



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0028904

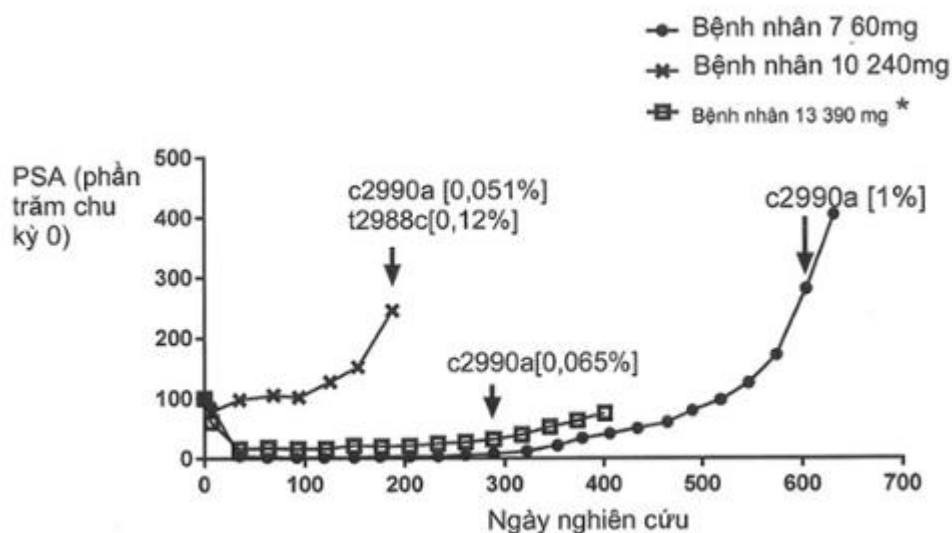
(51)⁷ C12Q 1/6886

(13) B

- (21) 1-2015-00306 (22) 26/07/2013
(86) PCT/US2013/052395 26/07/2013 (87) WO/2014/018926 A1 30/01/2014
(30) 61/676,842 27/07/2012 US; 61/783,763 14/03/2013 US; 61/829,123 30/05/2013 US
(45) 25/07/2021 400 (43) 25/08/2015 329A
(73) ARAGON PHARMACEUTICALS, INC. (US)
12780 E1 Camino Real, Suite #301, San Diego, CA 92130 (US)
(72) JOSEPH, James, David (US); HAGER, Jeffrey H. (US); SENSINTAFFAR, John,
Lee (US); LU, Nhin (US); QIAN, Jing (US); SMITH, Nicholas, D. (US).
(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) PHƯƠNG PHÁP SÀNG LỌC HỢP CHẤT ĐỐI KHÁNG THỤ THỂ ANDROGEN (AR), POLYPEPTIT AR VÀ KIT CHỨA POLYPEPTIT NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến polypeptit thụ thể androgen bị biến đổi kháng sự ức chế bằng cách ức chế thụ thể androgen. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến phân tử axit nucleic được phân lập mã hóa polypeptit AR bị biến đổi, vectơ bao gồm phân tử axit nucleic, tế bào chủ, vi mạch, kit, hệ thống phát hiện AR và kháng thể được phân lập liên kết với polypeptit AR bị biến đổi.



* Được chuyển mạch đến 240mg sau 2 chu kỳ

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến phương pháp sàng lọc chất đối kháng thụ thể androgen (AR). Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến chất đối kháng AR, polypeptit AR, phân tử axit nucleic phân lập được mã hóa polypeptit AR, vector chứa phân tử axit nucleic, tế bào chủ chứa vector, dược phẩm chứa chất đối kháng AR, vi mạch chứa polypeptit AR, kit dùng để phát hiện phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit AR, kháng thể phân lập được liên kết với polypeptit AR và hệ thống phát hiện AR.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thụ thể androgen (“AR”) là protein điều tiết phiên mã được hoạt hóa phối tử mà cảm ứng trung gian của nhiều hiệu quả sinh học thông qua sự tương tác với các androgen nội sinh. Các androgen nội sinh bao gồm steroid như testosterone và dihydrotestosteron. Testosterone được chuyển hóa vào dihydrotestosteron bằng enzym 5 alpha-reductaza ở nhiều mô.

Hoạt tính của các androgen với thụ thể androgen có thể liên quan đến một số bệnh hoặc tình trạng bệnh, như bệnh ung thư phụ thuộc androgen, gây nam hóa ở phụ nữ, và mụn trứng cá, trong số các bệnh khác. Các hợp chất làm suy giảm tác dụng tín hiệu androgen thông qua thụ thể androgen và/hoặc làm giảm nồng độ của thụ thể androgen sử dụng trong điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh, trong đó thụ thể androgen đóng vai trò quan trọng.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Được mô tả ở đây là việc nhận ra các sự biến đổi trong thụ thể androgen (AR) có đặc tính kháng của bệnh nhân để điều trị bằng chất đối kháng thụ thể androgen thế hệ thứ nhất hoặc thứ hai. Theo một số phương án, sự biến đổi là thay thế phenylalanin ở vị trí 876 của polypeptit AR. Theo một số phương án, sự biến đổi là F876L. Theo một số phương án, polypeptit AR được biến đổi kháng lại sự ức chế bằng chất đối kháng thụ thể androgen thế hệ thứ hai được chọn trong số các ARN-509, enzalutamit (MDV3100), và RD162. Theo một số phương án, polypeptit AR được biến đổi kháng lại sự ức chế bằng chất đối kháng thụ thể androgen thế hệ thứ nhất được chọn trong số các bicalutamit, flutamit, hydroxyflutamit hoặc nilutamit. Theo một số phương án, bệnh nhân bị bệnh ung thư. Theo một số phương án, bệnh

