cys Pro Ser Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Ala Gly Met		
610	615	620
Thr Leu Gly Ala Arg Lys Leu Lys Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu Gln		
625	630	635
Glu Glu Gly Glu Ala Ser Ser Thr Thr Ser Pro Thr Glu Glu Thr Thr		
645	650	655
Gln Lys Leu Thr Val Ser His Ile Glu Gly Tyr Glu Cys Gln Pro Ile		
660	665	670
Phe Leu Asn Val Leu Glu Ala Ile Glu Pro Gly Val Val Cys Ala Gly		
675	680	685
His Asp Asn Asn Gln Pro Asp Ser Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu		
690	695	700

Asn Glu Leu Gly Glu Arg Gln Leu Val His Val Val Lys Trp Ala Lys
 705 710 715 720
 Ala Leu Pro Gly Phe Arg Asn Leu His Val Asp Asp Gln Met Ala Val
 725 730 735
 Ile Gln Tyr Ser Trp Met Gly Leu Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg
 740 745 750
 Ser Phe Thr Asn Val Asn Ser Arg Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp Leu

 755 760 765
 Val Phe Asn Glu Tyr Arg Met His Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys
 770 775 780
 Val Arg Met Arg His Leu Ser Gln Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr
 785 790 795 800
 Pro Gln Glu Phe Leu Cys Met Lys Ala Leu Leu Phe Ser Ile Ile
 805 810 815
 Pro Val Asp Gly Leu Lys Asn Gln Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met

 820 825 830
 Asn Tyr Ile Lys Glu Leu Asp Arg Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn
 835 840 845
 Pro Thr Ser Cys Ser Arg Arg Phe Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp
 850 855 860
 Ser Val Gln Pro Ile Ala Arg Glu Leu His Gln Phe Thr Phe Asp Leu
 865 870 875 880
 Leu Ile Lys Ser His Met Val Ser Val Asp Phe Pro Glu Met Met Ala

 885 890 895
 Glu Ile Ile Ser Val Gln Val Pro Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val Lys
 900 905 910
 Pro Ile Tyr Phe His Thr Gln
 915
 <210> 2
 <211> 920
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

Met Glu Val Gln Leu Gly Leu Gly Arg Val Tyr Pro Arg Pro Pro Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Ile Gln Asn Pro Gly Pro Arg His Pro Glu Ala Ala Ser Ala Ala

35 40 45

Pro Pro Gly Ala Ser Leu Leu Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln

50 55 60

Gln Gln

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

Arg Gly Cys Val Pro Glu Pro Gly Ala Ala Val Ala Ala Ser Lys Gly

130 135 140

Leu Pro Gln Gln Leu Pro Ala Pro Pro Asp Glu Asp Asp Ser Ala Ala

145 150 155 160

Pro Ser Thr Leu Ser Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro Gly Leu Ser Ser

165 170 175

Cys Ser Ala Asp Leu Lys Asp Ile Leu Ser Glu Ala Ser Thr Met Gln

180 185 190

Leu Leu Gln Gln Gln Gln Glu Ala Val Ser Glu Gly Ser Ser Ser

195 200 205

Gly Arg Ala Arg Glu Ala Ser Gly Ala Pro Thr Ser Ser Lys Asp Asn

210 215 220

Tyr Leu Gly Gly Thr Ser Thr Ile Ser Asp Asn Ala Lys Glu Leu Cys

225 230 235 240

Lys Ala Val Ser Val Ser Met Gly Leu Gly Val Glu Ala Leu Glu His
 245 250 255
 Leu Ser Pro Gly Glu Gln Leu Arg Gly Asp Cys Met Tyr Ala Pro Leu
 260 265 270
 Leu Gly Val Pro Pro Ala Val Arg Pro Thr Pro Cys Ala Pro Leu Ala
 275 280 285
 Glu Cys Lys Gly Ser Leu Leu Asp Asp Ser Ala Gly Lys Ser Thr Glu
 290 295 300
 Asp Thr Ala Glu Tyr Ser Pro Phe Lys Gly Gly Tyr Thr Lys Gly Leu
 305 310 315 320
 Glu Gly Glu Ser Leu Gly Cys Ser Gly Ser Ala Ala Ala Gly Ser Ser
 325 330 335
 Gly Thr Leu Glu Leu Pro Ser Thr Leu Ser Leu Tyr Lys Ser Gly Ala
 340 345 350
 Leu Asp Glu Ala Ala Ala Tyr Gln Ser Arg Asp Tyr Tyr Asn Phe Pro
 355 360 365
 Leu Ala Leu Ala Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Pro His
 370 375 380
 Ala Arg Ile Lys Leu Glu Asn Pro Leu Asp Tyr Gly Ser Ala Trp Ala
 385 390 395 400
 Ala Ala Ala Ala Gln Cys Arg Tyr Gly Asp Leu Ala Ser Leu His Gly
 405 410 415
 Ala Gly Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Ser Pro Ser Ala Ala Ala Ser
 420 425 430
 Ser Ser Trp His Thr Leu Phe Thr Ala Glu Glu Gly Gln Leu Tyr Gly
 435 440 445
 Pro Cys Gly
 450 455 460
 Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Glu Ala Gly Ala Val Ala Pro
 465 470 475 480
 Tyr Gly Tyr Thr Arg Pro Pro Gln Gly Leu Ala Gly Gln Glu Ser Asp

485	490	495
Phe Thr Ala Pro Asp Val Trp Tyr Pro Gly Gly Met Val Ser Arg Val		
500	505	510
Pro Tyr Pro Ser Pro Thr Cys Val Lys Ser Glu Met Gly Pro Trp Met		
515	520	525
Asp Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Gly Asp Met Arg Leu Glu Thr Ala Arg		
530	535	540
Asp His Val Leu Pro Ile Asp Tyr Tyr Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys		
545	550	555
Leu Ile Cys Gly Asp Glu Ala Ser Gly Cys His Tyr Gly Ala Leu Thr		
565	570	575
Cys Gly Ser Cys Lys Val Phe Phe Lys Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln		
580	585	590
Lys Tyr Leu Cys Ala Ser Arg Asn Asp Cys Thr Ile Asp Lys Phe Arg		
595	600	605
Arg Lys Asn Cys Pro Ser Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Ala Gly		
610	615	620
Met Thr Leu Gly Ala Arg Lys Leu Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu		
625	630	635
Gln Glu Glu Gly Glu Ala Ser Ser Thr Thr Ser Pro Thr Glu Glu Thr		
645	650	655
Thr Gln Lys Leu Thr Val Ser His Ile Glu Gly Tyr Glu Cys Gln Pro		
660	665	670
Ile Phe Leu Asn Val Leu Glu Ala Ile Glu Pro Gly Val Val Cys Ala		
675	680	685
Gly His Asp Asn Asn Gln Pro Asp Ser Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser		
690	695	700
Leu Asn Glu Leu Gly Glu Arg Gln Leu Val His Val Val Lys Trp Ala		
705	710	715
Lys Ala Leu Pro Gly Phe Arg Asn Leu His Val Asp Asp Gln Met Ala		
725	730	735

Val Ile Gln Tyr Ser Trp Met Gly Leu Met Val Phe Ala Met Gly Trp
 740 745 750
 Arg Ser Phe Thr Asn Val Asn Ser Arg Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp
 755 760 765
 Leu Val Phe Asn Glu Tyr Arg Met His Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln
 770 775 780
 Cys Val Arg Met Arg His Leu Ser Gln Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile
 785 790 795 800
 Thr Pro Gln Glu Phe Leu Cys Met Lys Ala Leu Leu Phe Ser Ile
 805 810 815
 Ile Pro Val Asp Gly Leu Lys Asn Gln Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg
 820 825 830
 Met Asn Tyr Ile Lys Glu Leu Asp Arg Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys
 835 840 845
 Asn Pro Thr Ser Cys Ser Arg Arg Phe Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu
 850 855 860
 Asp Ser Val Gln Pro Ile Ala Arg Glu Leu His Gln Phe Thr Phe Asp
 865 870 875 880
 Leu Leu Ile Lys Ser His Met Val Ser Val Asp Phe Pro Glu Met Met
 885 890 895
 Ala Glu Ile Ile Ser Val Gln Val Pro Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val
 900 905 910
 Lys Pro Ile Tyr Phe His Thr Gln
 915 920

 <210> 3
 <211> 369
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 Tyr Tyr Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys Leu Ile Cys Gly Asp Glu Ala
 1 5 10 15
 Ser Gly Cys His Tyr Gly Ala Leu Thr Cys Gly Ser Cys Lys Val Phe

20	25	30
Phe Lys Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln Lys Tyr Leu Cys Ala Ser Arg		
35	40	45
Asn Asp Cys Thr Ile Asp Lys Phe Arg Arg Lys Asn Cys Pro Ser Cys		
50	55	60
Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Ala Gly Met Thr Leu Gly Ala Arg Lys		
65	70	75
Leu Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu Gln Glu Glu Gly Glu Ala Ser		
85	90	95
Ser Thr Thr Ser Pro Thr Glu Glu Thr Thr Gln Lys Leu Thr Val Ser		
100	105	110
His Ile Glu Gly Tyr Glu Cys Gln Pro Ile Phe Leu Asn Val Leu Glu		
115	120	125
Ala Ile Glu Pro Gly Val Val Cys Ala Gly His Asp Asn Asn Gln Pro		
130	135	140
Asp Ser Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn Glu Leu Gly Glu Arg		
145	150	155
Gln Leu Val His Val Val Lys Trp Ala Lys Ala Leu Pro Gly Phe Arg		
165	170	175
Asn Leu His Val Asp Asp Gln Met Ala Val Ile Gln Tyr Ser Trp Met		
180	185	190
Gly Leu Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg Ser Phe Thr Asn Val Asn		
195	200	205
Ser Arg Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp Leu Val Phe Asn Glu Tyr Arg		
210	215	220
Met His Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys Val Arg Met Arg His Leu		
225	230	235
Ser Gln Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr Pro Gln Glu Phe Leu Cys		
245	250	255
Met Lys Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile Ile Pro Val Asp Gly Leu Lys		
260	265	270

Asn Gln Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met Asn Tyr Ile Lys Glu Leu
 275 280 285
 Asp Arg Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn Pro Thr Ser Cys Ser Arg
 290 295 300
 Arg Phe Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Ser Val Gln Pro Ile Ala

305 310 315 320
 Arg Glu Leu His Gln Phe Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys Ser His Met
 325 330 335
 Val Ser Val Asp Phe Pro Glu Met Met Ala Glu Ile Ile Ser Val Gln
 340 345 350
 Val Pro Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val Lys Pro Ile Tyr Phe His Thr
 355 360 365
 Gln

<210> 4

<211> 230

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Asp Asn Asn Gln Pro Asp Ser Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn
 1 5 10 15
 Glu Leu Gly Glu Arg Gln Leu Val His Val Val Lys Trp Ala Lys Ala
 20 25 30
 Leu Pro Gly Phe Arg Asn Leu His Val Asp Asp Gln Met Ala Val Ile
 35 40 45
 Gln Tyr Ser Trp Met Gly Leu Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg Ser
 50 55 60

Phe Thr Asn Val Asn Ser Arg Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp Leu Val
 65 70 75 80
 Phe Asn Glu Tyr Arg Met His Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys Val
 85 90 95
 Arg Met Arg His Leu Ser Gln Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr Pro

100	105	110
Gln Glu Phe Leu Cys Met Lys Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile Ile Pro		
115	120	125
Val Asp Gly Leu Lys Asn Gln Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met Asn		
130	135	140
Tyr Ile Lys Glu Leu Asp Arg Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn Pro		
145	150	155
Thr Ser Cys Ser Arg Arg Phe Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Ser		
165	170	175
Val Gln Pro Ile Ala Arg Glu Leu His Gln Phe Thr Phe Asp Leu Leu		
180	185	190
Ile Lys Ser His Met Val Ser Val Asp Phe Pro Glu Met Met Ala Glu		
195	200	205
Ile Ile Ser Val Gln Val Pro Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val Lys Pro		
210	215	220
Ile Tyr Phe His Thr Gln		
225	230	
<210> 5		
<211> 919		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 5		
Met Glu Val Gln Leu Gly Leu Gly Arg Val Tyr Pro Arg Pro Pro Ser		
1	5	10
15		
Lys Thr Tyr Arg Gly Ala Phe Gln Asn Leu Phe Gln Ser Val Arg Glu		
20	25	30
Val Ile Gln Asn Pro Gly Pro Arg His Pro Glu Ala Ala Ser Ala Ala		
35	40	45
Pro Pro Gly Ala Ser Leu Leu Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln		
50	55	60
Gln Glu Thr		

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85	90	95
----	----	----

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

100	105	110
-----	-----	-----

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

115	120	125
-----	-----	-----

Cys Val Pro Glu Pro Gly Ala Ala Val Ala Ala Ser Lys Gly Leu Pro

130	135	140
-----	-----	-----

Gln Gln Leu Pro Ala Pro Pro Asp Glu Asp Asp Ser Ala Ala Pro Ser

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Thr Leu Ser Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro Gly Leu Ser Ser Cys Ser

165	170	175
-----	-----	-----

Ala Asp Leu Lys Asp Ile Leu Ser Glu Ala Ser Thr Met Gln Leu Leu

180	185	190
-----	-----	-----

Gln Gln Gln Gln Gln Glu Ala Val Ser Glu Gly Ser Ser Ser Gly Arg

195	200	205
-----	-----	-----

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

210	215	220
-----	-----	-----

Gly Gly Thr Ser Thr Ile Ser Asp Asn Ala Lys Glu Leu Cys Lys Ala

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Val Ser Val Ser Met Gly Leu Gly Val Glu Ala Leu Glu His Leu Ser

245	250	255
-----	-----	-----

Pro Gly Glu Gln Leu Arg Gly Asp Cys Met Tyr Ala Pro Leu Leu Gly

260	265	270
-----	-----	-----

Val Pro Pro Ala Val Arg Pro Thr Pro Cys Ala Pro Leu Ala Glu Cys

275	280	285
-----	-----	-----

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

290	295	300
-----	-----	-----

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

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

Glu Ser Leu Gly Cys Ser Gly Ser Ala Ala Ala Gly Ser Ser Gly Thr

325 330 335

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

340 345 350

Glu Ala Ala Ala Tyr Gln Ser Arg Asp Tyr Tyr Asn Phe Pro Leu Ala

355 360 365

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

370 375 380

Ile Lys Leu Glu Asn Pro Leu Asp Tyr Gly Ser Ala Trp Ala Ala Ala

385 390 395 400

Ala Ala Gln Cys Arg Tyr Gly Asp Leu Ala Ser Leu His Gly Ala Gly

405 410 415

Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Ser Pro Ser Ala Ala Ala Ser Ser Ser

420 425 430

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

435 440 445

Gly Gly

450 455 460

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Glu Ala Gly Ala Val Ala Pro Tyr

465 470 475 480

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

485 490 495

Thr Ala Pro Asp Val Trp Tyr Pro Gly Gly Met Val Ser Arg Val Pro

500 505 510

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

515 520 525

Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Gly Asp Met Arg Leu Glu Thr Ala Arg Asp

530 535 540

His Val Leu Pro Ile Asp Tyr Tyr Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys Leu

545 550 555 560

Ile Cys Gly Asp Glu Ala Ser Gly Cys His Tyr Gly Ala Leu Thr Cys

565	570	575
Gly Ser Cys Lys Val Phe Phe Lys Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln Lys		
580	585	590
Tyr Leu Cys Ala Ser Arg Asn Asp Cys Thr Ile Asp Lys Phe Arg Arg		
595	600	605
Lys Asn Cys Pro Ser Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Ala Gly Met		
610	615	620
Thr Leu Gly Ala Arg Lys Leu Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu Gln		
625	630	635
Glu Glu Gly Glu Ala Ser Ser Thr Thr Ser Pro Thr Glu Glu Thr Thr		
645	650	655
Gln Lys Leu Thr Val Ser His Ile Glu Gly Tyr Glu Cys Gln Pro Ile		
660	665	670
Phe Leu Asn Val Leu Glu Ala Ile Glu Pro Gly Val Val Cys Ala Gly		
675	680	685
His Asp Asn Asn Gln Pro Asp Ser Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu		
690	695	700
Asn Glu Leu Gly Glu Arg Gln Leu Val His Val Val Lys Trp Ala Lys		
705	710	715
Ala Leu Pro Gly Phe Arg Asn Leu His Val Asp Asp Gln Met Ala Val		
725	730	735
Ile Gln Tyr Ser Trp Met Gly Leu Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg		
740	745	750
Ser Phe Thr Asn Val Asn Ser Arg Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp Leu		
755	760	765
Val Phe Asn Glu Tyr Arg Met His Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys		
770	775	780
Val Arg Met Arg His Leu Ser Gln Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr		
785	790	795
Pro Gln Glu Phe Leu Cys Met Lys Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile Ile		
805	810	815

Pro Val Asp Gly Leu Lys Asn Gln Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met
 820 825 830
 Asn Tyr Ile Lys Glu Leu Asp Arg Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn
 835 840 845

Pro Thr Ser Cys Ser Arg Arg Phe Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp
 850 855 860
 Ser Val Gln Pro Ile Ala Arg Glu Leu His Gln Leu Thr Phe Asp Leu
 865 870 875 880
 Leu Ile Lys Ser His Met Val Ser Val Asp Phe Pro Glu Met Met Ala
 885 890 895
 Glu Ile Ile Ser Val Gln Val Pro Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val Lys
 900 905 910

Pro Ile Tyr Phe His Thr Gln

915

<210> 6

<211> 902

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 6

Met Glu Val Gln Leu Gly Leu Gly Arg Val Tyr Pro Arg Pro Pro Ser
 1 5 10 15
 Lys Thr Tyr Arg Gly Ala Phe Gln Asn Leu Phe Gln Ser Val Arg Glu
 20 25 30
 Ala Ile Gln Asn Pro Gly Pro Arg His Pro Glu Ala Ala Ser Ile Ala
 35 40 45

Pro Pro Gly Ala Cys Leu Gln Gln Arg Gln Glu Thr Ser Pro Arg Arg
 50 55 60
 Arg Arg Arg Gln Gln His Pro Glu Asp Gly Ser Pro Gln Ala His Ile
 65 70 75 80
 Arg Gly Thr Thr Gly Tyr Leu Ala Leu Glu Glu Gln Gln Pro Ser
 85 90 95
 Gln Gln Gln Ser Ala Ser Glu Gly His Pro Glu Ser Gly Cys Leu Pro

100	105	110														
Glu	Pro	Gly	Ala	Ala	Thr	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Pro	Gln	Gln	Pro	
115																
Pro	Ala	Pro	Pro	Asp	Gln	Asp	Asp	Ser	Ala	Ala	Pro	Ser	Thr	Leu	Ser	
130																
Leu	Leu	Gly	Pro	Thr	Phe	Pro	Gly	Leu	Ser	Ser	Cys	Ser	Ala	Asp	Ile	
145																
Lys	Asp	Ile	Leu	Ser	Glu	Ala	Gly	Thr	Met	Gln	Leu	Leu	Gln	Gln	Gln	
160																
Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	
175																
180																
Gln	Gln	Gln	Glu	Val	Ile	Ser	Glu	Gly	Ser	Ser	Ser	Val	Arg	Ala	Arg	
195																
Glu	Ala	Thr	Gly	Ala	Pro	Ser	Ser	Ser	Lys	Asp	Ser	Tyr	Leu	Gly	Gly	
210																
Asn	Ser	Thr	Ile	Ser	Asp	Ser	Ala	Lys	Glu	Leu	Cys	Lys	Ala	Val	Ser	
225																
Val	Ser	Met	Gly	Leu	Gly	Val	Glu	Ala	Leu	Glu	His	Leu	Ser	Pro	Gly	
240																
245																
Glu	Gln	Leu	Arg	Gly	Asp	Cys	Met	Tyr	Ala	Ser	Leu	Gly	Gly	Pro		
260																
Pro	Ala	Val	Arg	Pro	Thr	Pro	Cys	Ala	Pro	Leu	Ala	Glu	Cys	Lys	Gly	
275																
Leu	Ser	Leu	Asp	Glu	Gly	Pro	Gly	Lys	Gly	Thr	Glu	Glu	Thr	Ala	Glu	
290																
Tyr	Ser	Ser	Phe	Lys	Gly	Gly	Tyr	Ala	Lys	Gly	Leu	Glu	Glu	Ser		
305																
Leu	Gly	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Glu	Ala	Gly	Ser	Ser	Gly	Thr	Leu	Glu	
325																
Ile	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Leu	Tyr	Lys	Ser	Gly	Ala	Val	Asp	Glu	Ala	
340																
345																
350																

Ala Ala Tyr Gln Asn Arg Asp Tyr Tyr Asn Phe Pro Leu Ala Leu Ser

355 360 365

Gly Pro Pro His Pro Pro Pro Pro Thr His Pro His Ala Arg Ile Lys

370 375 380

Leu Glu Asn Pro Ser Asp Tyr Gly Ser Ala Trp Ala Ala Ala Ala

385 390 395 400

Gln Cys Arg Tyr Gly Asp Leu Ala Ser Leu His Gly Gly Ser Val Ala

405 410 415

Gly Pro Ser Thr Gly Ser Pro Pro Ala Thr Ala Ser Ser Ser Trp His

420 425 430

Thr Leu Phe Thr Ala Glu Glu Gln Leu Tyr Gly Pro Gly Gly Gly

435 440 445

Gly Gly Ser Ser Ser Pro Ser Asp Ala Gly Pro Val Ala Pro Tyr Gly

450 455 460

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

465 470 475 480

Ala Ser Glu Val Trp Tyr Pro Gly Gly Val Val Asn Arg Val Pro Tyr

485 490 495

Pro Ser Pro Ser Cys Val Lys Ser Glu Met Gly Pro Trp Met Glu Asn

500 505 510

Tyr Ser Gly Pro Tyr Gly Asp Met Arg Leu Asp Ser Thr Arg Asp His

515 520 525

Val Leu Pro Ile Asp Tyr Tyr Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys Leu Ile

530 535 540

Cys Gly Asp Glu Ala Ser Gly Cys His Tyr Gly Ala Leu Thr Cys Gly

545 550 555 560

Ser Cys Lys Val Phe Phe Lys Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln Lys Tyr

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

Leu Gly Ala Arg Lys Leu Lys Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu Gln Glu

610 615 620

Glu Gly Glu Asn Ser Ser Ala Gly Ser Pro Thr Glu Asp Pro Ser Gln

625 630 635 640

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

645 650 655

Leu Asn Val Leu Glu Ala Ile Glu Pro Gly Val Val Cys Ala Gly His

660 665 670

Asp Asn Asn Gln Pro Asp Ser Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn

675 680 685

Glu Leu Gly Glu Arg Gln Leu Val His Val Val Lys Trp Ala Lys Ala

690 695 700

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

705 710 715 720

Gln Tyr Ser Trp Met Gly Leu Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg Ser

725 730 735

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

740 745 750

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

755 760 765

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

770 775 780

Gln Glu Phe Leu Cys Met Lys Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile Ile Pro

785 790 795 800

Val Asp Gly Leu Lys Asn Gln Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met Asn

805 810 815

Tyr Ile Lys Glu Leu Asp Arg Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn Pro

820 825 830

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

835 840 845

Val Gln Pro Ile Ala Arg Glu Leu His Gln Phe Thr Phe Asp Leu Leu
 850 855 860
 Ile Lys Ser His Met Val Ser Val Asp Phe Pro Glu Met Met Ala Glu
 865 870 875 880

Ile Ile Ser Val Gln Val Pro Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val Lys Pro
 885 890 895
 Ile Tyr Phe His Thr Gln
 900

<210> 7
 <211> 899
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 7

Met Glu Val Gln Leu Gly Leu Gly Arg Val Tyr Pro Arg Pro Pro Ser
 1 5 10 15
 Lys Thr Tyr Arg Gly Ala Phe Gln Asn Leu Phe Gln Ser Val Arg Glu
 20 25 30

Ala Ile Gln Asn Pro Gly Pro Arg His Pro Glu Ala Ala Asn Ile Ala
 35 40 45
 Pro Pro Gly Ala Cys Leu Gln Gln Arg Gln Glu Thr Ser Pro Arg Arg
 50 55 60
 Arg Arg Arg Gln Gln His Thr Glu Asp Gly Ser Pro Gln Ala His Ile
 65 70 75 80
 Arg Gly Pro Thr Gly Tyr Leu Ala Leu Glu Glu Gln Gln Pro Ser
 85 90 95

Gln Gln Gln Ala Ala Ser Glu Gly His Pro Glu Ser Ser Cys Leu Pro
 100 105 110
 Glu Pro Gly Ala Ala Thr Ala Pro Gly Lys Gly Leu Pro Gln Gln Pro
 115 120 125
 Pro Ala Pro Pro Asp Gln Asp Asp Ser Ala Ala Pro Ser Thr Leu Ser
 130 135 140
 Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro Gly Leu Ser Ser Cys Ser Ala Asp Ile

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Lys Asp Ile Leu Asn Glu Ala Gly Thr Met Gln Leu Leu Gln Gln Gln
 165 170 175
 Gln Gln Gln Gln His Gln Gln Gln His Gln Gln His Gln Gln Gln
 180 185 190
 Gln Glu Val Ile Ser Glu Gly Ser Ser Ala Arg Ala Arg Glu Ala Thr
 195 200 205
 Gly Ala Pro Ser Ser Ser Lys Asp Ser Tyr Leu Gly Gly Asn Ser Thr
 210 215 220

Ile Ser Asp Ser Ala Lys Glu Leu Cys Lys Ala Val Ser Val Ser Met
 225 230 235 240
 Gly Leu Gly Val Glu Ala Leu Glu His Leu Ser Pro Gly Glu Gln Leu
 245 250 255
 Arg Gly Asp Cys Met Tyr Ala Ser Leu Leu Gly Gly Pro Pro Ala Val
 260 265 270
 Arg Pro Thr Pro Cys Ala Pro Leu Pro Glu Cys Lys Gly Leu Pro Leu
 275 280 285