ung thư là bệnh ung thư tiền liệt tuyến, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư gan (ví dụ, thuộc tế bào gan), hoặc bệnh ung thư bàng quang. Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh ung thư tiền liệt tuyến kháng lại việc cắt. Theo một số phương án, polypeptit AR được biến đổi biểu hiện một hoặc nhiều hoạt tính của thụ thể AR kiểu đại, bao gồm nhưng không giới hạn đến, gắn kết đồng chất hoạt hóa, gắn kết ADN, gắn kết phối tử, hoặc chuyển vị hạt nhân. Theo một số phương án, chất đối kháng thể hệ thứ nhất hoặc thứ hai biểu hiện làm giảm hoạt tính đối kháng chống lại polypeptit AR bị biến đổi so với polypeptit AR loại tự do.

Theo các phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp xác định liệu đối tượng hoặc sẽ trở nên kháng với việc điều trị bằng chất đối kháng thụ thể androgen thể hệ thứ nhất hoặc thứ hai, bao gồm, chứa, và/hoặc chủ yếu chứa: (a) thử nghiệm mẫu chứa phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit thụ thể androgen từ đối tượng để xác định liệu polypeptit thụ thể androgen được mã hóa bị biến đổi ở vị trí axit amin 876 của trình tự axit amin được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1; và (b) mô tả đối tượng kháng hoặc sẽ trở nên kháng với việc điều trị bằng chất đối kháng thụ thể androgen thể hệ thứ nhất hoặc thứ hai nếu đối tượng có biến đổi. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm bước thu được mẫu từ đối tượng. Theo một số phương án, đối tượng đã được dùng chất đối kháng AR thể hệ thứ nhất hoặc thứ hai để điều trị bệnh ung thư. Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh ung thư tiền liệt tuyến, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư gan (nghĩa là, thuộc tế bào gan), hoặc bệnh ung thư bàng quang. Theo một số phương án, bệnh ung thư này là bệnh ung thư tiền liệt tuyến. Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh ung thư tiền liệt tuyến kháng lại việc cắt. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm, chứa, và/hoặc chủ yếu chứa việc đình chỉ điều trị bằng chất đối kháng thụ thể androgen thể hệ thứ nhất hoặc thứ hai nếu mẫu từ đối tượng có sự biến đổi ở vị trí 876 của SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm, chứa, và/hoặc chủ yếu chứa việc tiếp tục điều trị bằng chất đối kháng thụ thể androgen thể hệ thứ nhất hoặc thứ hai nếu mẫu từ đối tượng không có sự biến đổi ở vị trí 876 của SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm, chứa, và/hoặc chủ yếu chứa việc dùng chất đối kháng thụ thể androgen thể hệ thứ ba mà ức chế AR bị biến đổi nếu mẫu từ đối tượng có sự biến đổi ở vị trí 876 của SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, chất đối kháng thụ thể androgen thể hệ thứ hai được chọn trong số các

ARN-509, enzalutamid (MDV3100), và RD162. Theo một số phương án, chất đối kháng thụ thể androgen thế hệ thứ nhất được chọn trong số các bicalutamid, flutamid, hydroxyflutamid hoặc nilutamid.

Theo các phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp chọn đối tượng cho điều trị bằng chất đối kháng thụ thể androgen thế hệ thứ ba, bao gồm, chứa, và/hoặc chủ yếu chứa: (a) thử nghiệm mẫu chứa phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit thụ thể androgen từ đối tượng để xác định liệu polypeptit thụ thể androgen được mã hóa bị biến đổi ở vị trí axit amin 876 của trình tự axit amin được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1; và (b) mô tả đối tượng là ứng viên để điều trị bằng chất đối kháng thụ thể androgen thế hệ thứ ba nếu đối tượng có biến đổi. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm bước thu được mẫu từ đối tượng. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm, chứa, và/hoặc chủ yếu chứa việc đình chỉ điều trị bằng chất đối kháng thụ thể androgen thế hệ thứ nhất hoặc thứ hai nếu mẫu từ đối tượng có sự biến đổi ở vị trí 876 của SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm, chứa, và/hoặc chủ yếu chứa việc tiếp tục điều trị bằng chất đối kháng thụ thể androgen thế hệ thứ nhất hoặc thứ hai nếu mẫu từ đối tượng không có sự biến đổi ở vị trí 876 của SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm, chứa, và/hoặc chủ yếu chứa việc dùng chất đối kháng thụ thể androgen thế hệ thứ ba mà ức chế AR bị biến đổi nếu mẫu từ đối tượng có sự biến đổi ở vị trí 876 của SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, chất đối kháng thụ thể androgen thế hệ thứ hai được chọn trong số các ARN-509, enzalutamid (MDV3100), và RD162. Theo một số phương án, chất đối kháng thụ thể androgen thế hệ thứ nhất được chọn trong số các bicalutamid, flutamid, hydroxyflutamid hoặc nilutamid.