Asp Glu Gly Pro Gly Lys Ser Thr Glu Glu Thr Ala Glu Tyr Ser Ser
 290 295 300
 Phe Lys Gly Gly Tyr Ala Lys Gly Leu Glu Gly Glu Ser Leu Gly Cys
 305 310 315 320
 Ser Gly Ser Ser Glu Ala Gly Ser Ser Gly Thr Leu Glu Ile Pro Ser
 325 330 335
 Ser Leu Ser Leu Tyr Lys Ser Gly Ala Leu Asp Glu Ala Ala Ala Tyr
 340 345 350

Gln Asn Arg Asp Tyr Tyr Asn Phe Pro Leu Ala Leu Ser Gly Pro Pro
 355 360 365
 His Pro Pro Pro Pro Thr His Pro His Ala Arg Ile Lys Leu Glu Asn
 370 375 380
 Pro Leu Asp Tyr Gly Ser Ala Trp Ala Ala Ala Ala Gln Cys Arg
 385 390 395 400

Tyr Gly Asp Leu Gly Ser Leu His Gly Gly Ser Val Ala Gly Pro Ser

405 410 415

Thr Gly Ser Pro Pro Ala Thr Thr Ser Ser Ser Trp His Thr Leu Phe

420 425 430

Thr Ala Glu Glu Gly Gln Leu Tyr Gly Pro Gly Gly Gly Ser

435 440 445

Ser Ser Pro Ser Asp Ala Gly Pro Val Ala Pro Tyr Gly Tyr Thr Arg

450 455 460

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

465 470 475 480

Val Trp Tyr Pro Gly Gly Val Val Asn Arg Val Pro Tyr Pro Ser Pro

485 490 495

Asn Cys Val Lys Ser Glu Met Gly Pro Trp Met Glu Asn Tyr Ser Gly

500 505 510

Pro Tyr Gly Asp Met Arg Leu Asp Ser Thr Arg Asp His Val Leu Pro

515 520 525

Ile Asp Tyr Tyr Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys Leu Ile Cys Gly Asp

530 535 540

Glu Ala Ser Gly Cys His Tyr Gly Ala Leu Thr Cys Gly Ser Cys Lys

545 550 555 560

Val Phe Phe Lys Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln Lys Tyr Leu Cys Ala

565 570 575

Ser Arg Asn Asp Cys Thr Ile Asp Lys Phe Arg Arg Lys Asn Cys Pro

580 585 590

Ser Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Ala Gly Met Thr Leu Gly Ala

595 600 605

Arg Lys Leu Lys Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu Gln Glu Glu Glu

610 615 620

Asn Ser Asn Ala Gly Ser Pro Thr Glu Asp Pro Ser Gln Lys Met Thr

625 630 635 640

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

645	650	655
Leu Glu Ala Ile Glu Pro Gly Val Val Cys Ala Gly His Asp Asn Asn		
660	665	670
Gln Pro Asp Ser Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn Glu Leu Gly		
675	680	685
Glu Arg Gln Leu Val His Val Val Lys Trp Ala Lys Ala Leu Pro Gly		
690	695	700
Phe Arg Asn Leu His Val Asp Asp Gln Met Ala Val Ile Gln Tyr Ser		
705	710	715
Trp Met Gly Leu Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg Ser Phe Thr Asn		
725	730	735
Val Asn Ser Arg Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp Leu Val Phe Asn Glu		
740	745	750
Tyr Arg Met His Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys Val Arg Met Arg		
755	760	765
His Leu Ser Gln Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr Pro Gln Glu Phe		
770	775	780
Leu Cys Met Lys Ala Leu Leu Phe Ser Ile Ile Pro Val Asp Gly		
785	790	795
800		
Leu Lys Asn Gln Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met Asn Tyr Ile Lys		
805	810	815
Glu Leu Asp Arg Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn Pro Thr Ser Cys		
820	825	830
Ser Arg Arg Phe Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Ser Val Gln Pro		
835	840	845
Ile Ala Arg Glu Leu His Gln Phe Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys Ser		
850	855	860
His Met Val Ser Val Asp Phe Pro Glu Met Met Ala Glu Ile Ile Ser		
865	870	875
Val Gln Val Pro Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val Lys Pro Ile Tyr Phe		
885	890	895

His Thr Gln

<210> 8

<211> 907

<212> PRT

<213> Canis familiaris

<400> 8

Met Glu Val Gln Leu Gly Leu Gly Arg Val Tyr Pro Arg Pro Pro Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Ile Gln Asn Pro Gly Pro Arg His Pro Glu Ala Val Ser Ala Ala

35 40 45

Pro Pro Gly Ala His Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Pro Gln Ala Gln Ser Arg Gly Pro Thr Gly Tyr Leu Ala Leu Asp

85 90 95

Glu Glu Gln Gln Pro Ser Gln Gln Arg Ser Ala Ser Lys Gly His Pro

100 105 110

Glu Ser Ala Cys Val Pro Glu Pro Gly Val Thr Ser Ala Thr Gly Lys

115 120 125

Gly Leu Gln Gln Gln Pro Ala Pro Pro Asp Glu Asn Asp Ser Ala

130 135 140

Ala Pro Ser Thr Leu Ser Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro Gly Leu Ser

145 150 155 160

Ser Cys Ser Thr Asp Leu Lys Asp Ile Leu Ser Glu Ala Gly Thr Met

165 170 175

Gln Leu Leu Gln Gln Arg Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln

180 185 190

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Glu Val Val Ser Glu Gly

195

200

205

Ser Ser Ser Gly Arg Ala Arg Glu Ala Ala Gly Ala Ser Thr Ser Ser

210

215

220

Lys Asp Ser Tyr Leu Gly Gly Ser Ser Thr Ile Ser Asp Ser Ala Lys

225 230 235 240

Glu Leu Cys Lys Ala Val Ser Val Ser Met Gly Leu Gly Val Glu Ala

245

250

255

Leu Glu His Leu Ser Pro Gly Glu Gln Leu Arg Gly Asp Cys Met Tyr

260

265

270

Ala Pro Leu Leu Gly Pro Pro Ala Val Arg Pro Cys Ala Pro Leu

275

280

285

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

290

295

300

Glu Glu Thr Ala Glu Tyr Ser Pro Phe Lys Ala Gly Tyr Ala Lys Gly

305 310 315 320

Leu Asp Gly Asp Ser Leu Gly Cys Ser Ser Ser Ser Glu Ala Gly Gly

325

330

335

Ser Gly Thr Leu Glu Met Pro Ser Thr Leu Ser Leu Tyr Lys Ser Gly

340

345

350

Ala Leu Asp Glu Ala Ala Tyr Gln Ser Arg Asp Tyr Tyr Asn Phe

355

360

365

Pro Leu Ser Leu Gly Gly Pro Pro Pro His Pro Pro Pro Pro His Pro

370

375

380

His Thr Arg Ile Lys Leu Glu Asn Pro Leu Asp Tyr Gly Ser Ala Trp

385 390 395 400

Ala Ala Ala Ala Ala Gln Cys Arg Tyr Gly Asp Leu Ala Ser Leu His

405

410

415

Gly Ala Gly Ala Ala Gly Pro Ser Ser Gly Ser Pro Ser Ala Thr Thr

420

425

430

Ser Ser Ser Trp His Thr Leu Phe Thr Ala Glu Glu Gly Gln Leu Tyr

435

440

445

Gly Pro Cys Gly Gly Ser Gly Gly Ser Ala Gly Asp Gly Gly Ser

450 455 460

Val Ala Pro Tyr Gly Tyr Thr Arg Pro Pro Gln Gly Leu Ala Gly Gln

465 470 475 480

Glu Gly Asp Phe Pro Pro Asp Val Trp Tyr Pro Gly Gly Val Val

485 490 495

Ser Arg Val Pro Phe Pro Ser Pro Ser Cys Val Lys Ser Glu Met Gly

500 505 510

Ser Trp Met Glu Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Gly Asp Met Arg Leu Glu

515 520 525

Thr Ala Arg Asp His Val Leu Pro Ile Asp Tyr Tyr Phe Pro Pro Gln

530 535 540

Lys Thr Cys Leu Ile Cys Gly Asp Glu Ala Ser Gly Cys His Tyr Gly

545 550 555 560

Ala Leu Thr Cys Gly Ser Cys Lys Val Phe Phe Lys Arg Ala Ala Glu

565 570 575

Gly Lys Gln Lys Tyr Leu Cys Ala Ser Arg Asn Asp Cys Thr Ile Asp

580 585 590

Lys Phe Arg Arg Lys Asn Cys Pro Ser Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr

595 600 605

Glu Ala Gly Met Thr Leu Gly Ala Arg Lys Leu Lys Leu Gly Asn

610 615 620

Leu Lys Leu Gln Glu Glu Gly Glu Ala Ser Asn Val Thr Ser Pro Thr

625 630 635 640

Glu Glu Pro Thr Gln Lys Leu Thr Val Ser His Ile Glu Gly Tyr Glu

645 650 655

Cys Gln Pro Ile Phe Leu Asn Val Leu Glu Ala Ile Glu Pro Gly Val

660 665 670

Val Cys Ala Gly His Asp Asn Asn Gln Pro Asp Ser Phe Ala Ala Leu

675 680 685

Leu Ser Ser Leu Asn Glu Leu Gly Glu Arg Gln Leu Val His Val Val

690	695	700
Lys Trp Ala Lys Ala Leu Pro Gly Phe Arg Asn Leu His Val Asp Asp		
705	710	715
Gln Met Ala Val Ile Gln Tyr Ser Trp Met Gly Leu Met Val Phe Ala		
725	730	735
Met Gly Trp Arg Ser Phe Thr Asn Val Asn Ser Arg Met Leu Tyr Phe		
740	745	750
Ala Pro Asp Leu Val Phe Asn Glu Tyr Arg Met His Lys Ser Arg Met		
755	760	765
Tyr Ser Gln Cys Val Arg Met Arg His Leu Ser Gln Glu Phe Gly Trp		
770	775	780
Leu Gln Ile Thr Pro Gln Glu Phe Leu Cys Met Lys Ala Leu Leu Leu		
785	790	795
Phe Ser Ile Ile Pro Val Asp Gly Leu Lys Asn Gln Lys Phe Phe Asp		
805	810	815
Glu Leu Arg Met Asn Tyr Ile Lys Glu Leu Asp Arg Ile Ile Ala Cys		
820	825	830
Lys Arg Lys Asn Pro Thr Ser Cys Ser Arg Arg Phe Tyr Gln Leu Thr		
835	840	845
Lys Leu Leu Asp Ser Val Gln Pro Ile Ala Arg Glu Leu His Gln Phe		
850	855	860
Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys Ser His Met Val Ser Val Asp Phe Pro		
865	870	875
Glu Met Met Ala Glu Ile Ile Ser Val Gln Val Pro Lys Ile Leu Ser		
885	890	895
Gly Lys Val Lys Pro Ile Tyr Phe His Thr Gln		
900	905	
<210> 9		
<211> 912		
<212> PRT		
<213> Crocuta crocuta		
<400> 9		

Met Glu Val Gln Leu Gly Leu Gly Arg Val Tyr Pro Arg Pro Pro Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Ile Gln Asn Pro Gly Pro Arg His Pro Glu Ala Thr Ser Ala Ala

35 40 45

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

50 55 60

Gln His Glu Thr Ser Pro Arg Arg Gln Gln Gln Gln Pro Glu Asp

65 70 75 80

Gly Ser Pro Gln Arg Pro Ser Arg Gly Pro Thr Ser Tyr Leu Ala Leu

85 90 95

Asp Glu Glu Gln Gln Pro Ser Gln His Gln Ser Ala Lys Gly His Pro

100 105 110

Glu Ser Gly Cys Val Pro Glu Pro Val Ala Met Ser Arg Thr Gly Lys

115 120 125

Gly Leu Glu Gln Gln Pro Ala Pro Pro Asp Glu Asp Asp Ser Ala

130 135 140

Ala Pro Ser Thr Leu Ser Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro Gly Leu Ser

145 150 155 160

Ser Cys Ser Thr Asp Leu Lys Asp Ile Leu Ser Glu Ala Gly Thr Met

165 170 175

Gln Leu Leu Gln Arg Gln Arg Gln Gln Gln Gln Arg Gln Gln Gln

180 185 190

Gln Glu

195 200 205

Val Val Ser Glu Gly Gly Ser Ser Gly Arg Ala Arg Glu Ala Ala Gly

210 215 220

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

225 230 235 240

Ser Asp Ser Ala Lys Glu Leu Cys Lys Ala Val Ser Val Ser Met Gly

245 250 255

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

260 265 270

Gly Asp Cys Met Tyr Ala Pro Leu Leu Gly Gly Pro Pro Pro Val Cys

275 280 285

Pro Cys Ala Pro Leu Thr Glu Cys Lys Gly Ser Val Leu Asp Asp Gly

290 295 300

Pro Ser Lys Gly Thr Glu Glu Thr Ala Glu Tyr Ser Pro Phe Lys Thr

305 310 315 320

Gly Tyr Ala Lys Gly Leu Asp Gly Asp Ser Leu Gly Cys Ser Gly Ser

325 330 335

Ser Gln Ala Gly Gly Ser Gly Thr Leu Glu Ile Pro Ser Thr Leu Ser

340 345 350

Leu Tyr Lys Ser Gly Thr Leu Asp Glu Ala Ala Ala Tyr Gln Ser Arg

355 360 365

Asp Tyr Tyr Asn Phe Gln Leu Ser Leu Ala Gly Pro Pro Pro Pro

370 375 380

Pro Ser Pro His Pro His Ala Arg Ile Lys Leu Glu Asn Pro Leu Asp

385 390 395 400

Tyr Gly Ser Ala Trp Ala Ala Ala Ala Gln Cys Arg Tyr Gly Asp

405 410 415

Leu Ala Ser Leu His Gly Gly Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Ser

420 425 430

Pro Ser Ala Thr Ala Ser Ser Ser Trp His Thr Leu Phe Thr Ala Glu

435 440 445

Glu Gly Gln Leu Tyr Gly Pro Cys Gly Gly Ser Gly Gly Gly Thr

450 455 460

Gly Glu Ser Val Ser Val Thr Pro Tyr Gly Tyr Thr Arg Pro Gln Gln

465 470 475 480

Gly Leu Thr Gly Gln Glu Gly Asp Phe Pro Pro Pro Asp Val Trp Tyr

485 490 495

Pro Gly Gly Val Val Ser Arg Met Pro Tyr Pro Ser Ala Ser Cys Val

500 505 510

Lys Ser Glu Met Gly Pro Trp Met Glu Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Gly

515 520 525

Asp Met Arg Leu Glu Thr Thr Arg Asp His Val Leu Pro Ile Asp Tyr

530 535 540

Tyr Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys Leu Ile Cys Gly Asp Glu Ala Ser

545 550 555 560

Gly Cys His Tyr Gly Ala Leu Thr Cys Gly Ser Cys Lys Val Phe Phe

565 570 575

Lys Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln Lys Tyr Leu Cys Ala Ser Arg Asn

580 585 590

Asp Cys Thr Ile Asp Lys Phe Arg Arg Lys Asn Cys Pro Pro Cys Arg

595 600 605

Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Ala Gly Met Thr Leu Gly Ala Arg Arg Leu

610 615 620

Lys Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu Gln Glu Glu Gly Glu Ala Ser Ser

625 630 635 640

Thr Thr Ser Pro Thr Glu Glu Thr Thr Gln Lys Leu Thr Val Ser His

645 650 655

Ile Glu Gly Tyr Glu Cys Gln Pro Ile Phe Leu Asn Val Leu Glu Ala

660 665 670

Ile Glu Pro Gly Val Val Cys Ala Gly His Asp Asn Asn Gln Pro Asp

675 680 685

Ser Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn Glu Leu Gly Glu Arg Gln

690 695 700

Leu Val His Val Val Lys Trp Ala Lys Ala Leu Pro Gly Phe Arg Asn

705 710 715 720

Leu His Val Asp Asp Gln Met Ala Val Ile Gln Tyr Ser Trp Met Gly

725 730 735

Leu Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg Ser Phe Thr Asn Val Asn Ser

740	745	750
Arg Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp Leu Val Phe Asn Glu Tyr Arg Met		
755	760	765
His Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys Val Arg Met Arg His Leu Ser		
770	775	780
Gln Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr Pro Gln Glu Phe Leu Cys Met		
785	790	795
Lys Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile Ile Pro Val Asp Gly Leu Lys Asn		
805	810	815
Gln Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met Asn Tyr Ile Lys Asp Leu Asp		
820	825	830
Arg Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn Pro Thr Ser Cys Ser Arg Arg		
835	840	845
Phe Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Ser Val Gln Pro Ile Ala Arg		
850	855	860
Glu Leu His Gln Phe Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys Ser His Met Val		
865	870	875
Ser Val Asp Phe Pro Glu Met Met Ala Glu Ile Ile Ser Val Gln Val		
885	890	895
Pro Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val Lys Pro Ile Tyr Phe His Thr Gln		
900	905	910
<210> 10		
<211> 884		
<212> PRT		
<213> Eulemur fulvus		
<400> 10		
Met Glu Val Gln Leu Gly Leu Arg Val Tyr Pro Arg Pro Pro Ser		
1	5	10
Lys Thr Tyr Arg Gly Ala Phe Gln Asn Leu Phe Gln Ser Val Arg Glu		
20	25	30
Val Ile Gln Asn Pro Gly Pro Arg His Pro Glu Ala Ala Ser Ala Ala		

35	40	45
----	----	----

Pro Pro Gly Ala Arg Leu Gln Gln Gln Glu Thr Ser Pro Pro Gln
 50 55 60
 Gln Gln Gln Gln Gln Gly Glu Asp Gly Ser Pro Gln Ala Gln Ser
 65 70 75 80
 Arg Gly Pro Thr Gly Tyr Leu Ala Leu Asp Glu Glu Gln Gln Pro Ser
 85 90 95
 Gln Gln Gln Ser Ala Leu Glu Cys His Pro Glu Ser Gly Cys Val Pro
 100 105 110

Glu Pro Gly Ala Ala Ala Ala Ser Lys Gly Leu Gln Gln Gln Pro
 115 120 125
 Pro Ala Pro Ser Asp Glu Asp Asp Ser Ala Val Pro Ser Thr Leu Ser
 130 135 140
 Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro Gly Leu Ser Ser Cys Ser Ala Asp Leu
 145 150 155 160
 Lys Asp Ile Leu Ser Glu Ala Gly Thr Met Gln Leu Leu Gln Gln Gln
 165 170 175

Gln Gln Glu Ala Val Ser Glu Gly Ser Ser Ser Gly Arg Ala Arg Glu
 180 185 190
 Ala Ala Gly Ala Pro Thr Ser Ser Lys Asp Ser Tyr Leu Gly Gly Thr
 195 200 205
 Ser Thr Ile Ser Asp Ser Ala Lys Glu Leu Cys Lys Ala Val Ser Val
 210 215 220
 Ser Met Gly Leu Gly Val Glu Thr Leu Glu His Leu Ser Pro Gly Glu
 225 230 235 240

Gln Leu Arg Gly Asp Cys Met Tyr Ala Pro Leu Leu Gly Gly Pro Pro
 245 250 255
 Ala Val Arg Pro Thr Pro Cys Ala Pro Leu Ala Glu Cys Lys Gly Ser
 260 265 270
 Leu Leu Asp Asp Ser Ala Asp Lys Gly Thr Glu Glu Pro Ala Glu Tyr
 275 280 285

Thr Pro Phe Lys Gly Ser Tyr Thr Gln Gly Leu Glu Gly Glu Ser Leu
 290 295 300

Gly Cys Ser Gly Ser Ser Glu Ala Gly Ser Ser Gly Thr Leu Glu Leu
 305 310 315 320

Pro Ser Thr Leu Ser Leu Tyr Lys Ser Gly Ala Leu Glu Glu Ala Ala
 325 330 335
 Ser Tyr Gln Ser Arg Asp Tyr Tyr Asn Phe Pro Leu Ala Leu Ala Gly
 340 345 350

Pro Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro His Pro His Ala Arg Ile Lys Leu
 355 360 365

Glu Asn Pro Leu Asp Tyr Gly Ser Ser Trp Ala Ala Ala Ala Gln
 370 375 380

Cys Arg Phe Gly Asp Leu Ala Ser Leu His Gly Gly Ala Thr Gly
 385 390 395 400

Pro Gly Ser Gly Ser Pro Ser Ala Ala Ala Ser Ser Trp His Thr
 405 410 415

Leu Phe Thr Ala Glu Glu Gly Gln Leu Tyr Gly Pro Cys Gly Gly
 420 425 430

Gly Gly Gly Thr Ser Glu Ala Gly Ala Val Thr Pro Tyr Gly Tyr Ser
 435 440 445

Arg Pro Pro Gln Gly Leu Ala Gly Gln Glu Gly Asp Phe Pro Ala Pro
 450 455 460

Asp Val Trp Tyr Pro Ser Gly Val Val Ser Arg Val Pro Tyr Pro Ser
 465 470 475 480

Pro Ser Cys Val Lys Ser Glu Met Gly Pro Trp Met Glu Ser Tyr Ser
 485 490 495

Gly Pro Tyr Gly Asp Val Arg Leu Glu Thr Ala Arg Asp His Val Leu
 500 505 510

Pro Ile Asp Tyr Tyr Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys Leu Ile Cys Gly
 515 520 525

Asp Glu Ala Ser Gly Cys His Tyr Gly Ala Leu Thr Cys Gly Ser Cys

530	535	540
Lys Val Phe Phe Lys Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln Lys Tyr Leu Cys		
545	550	555
Ala Ser Arg Asn Asp Cys Thr Ile Asp Lys Phe Arg Arg Lys Asn Cys		
565	570	575
Pro Ser Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Ala Gly Met Thr Leu Gly		
580	585	590
Ala Arg Lys Leu Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu Gln Glu Glu Gly		
595	600	605
Glu Ala Ser Ser Ala Thr Ser Pro Thr Glu Glu Ser Ser Gln Lys Leu		
610	615	620
Thr Val Ser His Ile Glu Gly Tyr Glu Cys Gln Pro Ile Phe Leu Asn		
625	630	635
Val Leu Glu Ala Ile Glu Pro Gly Val Val Cys Ala Gly His Asp Asn		
645	650	655
Asn Gln Pro Asp Ser Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn Glu Leu		
660	665	670
Gly Glu Arg Gln Leu Val His Val Val Lys Trp Ala Lys Ala Leu Pro		
675	680	685
Gly Phe Arg Asn Leu His Val Asp Asp Gln Met Ala Val Ile Gln Tyr		
690	695	700
Ser Trp Met Gly Leu Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg Ser Phe Thr		
705	710	715
720		
Asn Val Asn Ser Arg Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp Leu Val Phe Asn		
725	730	735
Glu Tyr Arg Met His Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys Val Arg Met		
740	745	750
Arg His Leu Ser Gln Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr Pro Gln Glu		
755	760	765
Phe Leu Cys Met Lys Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile Ile Pro Val Asp		
770	775	780

Gly Leu Lys Asn Gln Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met Asn Tyr Ile
 785 790 795 800
 Lys Glu Leu Asp Arg Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn Pro Thr Ser
 805 810 815

Cys Ser Arg Arg Phe Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Ser Val Gln
 820 825 830
 Pro Ile Ala Arg Glu Leu His Gln Phe Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys
 835 840 845
 Ser His Met Val Ser Val Asp Phe Pro Glu Met Met Ala Glu Ile Ile
 850 855 860
 Ser Val Gln Val Pro Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val Lys Pro Ile Tyr
 865 870 875 880

Phe His Thr Gln

<210> 11
 <211> 777
 <212> PRT
 <213> Lithobates catesbeiana
 <400> 11

Met Glu Val His Ile Gly Leu Gly Gly Val Tyr Lys Gln Pro Pro Gly
 1 5 10 15
 Lys Met Ile Arg Gly Ala Phe Glu Asn Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu
 20 25 30
 Ala Leu Gln Gly Glu Arg Arg Ser Ala Ala Ser Leu Asp Thr Ser Ser
 35 40 45

Pro Ile Ser Ala Cys Val His Pro His Pro Thr Trp Asn Glu Pro Ser
 50 55 60
 Thr Trp Thr Glu Val Arg Gly Thr Pro Trp Arg Glu Pro Gln Gly Ala
 65 70 75 80
 Gln Pro Asp Pro Pro Cys Ser Pro Arg Ser Gln Ala Pro Gln Phe
 85 90 95
 Thr Leu Ser Ser Cys Thr Thr Glu Leu Lys Glu Ile Leu Gly Glu Gln

100	105	110
-----	-----	-----

Gly Gly Met Pro Glu Glu Gly Asn Ser Glu Ser Ala Ser Lys Glu Gly

115	120	125
-----	-----	-----

Tyr Pro Glu Ser Ile Ser Asp Ser Ala Lys Glu Ile Cys Lys Ala Val

130	135	140
-----	-----	-----

Ser Val Ser Leu Gly Leu Ser Met Glu Ala Leu Glu His Leu Ser Ala

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Ala Gly Glu Trp Gln Arg Gly Asp Cys Met Phe Ala Gly Pro Pro His

165	170	175
-----	-----	-----

His Thr Met Gly Ala Gln Thr Cys Gln Val Ala Glu Glu Asp Lys Ser

180	185	190
-----	-----	-----

Asp Thr Ser Phe Ser Gln Tyr Arg Glu Gly Ala Phe Arg Arg Ala Gly

195	200	205
-----	-----	-----

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

210	215	220
-----	-----	-----

Pro Thr Glu Asp Lys Glu Gln Pro Cys Thr Asp Met Ala Leu Ser Glu

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Pro Gly Ser Leu Arg Ser Arg Gly Met Glu Val Met Pro Ser Leu Thr