Theo các phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp mô tả thụ thể androgen của đối tượng để xác định liệu đối tượng này có thể kháng lại sự ức chế bằng chất đối kháng thụ thể androgen thế hệ thứ nhất hoặc thứ hai, bao gồm, chứa, và/hoặc chủ yếu chứa: (a) thử nghiệm mẫu chứa phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit thụ thể androgen từ đối tượng để xác định liệu polypeptit thụ thể androgen được mã hóa bị biến đổi ở vị trí axit amin 876 của SEQ ID NO: 1; và (b) nếu đối tượng có biến đổi ở vị trí 876 của SEQ ID NO: 1, mô tả thụ thể androgen của đối tượng kháng lại sự ức chế bằng chất đối kháng thụ thể androgen thế hệ thứ nhất hoặc thứ hai. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm bước thu được mẫu từ đối tượng. Theo một

số phương án, chất đối kháng thể hệ thứ nhất hoặc thứ hai biểu hiện làm giảm hoạt tính đối kháng chống lại polypeptit AR bị biến đổi so với polypeptit AR loại tự do. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm, chứa, và/hoặc chủ yếu chứa việc đình chỉ điều trị bằng chất đối kháng thụ thể androgen thể hệ thứ nhất hoặc thứ hai nếu mẫu từ đối tượng có sự biến đổi ở vị trí 876 của SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm, chứa, và/hoặc chủ yếu chứa việc tiếp tục điều trị bằng chất đối kháng thụ thể androgen thể hệ thứ nhất hoặc thứ hai nếu mẫu từ đối tượng không có sự biến đổi ở vị trí 876 của SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm, chứa, và/hoặc chủ yếu chứa việc dùng chất đối kháng thụ thể androgen thể hệ thứ ba mà ức chế AR bị biến đổi nếu mẫu từ đối tượng có sự biến đổi ở vị trí 876 của SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, chất đối kháng thụ thể androgen thể hệ thứ hai được chọn trong số các ARN-509, enzalutamit (MDV3100), và RD162. Theo một số phương án, chất đối kháng thụ thể androgen thể hệ thứ nhất được chọn trong số các bicalutamit, flutamit, hydroxyflutamit hoặc nilutamit.

Theo các phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp kiểm tra liệu đối tượng nhận chất đối kháng thụ thể androgen thể hệ thứ nhất hoặc thứ hai để điều trị bệnh ung thư bị phát triển hoặc sẽ phát triển kháng lại điều trị, bao gồm: (a) thử nghiệm mẫu chứa phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit thụ thể androgen từ đối tượng để xác định liệu polypeptit thụ thể androgen được mã hóa bị biến đổi ở vị trí axit amin 876 của SEQ ID NO: 1; và (b) mô tả đối tượng kháng hoặc sẽ trở nên kháng với việc điều trị bằng chất đối kháng thụ thể androgen thể hệ thứ nhất hoặc thứ hai nếu đối tượng có biến đổi. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm bước thu được mẫu từ đối tượng. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm, chứa, và/hoặc chủ yếu chứa việc đình chỉ điều trị bằng chất đối kháng thụ thể androgen thể hệ thứ nhất hoặc thứ hai nếu mẫu từ đối tượng có sự biến đổi ở vị trí 876 của SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm, chứa, và/hoặc chủ yếu chứa việc tiếp tục điều trị bằng chất đối kháng thụ thể androgen thể hệ thứ nhất hoặc thứ hai nếu mẫu từ đối tượng không có sự biến đổi ở vị trí 876 của SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm, chứa, và/hoặc chủ yếu chứa việc dùng chất đối kháng thụ thể androgen thể hệ thứ ba mà ức chế AR bị biến đổi nếu mẫu từ đối tượng có sự biến đổi ở vị trí 876 của SEQ ID NO: 1. Theo một số

phương án, chất đối kháng thụ thể androgen thế hệ thứ hai được chọn trong số các ARN-509, enzalutamit (MDV3100), và RD162. Theo một số phương án, chất đối kháng thụ thể androgen thế hệ thứ nhất được chọn trong số các bicalutamit, flutamit, hydroxyflutamit hoặc nilutamit.

Theo các phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp tối ưu hóa điều trị của đối tượng nhận chất đối kháng thụ thể androgen thế hệ thứ nhất hoặc thứ hai để điều trị bệnh ung thư, bao gồm, chứa, và/hoặc chủ yếu chứa: (a) thử nghiệm mẫu chứa phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit thụ thể androgen từ đối tượng để xác định liệu polypeptit thụ thể androgen được mã hóa bị biến đổi ở vị trí axit amin 876 của SEQ ID NO: 1; và (c)(i) nếu mẫu có sự biến đổi, đình chỉ điều trị của đối tượng bằng chất đối kháng thụ thể androgen thế hệ thứ nhất hoặc thứ hai hoặc (ii) nếu mẫu không có sự biến đổi, tiếp tục điều trị của đối tượng bằng chất đối kháng thụ thể androgen thế hệ thứ nhất hoặc thứ hai nếu đối tượng không có sự biến đổi. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm bước thu được mẫu từ đối tượng. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm, chứa, và/hoặc chủ yếu chứa việc đình chỉ điều trị bằng chất đối kháng thụ thể androgen thế hệ thứ nhất hoặc thứ hai nếu mẫu từ đối tượng có sự biến đổi ở vị trí 876 của SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm, chứa, và/hoặc chủ yếu chứa việc tiếp tục điều trị bằng chất đối kháng thụ thể androgen thế hệ thứ nhất hoặc thứ hai nếu mẫu từ đối tượng không có sự biến đổi ở vị trí 876 của SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm, chứa, và/hoặc chủ yếu chứa việc dùng chất đối kháng thụ thể androgen thế hệ thứ ba mà ức chế AR bị biến đổi nếu mẫu từ đối tượng có sự biến đổi ở vị trí 876 của SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, chất đối kháng thụ thể androgen thế hệ thứ hai được chọn trong số các ARN-509, enzalutamit (MDV3100), và RD162. Theo một số phương án, chất đối kháng thụ thể androgen thế hệ thứ nhất được chọn trong số các bicalutamit, flutamit, hydroxyflutamit hoặc nilutamit.