245	250	255
-----	-----	-----

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

260	265	270
-----	-----	-----

Arg Asp Tyr Tyr Ser Phe Gln Met Ala Leu Ala Pro His Gly Arg Ile

275	280	285
-----	-----	-----

Lys Val Glu Ser Pro Ile Glu Phe Ala Gly Ser Ala Trp Gly Gly Pro

290	295	300
-----	-----	-----

Ser Arg Tyr Ser Glu Phe Pro Gly Phe Ser His Cys Gly Pro Ser Ala

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

Asn Trp His Ser Leu Phe Glu Glu Gly Gln Ala Thr Ala Ser Tyr Thr

325	330	335
-----	-----	-----

Asp Ser Ser Leu Tyr Ser Tyr Pro Arg Ser His Val Pro Ala Gly Pro

340	345	350
-----	-----	-----

Asp Gly Glu Phe Ser Ala Glu Ala Trp Tyr Pro Ala Thr Ala Met Leu

355 360 365

Gly Arg Val His Met Ala Val Pro Met Arg Pro Arg Met Thr His Gly

370 375 380

Trp Thr Ala Thr Leu Gly Ile Arg Arg Arg Leu Gly Trp Thr Gly Val

385 390 395 400

Glu Ser Thr Phe Tyr Pro Ile Asp Tyr Tyr Phe Pro Pro Gln Lys Pro

405 410 415

Cys Leu Ser Cys Glu Asp Glu Ala Ser Gly Cys His Tyr Glu Ala Leu

420 425 430

Thr Cys Gly Ser Cys Lys Val Phe Phe Lys Arg Ala Ala Glu Gly Asn

435 440 445

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

450 455 460

Arg Arg Lys Asn Cys Pro Ser Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Ala

465 470 475 480

Gly Met Thr Leu Gly Ala Arg Lys Leu Lys Lys Leu Gly Asn Leu Lys

485 490 495

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

500 505 510

Met Pro Pro Asn Met Ser Ile Pro Gln Leu Glu Gly Tyr Ser Cys Gln

515 520 525

Pro Ile Phe Leu Asn Val Leu Glu Ala Ile Glu Pro Met Val Val Cys

530 535 540

Ser Gly His Asp Asn Asn Gln Pro Asp Ser Phe Ala Leu Leu Leu Ser

545 550 555 560

Ser Leu Asn Glu Leu Gly Glu Arg Gln Leu Val His Val Val Lys Trp

565 570 575

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

580 585 590

Thr Val Ile Gln Tyr Ser Trp Met Gly Leu Met Ile Phe Ala Met Gly

595 600 605

Trp Arg Ser Phe Lys Asn Val Asn Ser Arg Met Leu Tyr Phe Ala Pro

610 615 620

Asp Leu Val Phe Asn Glu Tyr Arg Met His Lys Ser Arg Met Tyr Ser

625 630 635 640

Gln Cys Val Arg Met Arg His Leu Ser Gln Glu Phe Gly Trp Leu Gln

645 650 655

Val Thr Pro Glu Glu Phe Leu Cys Asp Glu Gly Pro Ser Ala Leu Ser

660 665 670

Ile Ile Pro Val Glu Gly Leu Lys Asp Gln Lys Cys Phe Asp Glu Leu

675 680 685

Arg Met Asn Tyr Ile Lys Glu Leu Asp Arg Val Ile Ser Cys Lys Arg

690 695 700

Asn Asn Pro Ala Ser Ser Pro Arg Phe Phe Asn Leu Pro Lys Leu

705 710 715 720

Leu Gly Ser Val Gln Pro Ile Asp Val Asn Leu Val Gln Phe Thr Phe

725 730 735

Gly Leu Phe Gly Lys Ala Gln Met Val Ser Val Asp Phe Pro Glu Met

740 745 750

Met Ser Glu Ile Ile Ser Val Gln Val Pro Lys Ile Leu Ser Gly Arg

755 760 765

Val Lys Pro Leu Tyr Phe His Ser Ser

770 775

<210> 12

<211> 895

<212> PRT

<213> Macaca fascicularis

<400> 12

Met Glu Val Gln Leu Gly Leu Gly Arg Val Tyr Pro Arg Pro Pro Ser

1 5 10 15

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

20	25	30
----	----	----

Val Ile Gln Asn Pro Gly Pro Arg His Pro Glu Ala Ala Ser Ala Ala

35	40	45
----	----	----

Pro Pro Gly Ala Ser Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Glu Thr

50	55	60
----	----	----

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

65	70	75	80
----	----	----	----

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

85	90	95
----	----	----

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

100	105	110
-----	-----	-----

Gly Cys Val Pro Glu Pro Gly Ala Ala Val Ala Ala Gly Lys Gly Leu

115	120	125
-----	-----	-----

Pro Gln Gln Leu Pro Ala Pro Pro Asp Glu Asp Asp Ser Ala Ala Pro

130	135	140
-----	-----	-----

Ser Thr Leu Ser Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro Gly Leu Ser Ser Cys

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

Ser Thr Asp Leu Lys Asp Ile Leu Ser Glu Ala Ser Thr Met Gln Leu

165	170	175
-----	-----	-----

Leu Gln Gln Gln Gln Gln Glu Ala Val Ser Glu Gly Ser Ser Ser Gly

180	185	190
-----	-----	-----

Arg Ala Arg Glu Ala Ser Gly Ala Pro Thr Ser Ser Lys Asp Asn Tyr

195	200	205
-----	-----	-----

Leu Gly Gly Thr Ser Thr Ile Ser Asp Ser Ala Lys Glu Leu Cys Lys

210	215	220
-----	-----	-----

Ala Val Ser Val Ser Met Gly Leu Gly Val Glu Ala Leu Glu His Leu

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Ser Pro Gly Glu Gln Leu Arg Gly Asp Cys Met Tyr Ala Pro Val Leu

245	250	255
-----	-----	-----

Gly Val Pro Pro Ala Val Arg Pro Thr Pro Cys Ala Pro Leu Ala Glu

260	265	270
-----	-----	-----

Cys Lys Gly Ser Leu Leu Asp Asp Ser Ala Gly Lys Ser Thr Glu Asp

275 280 285

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

290 295 300

Gly Glu Ser Leu Gly Cys Ser Gly Ser Ala Ala Ala Gly Ser Ser Gly

305 310 315 320

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

325 330 335

Asp Glu Ala Ala Ala Tyr Gln Ser Arg Asp Tyr Tyr Asn Phe Pro Leu

340 345 350

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

355 360 365

Arg Ile Lys Leu Glu Asn Pro Leu Asp Tyr Gly Ser Ala Trp Ala Ala

370 375 380

Ala Ala Ala Gln Cys Arg Tyr Gly Asp Leu Ala Ser Leu His Gly Ala

385 390 395 400

Gly Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Ser Pro Ser Ala Ala Ala Ser Ser

405 410 415

Ser Trp His Thr Leu Phe Thr Ala Glu Glu Gly Gln Leu Tyr Gly Pro

420 425 430

Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly

435 440 445

Glu Ala Gly Ala Val Ala Pro Tyr Gly Tyr Thr Arg Pro Pro Gln Gly

450 455 460

Leu Ala Gly Gln Glu Gly Asp Phe Thr Ala Pro Asp Val Trp Tyr Pro

465 470 475 480

Gly Gly Met Val Ser Arg Val Pro Tyr Pro Ser Pro Thr Cys Val Lys

485 490 495

Ser Glu Met Gly Pro Trp Met Asp Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Gly Asp

500 505 510

Met Arg Leu Glu Thr Ala Arg Asp His Val Leu Pro Ile Asp Tyr Tyr

515 520 525

Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys Leu Ile Cys Gly Asp Glu Ala Ser Gly

530 535 540

Cys His Tyr Gly Ala Leu Thr Cys Gly Ser Cys Lys Val Phe Phe Lys

545 550 555 560

Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln Lys Tyr Leu Cys Ala Ser Arg Asn Asp

565 570 575

Cys Thr Ile Asp Lys Phe Arg Arg Lys Asn Cys Pro Ser Cys Arg Leu

580 585 590

Arg Lys Cys Tyr Glu Ala Gly Met Thr Leu Gly Ala Arg Lys Leu Lys

595 600 605

Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu Gln Glu Glu Gly Glu Ala Ser Ser Thr

610 615 620

Thr Ser Pro Thr Glu Glu Thr Ala Gln Lys Leu Thr Val Ser His Ile

625 630 635 640

Glu Gly Tyr Glu Cys Gln Pro Ile Phe Leu Asn Val Leu Glu Ala Ile

645 650 655

Glu Pro Gly Val Val Cys Ala Gly His Asp Asn Asn Gln Pro Asp Ser

660 665 670

Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn Glu Leu Gly Glu Arg Gln Leu

675 680 685

Val His Val Val Lys Trp Ala Lys Ala Leu Pro Gly Phe Arg Asn Leu

690 695 700

His Val Asp Asp Gln Met Ala Val Ile Gln Tyr Ser Trp Met Gly Leu

705 710 715 720

Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg Ser Phe Thr Asn Val Asn Ser Arg

725 730 735

Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp Leu Val Phe Asn Glu Tyr Arg Met His

740 745 750

Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys Val Arg Met Arg His Leu Ser Gln

755 760 765

Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr Pro Gln Glu Phe Leu Cys Met Lys

770 775 780

Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile Ile Pro Val Asp Gly Leu Lys Asn Gln

785 790 795 800

Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met Asn Tyr Ile Lys Glu Leu Asp Arg

805 810 815

Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn Pro Thr Ser Cys Ser Arg Arg Phe

820 825 830

Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Ser Val Gln Pro Ile Ala Arg Glu

835 840 845

Leu His Gln Phe Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys Ser His Met Val Ser

850 855 860

Val Asp Phe Pro Glu Met Met Ala Glu Ile Ile Ser Val Gln Val Pro

865 870 875 880

Lys Ile Leu Ser Gly Val Lys Pro Ile Tyr Phe His Thr Gln

885 890 895

<210> 13

<211> 895

<212> PRT

<213> Macaca mulatta

<400> 13

Met Glu Val Gln Leu Gly Leu Arg Val Tyr Pro Arg Pro Pro Ser

1 5 10 15

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

20 25 30

Val Ile Gln Asn Pro Gly Pro Arg His Pro Glu Ala Ala Ser Ala Ala

35 40 45

Pro Pro Gly Ala Ser Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Glu Thr

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

Gly Cys Val Pro Glu Pro Gly Ala Ala Val Ala Ala Gly Lys Gly Leu

115 120 125

Pro Gln Gln Leu Pro Ala Pro Pro Asp Glu Asp Asp Ser Ala Ala Pro

130 135 140

Ser Thr Leu Ser Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro Gly Leu Ser Ser Cys

145 150 155 160

Ser Ala Asp Leu Lys Asp Ile Leu Ser Glu Ala Ser Thr Met Gln Leu

165 170 175

Leu Gln Gln Gln Gln Glu Ala Val Ser Glu Gly Ser Ser Ser Gly

180 185 190

Arg Ala Arg Glu Ala Ser Gly Ala Pro Thr Ser Ser Lys Asp Asn Tyr

195 200 205

Leu Glu Gly Thr Ser Thr Ile Ser Asp Ser Ala Lys Glu Leu Cys Lys

210 215 220

Ala Val Ser Val Ser Met Gly Leu Gly Val Glu Ala Leu Glu His Leu

225 230 235 240

Ser Pro Gly Glu Gln Leu Arg Gly Asp Cys Met Tyr Ala Pro Val Leu

245 250 255

Gly Val Pro Pro Ala Val Arg Pro Thr Pro Cys Ala Pro Leu Ala Glu

260 265 270

Cys Lys Gly Ser Leu Leu Asp Asp Ser Ala Gly Lys Ser Thr Glu Asp

275 280 285

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

290 295 300

Gly Glu Ser Leu Gly Cys Ser Gly Ser Ala Ala Ala Gly Ser Ser Gly

305 310 315 320

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

325	330	335
Asp Glu Ala Ala Ala Tyr Gln Ser Arg Asp Tyr Tyr Asn Phe Pro Leu		
340	345	350
Ala Leu Ala Gly Pro Pro Pro Pro Pro His Pro His Ala		
355	360	365
Arg Ile Lys Leu Glu Asn Pro Leu Asp Tyr Gly Ser Ala Trp Ala Ala		
370	375	380
Ala Ala Ala Gln Cys Arg Tyr Gly Asp Leu Ala Ser Leu His Gly Ala		
385	390	395
Gly Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Ser Pro Ser Ala Ala Ala Ser Ser		
405	410	415
Ser Trp His Thr Leu Phe Thr Ala Glu Glu Gly Gln Leu Tyr Gly Pro		
420	425	430
Cys Gly Ala Gly		
435	440	445
Glu Ala Gly Ala Val Ala Pro Tyr Gly Tyr Thr Arg Pro Pro Gln Gly		
450	455	460
Leu Ala Gly Gln Glu Gly Asp Phe Thr Ala Pro Asp Val Trp Tyr Pro		
465	470	475
Gly Gly Met Val Ser Arg Val Pro Tyr Pro Ser Pro Thr Cys Val Lys		
485	490	495
Ser Glu Met Gly Pro Trp Met Asp Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Gly Asp		
500	505	510
Met Arg Leu Glu Thr Ala Arg Asp His Val Leu Pro Ile Asp Tyr Tyr		
515	520	525
Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys Leu Ile Cys Gly Asp Glu Ala Ser Gly		
530	535	540
Cys His Tyr Gly Ala Leu Thr Cys Gly Ser Cys Lys Val Phe Phe Lys		
545	550	555
Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln Lys Tyr Leu Cys Ala Ser Arg Asn Asp		
565	570	575