Theo một số phương án, polypeptit AR được biến đổi bao gồm, chứa, và hoặc chủ yếu chứa việc thay thế hoặc loại bỏ axit amin ở vị trí 876 của SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, polypeptit AR được biến đổi bao gồm, chứa, và/hoặc chủ yếu chứa việc thay thế phenylalanin vào axit amin được chọn từ nhóm gồm có leuxin, isoleuxin, valin, alanin, glyxin, methionin, serin, threonin, xystein,

tryptophan, lyzin, arginin, histidin, prolin, tiroxin, asparagin, glutamin, axit aspartic và glutamic ở vị trí 876 của SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, polypeptit AR được biến đổi bao gồm, chứa, và/hoặc chủ yếu chứa việc thay thế phenylalanin vào axit amin được chọn trong số các glyxin, alanin, valin, leuxin, và isoleuxin ở vị trí 876 của SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, polypeptit AR được biến đổi bao gồm, chứa, và/hoặc chủ yếu chứa việc thay thế phenylalanin vào leuxin ở vị trí 876 của SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, polypeptit AR được biến đổi bao gồm, chứa, và/hoặc chủ yếu chứa việc loại bỏ axit nucleic mã hóa axit amin ở vị trí 876 của SEQ ID NO: 1.

Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa polypeptit AR được biến đổi có (i) sự đột biến của thymin (t) vào xytozin (c) ở vị trí axit nucleicon tương ứng với vị trí axit nucleic 2626 trong trình tự nucleotit được biểu hiện tại SEQ ID NO: 18; (ii) đột biến của xytozin (c) vào adenin (a) ở vị trí axit nucleic tương ứng với vị trí axit nucleic 2628 trong trình tự nucleotit được biểu hiện tại SEQ ID NO: 18; hoặc (iii) đột biến của xytozin (c) vào guanin (g) ở vị trí axit nucleic tương ứng với vị trí axit nucleic 2628 trong trình tự nucleotit được biểu hiện tại SEQ ID NO: 18.

Theo một số phương án của phương pháp, mẫu axit nucleic là ARN hoặc ADN. Theo một số phương án của phương pháp, mẫu axit nucleic là ADN genomic. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm, chứa, và/hoặc chủ yếu chứa việc mARN phân lập từ mẫu ARN. Theo một số phương án, axit nucleic được phân lập từ mẫu tế bào u bướu thu được từ đối tượng. Theo một số phương án, mẫu là mẫu sinh thiết u bướu, mẫu máu, mẫu huyết thanh, mẫu bạch huyết, hoặc hút tủy xương thu được từ đối tượng. Theo một số phương án, mẫu chứa tế bào u bướu tuần hoàn. Theo một số phương án, mẫu chứa tế bào u bướu bị khuếch tán. Theo một số phương án, axit nucleic được tinh sạch từ mẫu trước khi thử nghiệm. Theo một số phương án, axit nucleic được khuếch đại trước khi thử nghiệm.

Theo một số phương án của phương pháp, thử nghiệm bao gồm, chứa, và/hoặc chủ yếu chứa việc thực hiện khuếch đại chuỗi phản ứng (PCR) polymeraza của mẫu axit nucleic mã hóa ở vị trí 876 của SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, khuếch đại PCR bao gồm, chứa, và/hoặc chủ yếu chứa việc sử dụng cặp mồi oligonucleotit sườn vùng mã hóa axit amin ở vị trí 876 của SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án,

phương pháp còn bao gồm trình tự PCR khuếch đại axit nucleic bằng cách sử dụng kỹ thuật đã biết bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này.

Theo một số phương án, thử nghiệm bao gồm, chứa, và/hoặc chủ yếu chứa việc tiếp xúc axit nucleic với đoạn dò axit nucleic đặc hiệu trình tự, trong đó đoạn dò axit nucleic đặc hiệu trình tự: (a) liên kết với axit nucleic mã hóa thụ thể được biến đổi mà bị biến đổi ở vị trí axit amin 876; và (b) không liên kết với axit nucleic mã hóa thụ thể kiểu dại có phenylalanin ở vị trí 876 của SEQ ID NO: 1.

Theo một số phương án, chất đối kháng thụ thể androgen thể hệ thứ nhất hoặc thứ hai ức chế polypeptit thụ thể androgen kiểu dại do đối kháng cạnh tranh. Theo một số phương án, chất đối kháng thụ thể androgen thể hệ thứ hai được chọn trong số các ARN-509, enzalutamid (MDV3100), hoặc RD162.

Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh hoặc bị bệnh rối loạn được chọn trong số các bệnh ung thư, rối loạn viêm hoặc rối loạn tăng sinh. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư qua AR trung gian. Theo một số phương án, bệnh ung thư bệnh được chọn từ bệnh ung thư tiền liệt tuyến, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư gan (nghĩa là, thuộc tế bào gan), hoặc bệnh ung thư bàng quang. Theo một số phương án, bệnh ung thư này là bệnh ung thư tiền liệt tuyến. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt. Theo một số phương án, đối tượng có khối u dạng rắn.