Cys Thr Ile Asp Lys Phe Arg Arg Lys Asn Cys Pro Ser Cys Arg Leu
 580 585 590
 Arg Lys Cys Tyr Glu Ala Gly Met Thr Leu Gly Ala Arg Lys Leu Lys
 595 600 605
 Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu Gln Glu Glu Gly Glu Ala Ser Ser Thr
 610 615 620
 Thr Ser Pro Thr Glu Glu Thr Ala Gln Lys Leu Thr Val Ser His Ile
 625 630 635 640
 Glu Gly Tyr Glu Cys Gln Pro Ile Phe Leu Asn Val Leu Glu Ala Ile
 645 650 655
 Glu Pro Gly Val Val Cys Ala Gly His Asp Asn Asn Gln Pro Asp Ser
 660 665 670
 Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn Glu Leu Gly Glu Arg Gln Leu
 675 680 685
 Val His Val Val Lys Trp Ala Lys Ala Leu Pro Gly Phe Arg Asn Leu
 690 695 700
 His Val Asp Asp Gln Met Ala Val Ile Gln Tyr Ser Trp Met Gly Leu
 705 710 715 720
 Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg Ser Phe Thr Asn Val Asn Ser Arg
 725 730 735
 Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp Leu Val Phe Asn Glu Tyr Arg Met His
 740 745 750
 Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys Val Arg Met Arg His Leu Ser Gln
 755 760 765
 Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr Pro Gln Glu Phe Leu Cys Met Lys
 770 775 780
 Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile Ile Pro Val Asp Gly Leu Lys Asn Gln
 785 790 795 800
 Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met Asn Tyr Ile Lys Glu Leu Asp Arg
 805 810 815
 Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn Pro Thr Ser Cys Ser Arg Arg Phe

820	825	830
Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Ser Val Gln Pro Ile Ala Arg Glu		
835	840	845
Leu His Gln Phe Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys Ser His Met Val Ser		
850	855	860
Val Asp Phe Pro Glu Met Met Ala Glu Ile Ile Ser Val Gln Val Pro		
865	870	875
Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val Lys Pro Ile Tyr Phe His Thr Gln		
885	890	895
<210> 14		
<211> 911		
<212> PRT		
<213> Pan troglodyte		
<400> 14		
Met Glu Val Gln Leu Gly Leu Gly Arg Val Tyr Pro Arg Pro Pro Ser		
1	5	10
Lys Thr Tyr Arg Gly Ala Phe Gln Asn Leu Phe Gln Ser Val Arg Glu		
20	25	30
Val Ile Gln Asn Pro Gly Pro Arg His Pro Glu Ala Ala Ser Ala Ala		
35	40	45
Pro Pro Gly Ala Ser Leu Leu Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln		
50	55	60
Gln Glu Thr		
65	70	75
Ser Pro Arg Gln Gln Gln Gln Gly Glu Asp Gly Ser Pro Gln Ala		
85	90	95
His Arg Arg Gly Pro Thr Gly Tyr Leu Val Leu Asp Glu Glu Gln Gln		
100	105	110
Pro Ser Gln Pro Gln Ser Ala Pro Glu Cys His Pro Glu Arg Gly Cys		
115	120	125
Val Pro Glu Pro Gly Ala Ala Val Ala Ala Ser Lys Gly Leu Pro Gln		

130	135	140
Gln Leu Pro Ala Pro Pro Asp Glu Asp Asp Ser Ala Ala Pro Ser Thr		
145	150	155
Leu Ser Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro Gly Leu Ser Ser Cys Ser Ala		
165	170	175
Asp Leu Lys Asp Ile Leu Ser Glu Ala Ser Thr Met Gln Leu Leu Gln		
180	185	190
Gln Gln Gln Glu Ala Val Ser Glu Gly Ser Ser Ser Gly Arg Ala		
195	200	205
Arg Glu Ala Ser Gly Ala Pro Thr Ser Ser Lys Asp Asn Tyr Leu Gly		
210	215	220
Gly Thr Ser Thr Ile Ser Asp Ser Ala Lys Glu Leu Cys Lys Ala Val		
225	230	235
Ser Val Ser Met Gly Leu Gly Val Glu Ala Leu Glu His Leu Ser Pro		
245	250	255
Gly Glu Gln Leu Arg Gly Asp Cys Met Tyr Ala Pro Leu Leu Gly Val		
260	265	270
Pro Pro Ala Val Arg Pro Thr Pro Cys Ala Pro Leu Ala Glu Cys Lys		
275	280	285
Gly Ser Leu Leu Asp Asp Ser Ala Gly Lys Ser Thr Glu Asp Thr Ala		
290	295	300
Glu Tyr Ser Pro Phe Lys Gly Gly Tyr Thr Lys Gly Leu Glu Gly Glu		
305	310	315
Ser Leu Gly Cys Ser Gly Ser Ala Ala Ala Gly Ser Ser Gly Thr Leu		
325	330	335
Glu Leu Pro Ser Thr Leu Ser Leu Tyr Lys Ser Gly Ala Leu Asp Glu		
340	345	350
Ala Ala Ala Tyr Gln Ser Arg Asp Tyr Tyr Asn Phe Pro Leu Ala Leu		
355	360	365
Ala Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Pro His Ala Arg Ile		
370	375	380

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

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

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

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

Gly
 450 455 460

Glu Ala Gly Ala Val Ala Pro Tyr Gly Tyr Thr Arg Pro Pro Gln Gly
 465 470 475 480

Leu Ala Gly Gln Glu Gly Asp Phe Thr Ala Pro Asp Val Trp Tyr Pro
 485 490 495

Gly Gly Met Val Ser Arg Val Pro Tyr Pro Ser Pro Thr Cys Val Lys
 500 505 510

Ser Glu Met Gly Pro Trp Met Asp Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Gly Asp
 515 520 525

Met Arg Leu Glu Thr Ala Arg Asp His Val Leu Pro Ile Asp Tyr Tyr
 530 535 540

Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys Leu Ile Cys Gly Asp Glu Ala Ser Gly
 545 550 555 560

Cys His Tyr Gly Ala Leu Thr Cys Gly Ser Cys Lys Val Phe Phe Lys
 565 570 575

Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln Lys Tyr Leu Cys Ala Ser Arg Asn Asp
 580 585 590

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

Arg Lys Cys Tyr Glu Ala Gly Met Thr Leu Gly Ala Arg Lys Leu Lys
 610 615 620

Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu Gln Glu Glu Gly Glu Ala Ser Ser Thr

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

Val Asp Phe Pro Glu Met Met Ala Glu Ile Ile Ser Val Gln Val Pro
 885 890 895
 Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val Lys Pro Ile Tyr Phe His Thr Gln
 900 905 910

<210> 15
 <211> 895
 <212> PRT
 <213> Papio hamadryas
 <400> 15

Met Glu Val Gln Leu Gly Leu Gly Arg Val Tyr Pro Arg Pro Pro Ser
 1 5 10 15
 Lys Thr Tyr Arg Gly Ala Phe Gln Asn Leu Phe Gln Ser Val Arg Glu
 20 25 30
 Val Ile Gln Asn Pro Gly Pro Arg His Pro Glu Ala Ala Ser Ala Ala
 35 40 45
 Pro Pro Gly Ala Ser Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Glu

50 55 60
 Thr Ser Pro Arg Gln Gln Gln Gln Gln Gly Glu Asp Gly Ser Pro
 65 70 75 80
 Gln Ala His Arg Arg Gly Pro Thr Gly Tyr Leu Val Leu Asp Glu Glu
 85 90 95
 Gln Gln Pro Ser Gln Pro Gln Ser Ala Pro Glu Cys His Pro Glu Arg
 100 105 110
 Gly Cys Val Pro Glu Pro Gly Ala Ala Val Ala Ala Gly Lys Gly Leu

115 120 125
 Pro Gln Gln Leu Pro Ala Pro Pro Asp Glu Asp Asp Ser Ala Ala Pro
 130 135 140
 Ser Thr Leu Ser Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro Gly Leu Ser Ser Cys
 145 150 155 160
 Ser Ala Asp Leu Lys Asp Ile Leu Ser Glu Ala Ser Thr Met Gln Leu
 165 170 175

Leu Gln Gln Gln Gln Glu Ala Val Ser Glu Gly Ser Ser Ser Gly

180 185 190

Arg Ala Arg Glu Ala Ser Gly Ala Pro Thr Ser Ser Lys Asn Tyr

195 200 205

Leu Gly Gly Thr Ser Thr Ile Ser Asp Ser Ala Lys Glu Leu Cys Lys

210 215 220

Ala Val Ser Val Ser Met Gly Leu Gly Val Glu Ala Leu Glu His Leu

225 230 235 240

Ser Pro Gly Glu Gln Leu Arg Gly Asp Cys Met Tyr Ala Pro Val Leu

245 250 255

Gly Val Pro Pro Ala Val Arg Pro Thr Pro Cys Ala Pro Leu Ala Glu

260 265 270

Cys Lys Gly Ser Leu Leu Asp Asp Ser Ala Gly Lys Ser Thr Glu Asp

275 280 285

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

290 295 300

Gly Glu Ser Leu Gly Cys Ser Gly Ser Ala Ala Ala Gly Ser Ser Gly

305 310 315 320

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

325 330 335

Asp Glu Ala Ala Ala Tyr Gln Ser Arg Asp Tyr Tyr Asn Phe Pro Leu

340 345 350

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

355 360 365

Arg Ile Lys Leu Glu Asn Pro Leu Asp Tyr Gly Ser Ala Trp Ala Ala

370 375 380

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

385 390 395 400

Gly Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Ser Pro Ser Ala Ala Ala Ser Ser

405 410 415

Ser Trp His Thr Leu Phe Thr Ala Glu Glu Gly Gln Leu Tyr Gly Pro

420	425	430
Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly		
435	440	445
Glu Ala Gly Ala Val Ala Pro Tyr Gly Tyr Thr Arg Pro Pro Gln Gly		
450	455	460
Leu Ala Gly Gln Glu Gly Asp Phe Thr Ala Pro Asp Val Trp Tyr Pro		
465	470	475
Gly Gly Met Val Ser Arg Val Pro Tyr Pro Ser Pro Thr Cys Val Lys		
485	490	495
Ser Glu Met Gly Pro Trp Met Asp Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Gly Asp		
500	505	510
Met Arg Leu Glu Thr Ala Arg Asp His Val Leu Pro Ile Asp Tyr Tyr		
515	520	525
Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys Leu Ile Cys Gly Asp Glu Ala Ser Gly		
530	535	540
Cys His Tyr Gly Ala Leu Thr Cys Gly Ser Cys Lys Val Phe Phe Lys		
545	550	555
Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln Lys Tyr Leu Cys Ala Ser Arg Asn Asp		
565	570	575
Cys Thr Ile Asp Lys Phe Arg Arg Lys Asn Cys Pro Ser Cys Arg Leu		
580	585	590
Arg Lys Cys Tyr Glu Ala Gly Met Thr Leu Gly Ala Arg Lys Leu Lys		
595	600	605
Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu Gln Glu Glu Gly Glu Ala Ser Ser Thr		
610	615	620
Thr Ser Pro Thr Glu Glu Thr Ala Gln Lys Leu Thr Val Ser His Ile		
625	630	635
Glu Gly Tyr Glu Cys Gln Pro Ile Phe Leu Asn Val Leu Glu Ala Ile		
645	650	655
Glu Pro Gly Val Val Cys Ala Gly His Asp Asn Asn Gln Pro Asp Ser		
660	665	670

Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn Glu Leu Gly Glu Arg Gln Leu

675 680 685

Val His Val Val Lys Trp Ala Lys Ala Leu Pro Gly Phe Arg Asn Leu

690 695 700

His Val Asp Asp Gln Met Ala Val Ile Gln Tyr Ser Trp Met Gly Leu

705 710 715 720

Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg Ser Phe Thr Asn Val Asn Ser Arg

725 730 735

Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp Leu Val Phe Asn Glu Tyr Arg Met His

740 745 750

Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys Val Arg Met Arg His Leu Ser Gln

755 760 765

Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr Pro Gln Glu Phe Leu Cys Met Lys

770 775 780

Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile Ile Pro Val Asp Gly Leu Lys Asn Gln

785 790 795 800

Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met Asn Tyr Ile Lys Glu Leu Asp Arg

805 810 815

Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn Pro Thr Ser Cys Ser Arg Arg Phe

820 825 830

Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Ser Val Gln Pro Ile Ala Arg Glu

835 840 845

Leu His Gln Phe Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys Ser His Met Val Ser

850 855 860

Val Asp Phe Pro Glu Met Met Ala Glu Ile Ile Ser Val Gln Val Pro

865 870 875 880

Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val Lys Pro Ile Tyr Phe His Thr Gln

885 890 895

<210> 16

<211> 896

<212> PRT

<213> Sus scrofa

<400> 16

Met Glu Val Gln Leu Gly Leu Arg Val Tyr Pro Arg Pro Pro Ser

1 5 10 15

Lys Thr Phe Arg Gly Ala Phe Gln Asn Leu Phe Gln Ser Val Arg Glu

20 25 30

Val Ile Gln Asn Pro Gly Pro Arg His Pro Glu Ala Ala Ser Ala Ala

35 40 45

Pro Pro Gly Ala Arg Leu Gln Gln Gln Leu Gln Gln Glu Thr

50 55 60

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

65 70 75 80

Ser Pro Gln Val Gln Ser Arg Gly Pro Thr Gly Tyr Leu Ala Leu Asp

85 90 95

Glu Lys Gln Gln Pro Ser Gln Gln Ser Ala Pro Glu Cys His Pro

100 105 110

Glu Ser Gly Cys Thr Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Ala Ala Ser Lys

115 120 125

Gly Leu Gln Gln Gln Pro Pro Ala Pro Pro Asp Glu Asp Asp Ser Ala

130 135 140

Ala Pro Ser Thr Leu Ser Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro Gly Leu Ser

145 150 155 160

Ser Cys Ser Thr Asp Leu Lys Asp Ile Leu Ser Glu Ala Gly Thr Met

165 170 175

Gln Leu Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Glu Ala Val

180 185 190

Ser Glu Gly Asn Ser Ser Gly Arg Ala Arg Glu Ala Thr Gly Ala Pro

195 200 205

Ile Ser Ser Lys Asp Ser Tyr Leu Gly Gly Ser Ser Thr Ile Ser Asp

210 215 220

Ser Ala Lys Glu Leu Cys Lys Ala Val Ser Val Ser Met Gly Leu Gly

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

Val Glu Ala Leu Glu His Leu Ser Pro Gly Glu Gln Leu Arg Gly Asp

245	250	255
-----	-----	-----

Cys Met Tyr Ala Pro Leu Leu Thr Gly Pro Pro Ser Val Arg Pro Thr

260	265	270
-----	-----	-----

Pro Cys Ala Pro Leu Ala Glu Cys Lys Gly Ser Leu Leu Asp Asp Gly

275	280	285
-----	-----	-----

Pro Gly Lys Ser Asn Glu Glu Thr Ala Glu Tyr Ser Pro Phe Lys Ala

290	295	300
-----	-----	-----

Gly Tyr Thr Lys Gly Leu Asp Ser Glu Ser Leu Gly Cys Ser Ser Gly

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

Gly Glu Ala Gly Gly Ser Gly Thr Leu Glu Leu Pro Ser Ala Leu Ser

325	330	335
-----	-----	-----

Leu Tyr Lys Ser Gly Ala Leu Asp Asp Val Ala Ala Tyr Pro Ser Arg

340	345	350
-----	-----	-----

Asp Tyr Tyr Asn Phe Pro Leu Ala Leu Ala Gly Pro Pro Pro Pro

355	360	365
-----	-----	-----

Pro Pro Pro His Pro His Ala Arg Ile Lys Leu Glu Asn Pro Leu Asp

370	375	380
-----	-----	-----

Tyr Gly Ser Ala Trp Ala Ala Ala Ala Gln Cys Arg Tyr Gly Asp

385	390	395	400
-----	-----	-----	-----

Leu Ala Ser Leu His Gly Gly Ala Pro Gly Pro Gly Ser Gly Ser

405	410	415
-----	-----	-----

Pro Ser Ala Thr Ser Ser Ser Trp His Thr Leu Phe Thr Ala Glu

420	425	430
-----	-----	-----

Glu Ser Gln Leu Tyr Gly Pro Cys Gly Gly Gly Gly Ser Ala

435	440	445
-----	-----	-----

Gly Glu Ala Gly Ala Val Ala Pro Tyr Gly Tyr Thr Arg Pro Pro Gln

450	455	460
-----	-----	-----

Gly Leu Ala Gly Gln Glu Gly Asp Leu Ala Ile Pro Asp Ile Trp Tyr

465	470	475	480
-----	-----	-----	-----

Pro Gly Gly Val Val Ser Arg Val Pro Tyr Pro Ser Pro Ser Cys Val

485 490 495

Lys Ser Glu Met Gly Pro Trp Met Glu Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Gly

500 505 510

Asp Met Arg Leu Glu Pro Thr Arg Asp His Val Leu Pro Ile Asp Tyr

515 520 525

Tyr Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys Leu Ile Cys Gly Asp Glu Ala Ser

530 535 540

Gly Cys His Tyr Gly Ala Leu Thr Cys Gly Ser Cys Lys Val Phe Phe

545 550 555 560

Lys Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln Lys Tyr Leu Cys Ala Ser Arg Asn

565 570 575

Asp Cys Thr Ile Asp Lys Phe Arg Arg Lys Asn Cys Pro Ser Cys Arg

580 585 590

Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Ala Gly Met Thr Leu Gly Ala Arg Lys Leu

595 600 605

Lys Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu Gln Glu Glu Gly Glu Ala Ser Ser

610 615 620

Ala Thr Ser Pro Thr Glu Glu Pro Ala Gln Lys Leu Thr Val Ser His

625 630 635 640

Ile Glu Gly Tyr Glu Cys Gln Pro Ile Phe Leu Asn Val Leu Glu Ala

645 650 655

Ile Glu Pro Gly Val Val Cys Ala Gly His Asp Asn Asn Gln Pro Asp

660 665 670

Ser Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn Glu Leu Gly Glu Arg Gln

675 680 685

Leu Val His Val Val Lys Trp Ala Lys Ala Leu Pro Gly Phe Arg Asn

690 695 700

Leu His Val Asp Asp Gln Met Ala Val Ile Gln Tyr Ser Trp Met Gly

705 710 715 720

Leu Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg Ser Phe Thr Asn Val Asn Ser

725	730	735
Arg Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp Leu Val Phe Asn Glu Tyr Arg Met		
740	745	750
His Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys Val Arg Met Arg His Leu Ser		
755	760	765
Gln Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr Pro Gln Glu Phe Leu Cys Met		
770	775	780
Lys Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile Ile Pro Val Asp Gly Leu Lys Asn		
785	790	795
Gln Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met Asn Tyr Ile Lys Glu Leu Asp		
805	810	815
Arg Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn Pro Thr Ser Cys Ser Arg Arg		
820	825	830
Phe Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Ser Val Gln Pro Ile Ala Arg		
835	840	845
Glu Leu His Gln Phe Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys Ser His Met Val		
850	855	860
Ser Val Asp Phe Pro Glu Met Met Ala Glu Ile Ile Ser Val Gln Val		
865	870	875
Pro Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val Lys Pro Ile Tyr Phe His Thr Gln		
885	890	895
<210> 17		
<211> 709		
<212> PRT		
<213> Oryctolagus cuniculus		
<400> 17		
His His Gln Gln Gln Asp Ala Ala Thr Glu Gly Ser Ser Ser Gly		
1	5	10
Arg Ala Arg Arg Pro Ser Gly Ala Ser Thr Ser Ser Lys Asp Ser Tyr		
20	25	30
Leu Gly Ser Thr Ser Val Ile Ser Asp Ser Ala Lys Glu Leu Cys Lys		

35	40	45
Ala Val Ser Val Ser Leu Gly Leu Gly Val Glu Ala Leu Glu His Leu		
50	55	60
Ser Ser Gly Glu Gln Leu Arg Gly Asp Cys Met Tyr Ala Pro Leu Leu		
65	70	75
Gly Gly Pro Pro Val Val Arg Pro Thr Pro Cys Leu Pro Leu Val Glu		
85	90	95
Cys Lys Gly Ser Leu Leu Asp Asp Gly Pro Gly Lys Gly Thr Glu Glu		
100	105	110
Thr Ala Glu Tyr Thr Pro Phe Lys Gly Gly Tyr Asn Lys Gly Leu Glu		
115	120	125
Ala Glu Ser Leu Gly Cys Ser Gly Ser Gly Glu Ala Gly Ser Ser Gly		
130	135	140
Thr Leu Glu Leu Pro Ser Thr Leu Ser Leu Tyr Lys Ser Gly Thr Leu		
145	150	155
Asp Glu Ala Ala Ala Tyr Gln Thr Arg Asp Tyr Tyr Asn Phe Pro Leu		
165	170	175
Ala Leu Ala Gly Gln Pro Pro Pro His Pro Arg Arg Ile Lys Leu		
180	185	190
Glu Asn Pro Leu Asp Tyr Gly Ser Ala Trp Ala Ala Ala Ala Gln		
195	200	205
Cys Arg Tyr Gly Asp Leu Ala Ser Leu His Gly Gly Gly Ala Ala Gly		
210	215	220
Pro Gly Ser Gly Ser Pro Ser Thr Ala Ala Ser Ser Ser Trp His Thr		
225	230	235
Leu Phe Thr Thr Glu Glu Gly Gln Leu Tyr Gly Leu Cys Gly Gly Gly		
245	250	255
Gly Gly Ser Gly Pro Gly Glu Ala Gly Ala Val Ala Pro Tyr Gly Tyr		
260	265	270
Thr Arg Pro Pro Gln Gly Leu Thr Gly Gln Glu Gly Asp Phe Pro Ala		
275	280	285

Pro Glu Val Trp Tyr Pro Gly Gly Val Val Ser Arg Val Pro Tyr Pro

290 295 300
Asn Pro Ser Cys Val Lys Ser Glu Met Gly Pro Trp Met Glu Ser Tyr

305 310 315 320
Ser Gly Pro Tyr Gly Asp Met Arg Leu Glu Thr Ala Arg Asp His Val

325 330 335
Leu Pro Ile Asp Tyr Tyr Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys Leu Ile Cys

340 345 350
Gly Asp Glu Ala Ser Gly Cys His Tyr Gly Ala Leu Thr Cys Gly Ser

355 360 365
Cys Lys Val Phe Phe Lys Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln Lys Tyr Leu

370 375 380
Cys Ala Ser Arg Asn Asp Cys Thr Ile Asp Lys Phe Arg Arg Lys Asn

385 390 395 400
Cys Pro Ser Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Ala Gly Met Thr Leu

405 410 415
Gly Ala Arg Lys Leu Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu Gln Glu Glu

420 425 430
Gly Glu Ser Ser Ser Ala Ser Ser Pro Thr Glu Asp Thr Thr Gln Lys

435 440 445
Leu Thr Val Ser His Ile Glu Gly Tyr Glu Cys Gln Pro Ile Phe Leu

450 455 460
Asn Val Leu Glu Ala Ile Glu Pro Gly Val Val Cys Ala Gly His Asp

465 470 475 480
Asn Asn Gln Pro Asp Ser Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn Glu

485 490 495
Leu Gly Glu Arg Gln Leu Val His Val Val Lys Trp Ala Lys Ala Leu

500 505 510
Pro Gly Phe Arg Asn Leu His Val Asp Asp Gln Met Ala Val Ile Gln

515 520 525
Tyr Ser Trp Met Gly Leu Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg Ser Phe

530	535	540
Thr Asn Val Asn Ser Arg Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp Leu Val Phe		
545	550	555
Asn Glu Tyr Arg Met His Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys Val Arg		
565	570	575
Met Arg His Leu Ser Gln Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr Pro Gln		
580	585	590
Glu Phe Leu Cys Met Lys Ala Leu Leu Phe Ser Ile Ile Pro Val		
595	600	605
Asp Gly Leu Lys Asn Gln Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met Asn Tyr		
610	615	620
Ile Lys Glu Leu Asp Arg Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn Pro Thr		
625	630	635
Ser Cys Ser Arg Arg Phe Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Ser Val		
645	650	655
Gln Pro Ile Ala Arg Glu Leu His Gln Phe Thr Phe Asp Leu Leu Ile		
660	665	670
Lys Ser His Met Val Ser Val Asp Phe Pro Glu Met Met Ala Glu Ile		
675	680	685
Ile Ser Val Gln Val Pro Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val Lys Pro Ile		
690	695	700
Tyr Phe His Thr Gln		
705		
<210> 18		
<211> 2760		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 18		
atggaagtgc agttagggct gggagggtc taccctcgcc cgccgtccaa gacctacgca 60		
ggagcttcc agaatctgtt ccagagcgtg cgcgaagtga tccagaaccc gggccccagg 120		
cacccagagg ccgcgagcgc agcacctccc ggccgcagg tt tgctgctgct gcagcagcag 180		