Theo một số phương án, đối tượng được điều trị bằng chất đối kháng thụ thể androgen thể hệ thứ nhất hoặc thứ hai trước khi thu được mẫu từ đối tượng. Theo một số phương án, đối tượng đáp ứng điều trị bằng chất đối kháng thụ thể androgen thể hệ thứ nhất hoặc thứ hai khi được dùng lần thứ nhất. Theo một số phương án, mẫu dùng cho sử dụng trong phương pháp là mẫu thu được trong 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 1 tháng, 2 tháng, 3 tháng, 4 tháng, 5 tháng, 6 tháng, 7 tháng, 8 tháng, 9 tháng, 10 tháng, 11 tháng, 12 tháng, 14 tháng, 16 tháng, 18 tháng, 20 tháng, 22 tháng, hoặc 24 tháng tiếp theo dùng lần thứ nhất với chất đối kháng AR thể hệ thứ nhất hoặc thứ hai. Theo một số phương án, mẫu thu được 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 lần so với trong quá trình điều trị bằng chất đối kháng AR thể hệ thứ nhất hoặc thứ hai. Theo một số phương án, đối tượng đáp ứng điều trị bằng chất đối kháng AR thể hệ thứ nhất hoặc thứ hai khi được dùng lần thứ nhất.

Theo các phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp sàng lọc các hợp chất đối kháng thụ thể androgen bị biến đổi, bao gồm, gồm có và/hoặc chủ yếu bao gồm: (a) thể hiện thụ thể androgen bị biến đổi trong tế bào, trong đó thụ thể androgen bị biến đổi ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí 876 của SEQ ID NO: 1; (b) cho tế bào tiếp xúc với hợp chất thử nghiệm; và (c) phát hiện mức độ của hoạt tính thụ thể androgen trong tế bào, trong đó việc làm tăng trong hoạt tính được thể hiện cho thấy rằng các hợp chất đối kháng AR bị biến đổi. Theo một số phương án, hợp chất thử nghiệm thể hiện toàn bộ hoạt tính chất đối kháng theo hướng AR bị biến đổi. Theo một số phương án, hợp chất thử nghiệm không thể hiện hoạt tính chất chủ vận theo hướng AR bị biến đổi. Theo các phương án, sáng chế đề cập đến, ức chế thụ thể androgen thế hệ thứ ba được xác định bằng phương pháp được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, sự biến đổi của polypeptit AR được sử dụng trong phương pháp là thay thế hoặc loại bỏ axit amin ở vị trí 876 của polypeptit thụ thể androgen. Theo một số phương án, sự biến đổi của polypeptit AR được sử dụng trong phương pháp là thay thế phenylalanin vào axit amin được chọn trong số các leuxin, isoleuxin, valin, alanin, glyxin, methionin, serin, threonin, xystein, tryptophan, lyzin, arginin, histidin, prolin, tiroxin, asparagin, glutamin, axit aspartic và glutamic ở vị trí axit amin 876 của polypeptit thụ thể androgen. Theo một số phương án, sự biến đổi của polypeptit AR được sử dụng trong phương pháp là thay thế phenylalanin vào axit amin được chọn trong số các glyxin, alanin, valin, leuxin, và isoleuxin ở vị trí axit amin 876 của polypeptit thụ thể androgen. Theo một số phương án, sự biến đổi của polypeptit AR được sử dụng trong phương pháp là thay thế phenylalanin vào leuxin ở vị trí axit amin 876 của polypeptit thụ thể androgen.

Theo một số phương án, tế bào được sử dụng trong phương pháp này là thiếu sự biểu hiện của thụ thể androgen kiểu đại, thể hiện mức độ thấp của thụ thể androgen kiểu đại, hoặc thể hiện thụ thể AR bị biến đổi. Theo một số phương án, tế bào được chọn trong số các HeLa, CV1, COS7, HepG2, HEK-293, DU145, PC3, TSY-PR1, LNCaP, CWR, VCaP và LAPC4. Theo một số phương án, tế bào bao gồm gen chỉ thị có thể thực hiện liên kết với vùng khởi đầu đáp ứng androgen. Theo một số phương án, hoạt tính của polypeptit AR được xác định bằng cách phân tích biểu hiện của gen chỉ thị. Theo một số phương án, vùng khởi đầu bao gồm yếu tố đáp ứng androgen. Theo một số phương án, yếu tố đáp ứng androgen là 4XARE

hoặc yếu tố probasin. Theo một số phương án, vùng khởi đầu là probasin, kháng thể đặc hiệu tiền liệt tuyến, vùng khởi đầu MMTV LTR, FASN, STEAP4, TMPRSS2, ORM1, hoặc NKX3.1. Theo một số phương án, gen chỉ thị mã hóa protein được chọn trong số các luxiferaza, protein huỳnh quang, protein phát quang sinh học, hoặc enzym.

Theo các phương án, sáng chế đề cập đến, polypeptit thụ thể androgen được phân lập hoặc biến thể của chúng có hoạt tính thụ thể androgen bao gồm sự biến đổi ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí axit amin 876 của trình tự axit amin được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1, trong đó, sự biến đổi đối kháng với chất đối kháng thụ thể androgen trên polypeptit thụ thể androgen hoặc biến thể bị biến đổi. Theo một số phương án, sự biến đổi bao gồm sự thay thế axit amin ở vị trí 876 so với thụ thể androgen kiểu đại được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, thay thế là F876L. Theo một số phương án, sự biến đổi bao gồm loại bỏ vị trí axit amin 876. Theo một số phương án, polypeptit AR được biến đổi có trình tự axit amin được biểu hiện tại SEQ ID NO: 5. Theo một số phương án, polypeptit AR được biến đổi là polypeptit tái tổ hợp. Theo một số phương án, polypeptit AR được biến đổi bao gồm sự thay thế axit amin ở vị trí 876 so với thụ thể androgen kiểu đại được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1 và một hoặc nhiều sự thay thế axit amin bổ sung. Theo một số phương án, polypeptit AR được biến đổi bao gồm sự thay thế at axit amin ở vị trí 876 là F876L. Theo một số phương án, polypeptit AR được biến đổi bao gồm một hoặc nhiều sự thay thế axit amin bổ sung được chọn từ trong số một hoặc nhiều sự thay thế axit amin có liên quan đến ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thay thế axit amin bổ sung được chọn trong một hoặc nhiều sự thay thế ở vị trí axit amin 701, 741, 874 và 877 so với thụ thể androgen kiểu đại được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, một hoặc nhiều sự thay thế axit amin bổ sung được chọn trong số các T877A, W741C, W741L, W741R, L701H và H874Y. Theo một số phương án, polypeptit AR được biến đổi là polypeptit tái tổ hợp. Theo một số phương án, polypeptit AR được biến đổi bao gồm tạo trình tự axit amin được biểu hiện tại SEQ ID NO: 5 hoặc biến thể mà có ít nhất hoặc ít nhất khoảng 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều trình tự tương đồng với polypeptit có trình tự được biểu hiện tại SEQ ID NO: 5, trong đó axit amin ở vị trí 876 không phải là phenylalanin.

Theo các phương án, sáng chế đề cập đến, phân tử axit nucleic được phân lập mã hóa polypeptit thụ thể androgen bị biến đổi được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, axit nucleic là phân tử ADN hoặc ARN. Theo một số phương án, axit nucleic là phân tử cADN. Theo một số phương án, axit nucleic là sản phẩm khuếch đại PCR. Theo một số phương án, axit nucleic là phân tử tái tổ hợp. Theo một số phương án, axit nucleic là phân tử tổng hợp. Theo một số phương án, axit nucleic bao gồm tạo trình tự axit nucleic được biểu hiện tại SEQ ID NO: 19 hoặc biến thể mà có ít nhất hoặc ít nhất khoảng 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều trình tự tương đồng với polypeptit có trình tự được biểu hiện tại SEQ ID NO: 19, trong đó bộ ba axit nucleic mã hóa axit amin ở vị trí 876 không mã hóa phenylalanin.

Theo các phương án, sáng chế đề cập đến vector, bao gồm phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit thụ thể androgen bị biến đổi được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, vector là vector virus hoặc plasmit. Theo một số phương án, axit nucleic có thể thực hiện liên kết với vùng khởi đầu. Theo một số phương án, vùng khởi đầu là vùng khởi đầu cấu trúc hoặc cảm ứng. Theo các phương án, sáng chế đề cập đến tế bào chủ, tế bào này bao gồm vector. Theo một số phương án, tế bào là tế bào nhân sơ hoặc tế bào nhân chuẩn. Theo các phương án, sáng chế đề cập đến polypeptit AR đột biến biểu hiện bởi tế bào chủ.

Theo các phương án, sáng chế đề cập đến dược phẩm bao gồm việc ức chế thụ thể androgen thể hệ thứ ba được xác định bằng phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này và được dụng dụng. Theo các phương án, sáng chế đề cập đến việc sử dụng ức chế thụ thể androgen thể hệ thứ ba được xác định bằng phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này dùng cho việc sản xuất thuốc chữa bệnh. Theo các phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bao gồm việc dùng cho đối tượng có nhu cầu lượng có hiệu quả điều trị của dược phẩm, trong đó chế phẩm này bao gồm chất mang dược dụng thích hợp. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư qua AR trung gian. Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh ung thư tiền liệt tuyến, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư gan (nghĩa là, thuộc tế bào gan) hoặc bệnh ung thư bàng quang. Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt. Theo một số phương án, đối tượng biểu hiện AR biến thể. Theo một số phương án,

AR biến thể bao gồm sự thay thế hoặc loại bỏ axit amin ở vị trí axit amin 876 trong polypeptit thụ thể androgen. Theo một số phương án, thay thế là F876L. Theo một số phương án, chất đối kháng AR thể hệ thứ ba được dùng với thuốc trị liệu bổ sung. Theo một số phương án, chất đối kháng AR thể hệ thứ ba và thuốc trị liệu bổ sung được dùng tuần tự, đồng thời hoặc gián đoạn. Theo một số phương án, thuốc trị liệu bổ sung được chọn trong số các hormone, chất chủ vận thụ thể hormone hoặc chất đối kháng, corticosteroid, thuốc chống nôn, thuốc giảm đau, thuốc chống bệnh ung thư, thuốc chống viêm, chất ức chế kinase, chất ức chế HSP90, chất ức chế histon deacetylase (HDAC). Theo một số phương án, thuốc trị liệu bổ sung là chất chủ vận hoặc chất đối kháng hormone giải phóng gonadotropin (GnRH). Theo một số phương án, chất chủ vận GnRH là leuprolit, bruserelin hoặc goserelin.

Theo các phương án, sáng chế đề cập đến vi mạch bao gồm polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này hoặc axit nucleic mã hóa polypeptit AR bị biến đổi được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, polypeptit AR được biến đổi bao gồm sự biến đổi ở axit amin 876. Theo một số phương án, sự biến đổi là sự thay thế axit amin là F876L.