cagcagcgc agcagcagca gcagcagcag cagcagcgc agcagcagca gcagcagcaa	240
gagactagcc ccaggcagca gcagcagcag cagggtgagg atggttctcc ccaagccat	300
cgttagaggcc ccacaggcta cctggtcctg gatgaggaac agcaacctc acagccgcag	360
tcggcccigg agtgcaccc cgagagagg tgcgtccag agctggagc cgccgtggcc	420
gccagcaagg ggctgcccga gcagctgcca gcaccccg acgaggatga ctcaagctgcc	480
ccatccacgt tgccctgct gggccccact ttcccccgt taagcagctg ctccgctgac	540
cttaaagaca tcctgagcga ggccagcacc atgcaactcc ttcaagcaaca gcagcaggaa	600
gcagtatccg aaggcagcag cagcggaga gcgaggagg ctcggggc tcccacttcc	660
tccaaggaca attacttagg gggcacttcg accatttcg acaacccaa ggagtgtgt	720
aaggcagtgt cgggtccat gggctgggt gtggaggcgt tggagcatct gagtccaggg	780
gaacagcttc ggggggattt catgtacgcc ccactttgg gagttccacc cgctgtgcgt	840
cccactcctt gtgcccatt ggccgaatgc aaaggttctc tgctagacga cagcgcaggc	900
aagagcactg aagatactgc ttagtattcc ctttcaagg gaggttacac caaaggctaa	960
gaaggcgaga gcctaggctg ctctggcagc gctgcagcag ggagctccgg gacacttga	1020
ctgccgtcta ccctgtctct ctacaagtcc ggagcactgg acgaggcagc tgcgtaccag	1080
agtgcgcact actacaactt tccactggct ctggccggac cgccgcggcc tccggccct	1140
ccccatcccc acgctcgcat caagctggag aaccgcgtgg actacggcag cgccgtggcg	1200
gctgcccgg cgcaactggc ctatggggac ctggcgagcc tgcgtgcgc ggggtgcagcg	1260
ggaccgggtt ctgggtcacc ctcagccgcc gcttccat cctggcacac tctttcaca	1320
gccgaagaag gccagttgtt tggaccgtgt ggtgggtgtt ggggtgggtt cggccggcc	1380
ggcggcggcg gggccggccgg cggccggccgg ggcggccggc aggccggagc tgtagccccc	1440
tacggctaca ctggccccc tcagggctg gcggccagg aaagcgactt cacccaccc	1500
gatgtgttgtt accctggcg catgtgagc agagtgcctt atcccgatcc cacttgtgtc	1560
aaaagcgaaa tggcccttg gatggatgc tactccggac cttacggga catgcgttt	1620
gagactgcca gggaccatgt ttggccatt gactattact ttccacccca gaagacctgc	1680
ctgatctgtg gagatgaagc ttctgggtgt cactatggag ctctcacatg tggaagctgc	1740
aaggctttt tcaaaagagc cgctgaaggg aaacagaagt acctgtgcgc cagcagaat	1800
gattgcacta ttgataaatt ccgaaggaaa aattgtccat ctgtcgct tcggaaatgt	1860
tatgaagcag ggatgactct gggagcccg aagctgaaga aacttggtaa tctgaaacta	1920
caggaggaag gagaggcttc cagcaccacc agcccccactg aggagacaac ccagaagctg	1980
acagtgtcac acattgaagg ctatgaatgt cagccatct ttctgaatgt cctggaagcc	2040

attgagccag gtgtagtgtg tgctggacac gacaacaacc agcccgactc ctttgcagcc	2100
ttgctctcta gcctcaatga actgggagag agacagctg tacacgtggt caagtggcc	2160
aaggccttgc ctggcttcg caacttacac gtggacgacc agatggctgt cattcagtag	2220
tcctggatgg ggctcatgtt gtttgccatg ggctggcgat cttcaccaa tgtcaactcc	2280
aggatgtct acttcgcccc tgcgttggtt ttcaatgagt accgcatgca caagtccgg	2340
atgtacagcc agtgtgtccg aatgaggcac ctctctcaag agtttggatg gtcctaaatc	2400
accccccagg aattcctgtg catgaaagca ctgctactct tcagcattat tccagtgat	2460
gggctgaaaa atcaaaaatt ctttgcataa cttcgaatga actacatcaa ggaactcgat	2520
cgtatcattt ctttgcataa acatctgtt caagacgtt ctaccagtc	2580
accaagctcc tggactccgt gcagcctatt gcgagagagc tgcatacgat cactttgac	2640
ctgctaatac agtcacacat ggtgagcgtt gactttccgg aaatgtggc agagatcatc	2700
tctgtgcaag tgcccaagat ctttctggg aaagtcaagc ccatctattt ccacacccag	2760
<210> 19	
<211> 2760	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 19	
atgaaagtgc agttagggct gggaaagggtc taccctcgcc cgccgtccaa gacctaccga	60
ggagcttcc agaatctgtt ccagagcgtt cgcaagtgtt tccagaaccc gggccccagg	120
caccagagg ccgcgcgcgc agcacccccc ggccgcgtt tgctgtgtt gcagcagcag	180
cagcagcagc agcagcagca gcagcagcagc cagcagcagc agcagcagca gcagcagcaa	240
gagactagcc ccaggcagca gcagcagcagc cagggtgagg atggttctcc ccaagccat	300
cgtagaggcc ccacaggcta cctggtccgt gatgaggaac agcaaccttc acagccgcag	360
tcggccctgg agtgcaccc cggagaggtt tgctgtcccg agcctggagc cgccgtggcc	420
gccagcaagg ggctgcccgc gcagctgcca gcacccccc acgaggatgtt ctcagctgcc	480
ccatccacgt tgcgtccgtt gggcccccact ttcccccgtt taagcagctt ctccgtgtac	540
cttaaagaca tcctgagcga ggccagcacc atgcaactcc tttagcaaca gcagcagggaa	600
gcagtatccg aaggcagcagc cagcgggaga gcgaggagg ctcgggggc tcccacttcc	660
tccaaggaca attacttagg gggcacttcg accatttcgt acaacgcca ggatgttgt	720
aaggcagtgt cgggtgtccat gggcctgggt gtggaggcgat tggagcatct gagtccaggg	780
gaacagcttc ggggggattt catgtacgcc ccactttgg gagttccacc cgctgtgcgt	840

cccaactcatt gtgcccatggccgaatgc aaaggttctcgcttagacgacagcgcaggc	900
aagagcaactg aagatactgc ttagtattcc cctttaaggaggttacacaaggctaa	960
gaaggcgaga gcctaggctg ctctggcagc gctgcagcag ggagctccgg gacacttga	1020
ctgcgtcta ccctgtctctatacaagtcc ggagcactgg acgaggcagc tgcgtaccag	1080
agtgcgact actacaactt tccactggct ctggccggac cgccgcccccc tccggcgcct	1140
ccccatcccc acgctcgcat caagctggag aacccgctgg actacggcag cgccctggcg	1200
gctgcggcgccgcagtgccgctatggggac ctggcgagcc tgcatggcgcgggtgcagcg	1260
ggacccggtt ctgggtcacc ctcagccgcc gcttccat cctggcacac tctttcaca	1320
gccgaagaag gccagttgtatggaccgtgt ggtgggtgg ggggtgggtgg cggccggcgc	1380
ggcggcggcgcg cggccggcggc ggcggcggcggc aggcgggagc tgttagcccc	1440
tacgctaca ctggcccccc tcagggctg gcccggcagg aaaggcactt caccgcacct	1500
gatgtgtggt accctggcgcatggtgagc agagtgcct atccagtc cacttgtgc	1560
aaaagcgaaa tggccctgt gatggatagctactccggac cttacgggacatgcgttt	1620
gagactgcca gggaccatgt tttgccatt gactattact ttccacccca gaagacgtgc	1680
ctgatctgtg gagatgaagcttctgggtgt cactatggag ctctcacatg tggaagctgc	1740
aaggctttct tcaaaagagc cgctgaaggaaacagaagt acctgtgcgc cagcagaat	1800
gattgcacta ttgataaatt ccgaaggaaa aattgtccat ctgtcgctctcgaaatgt	1860
tatgaagcag ggtatgactt gggagcccgaaagctgaaga aacttggtaatctgaaacta	1920
caggaggaag gagaggcttc cagcaccacc agccccactg aggagacaac ccagaagctg	1980
acagtgtcac acattgaagg ctagaatgt cagccatct ttctgaatgt cctggaaagcc	2040
attgagccag gtgtatgttgctggacac gacaacaacc agcccgactc cttgcagcc	2100
ttgctctcta gcctcaatga actggagag agacagctt tacacgtggta caagtggcc	2160
aaggccttgc ctggcttcgcaacttacac gtggacgacc agatggctgt cattcgtac	2220
tcctggatgg ggctcatgtgttgcctatggcgtggctccatgccttcaccaa tgtcaactcc	2280
aggatgctct acttcggcccc tggatgttttcaatgagt accgcatgca caagtcccg	2340
atgtacagcc agtgtgtccg aatgaggcac ctctctcaag agtttggatg gctccaaatc	2400
accffffcagg aattccctgtg catgaaagca ctgctactct tccaggat tccaggat	2460
gggctgaaaa atcaaaaatt ctttgcataatgcataactacatcaa ggaactcgat	2520
cgtatcatttgcatacggaaaatcccaatccatcgatcaagacgctt ctaccagctc	2580
accaagctcc tggactccgt gcagcctatttgcagagagc tgcatacgatcacttttgc	2640
ctgctaatca agtacacat ggtgagcgtg gactttccggaaatgatggc agagatcatc	2700

tctgtgcaag tgcccaagat ctttctggg aaagtcaagc ccatctattt ccacacccag 2760
 <210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Primer Sequence

<400> 20
 agagactcag aggcgaccat 20
 <210> 21
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Primer Sequence

<400> 21
 atcagcaaac acagcagctc 20
 <210> 22
 <211> 24

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Primer Sequence

<400> 22
 agagctgttg gatgaggacc agaa 24
 <210> 23
 <211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> Primer Sequence

<400> 23
 aggctccaaa ggcaattgac tact 24
 <210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer Sequence	
<400> 24	
gaccaagcgg gttgttattg a	21
<210> 25	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer Sequence	
<400> 25	
tgccttgtcg gtcatatttt tca	23
<210> 26	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer Sequence	
<400> 26	
cggagaacca aacggaaagg	20
<210> 27	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer Sequence	
<400> 27	
cttcggccac agtgaatgc	19
<210> 28	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer Sequence	
<400> 28	
acagcagccg gtttattgtg cttc	24
<210> 29	
<211> 24	

<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer Sequence	
<400> 29	
tggcattcag tctcacacca ctgt	24
<210> 30	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer Sequence	
<400> 30	
accactcacc atcatctcaa ggca	24
<210> 31	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer Sequence	
<400> 31	
tgcttttt tgccagatcc tcgt	24
<210> 32	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer Sequence	
<400> 32	
gccttaccct tgcaagttac	20
<210> 33	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer Sequence	
<400> 33	
gagcatgctg tccactctgt	20
<210> 34	

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer Sequence

<400> 34

cttgcgcatt cccaaggtag atgt

24

<210> 35

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer Sequence

<400> 35

tttcctctcc ttctcgtgct gctt

24

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer Sequence

<400> 36

gagccctgcta cagatggta

20

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer Sequence

<400> 37

tgtctaccag caggacgaag

20

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer Sequence

<400> 38

cctcctgaag aatcgattcc	20
<210> 39	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer Sequence	
<400> 39	
 gagggtccaca cactgaagtt	20
<210> 40	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer Sequence	
<400> 40	
 tttctggct ggccaaacat aagc	24
<210> 41	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer Sequence	
<400> 41	
 acacaaggta atgtgtgggt ccga	24
<210> 42	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer Sequence	
<400> 42	
 cggcagggtt ttgtgtgtgg aaat	24
<210> 43	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer Sequence	

<400> 43	
agaagacaca cagcacagca gaca	24
<210> 44	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer Sequence	
<400> 44	
tagtgaacc agtgtgtctg ccca	24
<210> 45	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer Sequence	
<400> 45	
agcgttcagc acttctgagg tctt	24
<210> 46	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer Sequence	
<400> 46	
cgctctgggtt catctgctct g	21
<210> 47	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer Sequence	
<400> 47	
tcatcaaagg tgctctcgtc tg	22
<210> 48	
<211> 24	
<212> DNA	

<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer Sequence	
<400> 48	
tggagagaa gttcagccat caga	24
<210> 49	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer Sequence	
<400> 49	
aggagagctg cttcgctta gtct	24
<210> 50	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer Sequence	
<400> 50	
acctgctcag ccttgcgtc tgat	24
<210> 51	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer Sequence	
<400> 51	
agatccaggc ttgcttactg tcct	24
<210> 52	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer Sequence	
<400> 52	
attctgggtt gggagtgcaa ggaa	24
<210> 53	

<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer Sequence	
<400> 53	
aggagacatg cccaggatga aaca	24
<210> 54	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer Sequence	
<400> 54	
actaggcagg acattgacat ccca	24
<210> 55	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer Sequence	
<400> 55	
acagtaaaccc tctccacaca tggc	24
<210> 56	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer Sequence	
<400> 56	
tatgacaccc agggtttcg ttca	24
<210> 57	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer Sequence	
<400> 57	
taacgttccc tgcgcggtta caga	24

<210> 58	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer Sequence	
<400> 58	
tcccaaatcc tgacccca	18
<210> 59	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer Sequence	
<400> 59	
accacacagc ccctaggaga	20
<210> 60	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer Sequence	
<400> 60	
acagggtgtgc ccaaataagaa c	21
<210> 61	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer Sequence	
<400> 61	
cctgtcttgg acaagcggag a	21
<210> 62	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Primer Sequence	

<400> 62

gggtcatttc caccaccta aaca

24

<210> 63

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer Sequence

<400> 63

ggagaaaggc cttacagtag tctc

24