Theo các phương án, sáng chế đề cập đến kit bao gồm polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này. Theo các phương án, sáng chế đề cập đến kit bao gồm axit nucleic được phân lập mã hóa polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này. Theo các phương án, sáng chế đề cập đến kit bao gồm một hoặc nhiều thuốc thử để phát hiện polypeptit AR đột biến bao gồm sự biến đổi ở vị trí axit amin 876. Theo các phương án, sáng chế đề cập đến kit bao gồm một hoặc nhiều thuốc thử để phát hiện axit nucleic mã hóa polypeptit AR đột biến bao gồm sự biến đổi ở vị trí axit amin 876. Theo một số phương án, sự biến đổi là sự thay thế axit amin là F876L. Theo một số phương án, kit bao gồm cặp môi oligonucleotit mà tạo sườn vùng axit nucleic mã hóa axit amin 876 của polypeptit AR. Theo một số phương án, kit bao gồm môi oligonucleotit that (a) liên kết với axit nucleic mã hóa AR bị biến đổi mà bị biến đổi ở vị trí axit amin 876; và (b) không liên kết với axit nucleic mã hóa AR kiểu dại có phenylalanine ở vị trí axit amin 876. Theo một số phương án, kit bao gồm vi mạch bao gồm (a) Polypeptit AR bị biến đổi có biến đổi là F876S, hoặc phần của chúng bao gồm sự biến đổi là F876S; hoặc (b) phân tử axit

nucleic mã hóa polypeptit AR đột biến có biến đổi là F876S, hoặc phần của chúng bao gồm sự biến đổi là F876S.

Theo các phương án, sáng chế đề cập đến hệ thống phát hiện AR bị biến đổi kháng lại sự ức chế bằng chất đối kháng AR thế hệ thứ nhất hoặc thứ hai trong đối tượng, bao gồm: (a) mẫu chứa phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit AR từ đối tượng; và (b) chip bao gồm axit nucleic mã hóa polypeptit AR đột biến hoặc vị trí của chúng bị biến đổi ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí axit amin 876 của trình tự axit amin được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, chip được chứa trên vi mạch. Theo các phương án, sáng chế đề cập đến hệ thống phát hiện AR bị biến đổi kháng lại sự ức chế bằng chất đối kháng AR thế hệ thứ nhất hoặc thứ hai trong đối tượng, bao gồm: (a) mẫu chứa phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit AR từ đối tượng; và (b) đoạn dò axit nucleic đặc hiệu trình tự, trong đó đoạn dò axit nucleic đặc hiệu trình tự: (i) liên kết với axit nucleic mã hóa AR bị biến đổi mà bị biến đổi ở vị trí axit amin 876; và (ii) không liên kết với axit nucleic mã hóa AR kiểu dại có phenylalanin ở vị trí axit amin 876. Theo các phương án, sáng chế đề cập đến hệ thống phát hiện AR bị biến đổi kháng lại sự ức chế bằng chất đối kháng AR thế hệ thứ nhất hoặc thứ hai trong đối tượng, bao gồm: (a) mẫu chứa phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit AR từ đối tượng; và (b) cặp mỗi oligonucleotit mà tạo sườn vùng axit nucleic mã hóa axit amin 876 của polypeptit AR.

Theo các phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể được phân lập liên kết với polypeptit thụ thể androgen bị biến đổi được đề xuất trong bản mô tả này, trong đó kháng thể không liên kết với hoặc liên kết với ái lực thấp với polypeptit AR kiểu dại có trình tự axit amin được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, polypeptit AR được biến đổi bao gồm sự biến đổi ở axit amin 876. Theo một số phương án, sự biến đổi là sự thay thế axit amin là F876L.

Theo các phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp duy trì điều trị ở bệnh nhân bị bệnh ung thư, bao gồm: (a) dùng cho bệnh nhân duy trì chế độ điều trị bao gồm việc dùng liều có hiệu quả điều trị của chất đối kháng AR thế hệ thứ nhất hoặc thứ hai; và (b) giám sát bệnh nhân trong khoảng thời gian được xác định trước so với thời gian trong quá trình duy trì chế độ điều trị để xác định liệu đối tượng có đột biến trong gen nội sinh mã hóa AR mà dẫn đến sự biến đổi ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí axit amin 876 của trình tự axit amin được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1.

Theo một số phương án, việc giám sát bao gồm: thử nghiệm mẫu chứa phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit AR từ đối tượng để xác định liệu polypeptit AR được mã hóa bị biến đổi ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí axit amin 876 của trình tự axit amin được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm đình chỉ duy trì chế độ điều trị nếu đối tượng có đột biến hoặc tiếp tục duy trì chế độ điều trị nếu đối tượng không có sự biến đổi. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm dùng chất đối kháng AR thế hệ thứ ba mà ức chế AR bị biến đổi nếu đối tượng có biến đổi. Theo một số phương án, sự biến đổi trong polypeptit AR là F876L. Theo một số phương án, chất đối kháng AR thế hệ thứ nhất hoặc thứ hai ức chế polypeptit AR kiểu dại bằng sự đối kháng cạnh tranh. Theo một số phương án, chất đối kháng AR thế hệ thứ hai được chọn trong số các ARN-509, enzalutamit (MDV3100), và RD162. Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh ung thư tiền liệt tuyến, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư bàng quang, hoặc bệnh ung thư thuộc tế bào gan. Theo một số phương án, bệnh ung thư này là bệnh ung thư tiền liệt tuyến. Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt. Theo một số phương án, trong khoảng thời gian được xác định trước là mỗi tuần, mỗi tháng, mỗi 2 tháng, mỗi 3 tháng, mỗi 4 tháng, mỗi 5 tháng, mỗi 6 tháng, mỗi 7 tháng, mỗi 8 tháng, mỗi 9 tháng, mỗi 10 tháng, mỗi 11 tháng, hoặc hàng năm.

Các phương án khác, chức năng và lợi ích của polypeptit, axit nucleic, các hợp chất, các phương pháp và chế phẩm được mô tả ở đây sẽ trở nên rõ ràng hơn từ mô tả chi tiết sau đây. Tuy nhiên, điều này được hiểu là các mô tả chi tiết và ví dụ cụ thể, trong khi chỉ ra các phương án cụ thể, được đưa ra bằng cách minh họa duy nhất, do các thay đổi và biến đổi khác nhau trong phạm vi của sáng chế sẽ trở nên rõ ràng hơn từ những người có kinh nghiệm trong lĩnh vực này từ các mô tả chi tiết này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 minh họa ARN-509 và kháng enzalutamit. (A) Sự tăng sinh tế bào LNCaP và LNCaP ARN-509r1. Các tế bào LNCaP và LNCaP ARN-509r1 được nuôi cấy trong sự có mặt của môi trường nghèo hormone trong 2 ngày tiếp theo là bổ sung phối tử. Sự tăng sinh được định lượng bằng thử nghiệm khả năng sống được dựa trên sự phát quang CellTiter-Glo® (Promega Corp.) sau 7 ngày điều trị hợp chất. (B) Thử nghiệm tăng sinh chất chủ vận của dòng tế bào LNCaP/AR-Luc,

LNCaP/AR-Luc ENZr2 và LNCaP ARN-509r2. Các tế bào được nuôi cấy trong sự có mặt của môi trường nghèo hormone trong 2 ngày tiếp theo là điều trị phối tử trong 7 ngày. Sự tăng sinh được định lượng bằng thử nghiệm khả năng sống được dựa trên phát quang CellTiter-Glo®. (C) Thử nghiệm chất đối kháng tăng sinh của bố mẹ và dòng tế bào kháng kháng androgen thế hệ 2nd. Các tế bào được nuôi cấy trong sự có mặt của môi trường nghèo hormone trong 2 ngày tiếp theo là điều trị phối tử trong sự có mặt của R1881 (nồng độ cuối = 100pM). Sự tăng sinh được định lượng bằng thử nghiệm khả năng sống được dựa trên sự phát quang CellTiter-Glo. (D) Sơ đồ biểu diễn của cấu trúc miền AR cho thấy axit amin khi được thay đổi hiển thị hoạt tính phối tử được biến đổi trong CRPC.

Fig.2 minh họa mức độ AR ở bố mẹ và dòng tế bào kháng kháng androgen thế hệ 2nd. Dịch chiết protein được tạo ra từ các tế bào được nuôi cấy trong môi trường nghèo hormone trong 3 ngày. Mức độ protein AR được phân tích và bằng western blot. Mức độ AR được định lượng và chuẩn hóa với α -tubulin và thể hiện liên quan đến tế bào LNCaP.

Fig.3 minh họa ARN-509 và enzalutamid là một phần chất chủ vận AR F876L. (A) Chất chủ vận phiên mã và hoạt tính chất đối kháng ARN-509 và enzalutamid ở kiểu đại hoặc F876L AR. Hoạt tính phiên mã của chỉ thị 4X ARE-luxiferaza được đo trong sự có mặt của hợp chất làm tăng nồng độ trong sự vắng mặt hoặc có mặt của 1nM R1881 (dùng cho AR kiểu đại) hoặc 5nM R1881 (dùng cho F876L AR). (B) Hoạt tính chất chủ vận phiên mã of kháng androgen thế hệ 1st và 2nd và pđônison ở kiểu đại, hoạt tính phụ thuộc F876L, T877A, F876L/T877A, L701H, H874Y và W741C AR của chỉ thị 4X ARE-Luxiferaza được đo trong các tế bào HEPG2 được chuyển nạp thoáng qua.

Fig.4 minh họa VP16-AR (A) và F876L VP16-AR (B) chất chủ vận và hoạt tính chất đối kháng ARN-509 và enzalutamid. Hoạt tính chỉ thị 4X ARE-luxiferaza được theo dõi trong sự có mặt của hợp chất làm tăng nồng độ trong sự vắng mặt hoặc có mặt của 90pM R1881 (dùng cho VP16-AR kiểu đại) hoặc 1nM R1881 (dùng cho F876L VP16-AR).

Fig.5 minh họa thử nghiệm gắn kết cạnh tranh của AR kiểu đại (A) với gắn kết F876L AR (B). ³H-R1881 được thực hiện trong dịch chiết tế bào PC3 thể hiện kiểu

dại hoặc F876L AR. Dữ liệu là đại diện của 3 thử nghiệm độc lập. Lỗi thanh, SEM; n=2.

Fig.6 minh họa mức độ AR trong dòng tế bào biểu hiện quá AR. Dịch chiết protein được tạo ra từ các tế bào LNCaP, LNCaP/AR(cs), LNCaP/SR α F876L và LNCaP/pCADNF876L được nuôi cấy trong môi trường nghèo hormone trong 3 ngày. Mức độ protein AR được phân tích và bằng western blot. Mức độ AR được định lượng và được chuẩn hóa với actin và thể hiện liên quan đến tế bào LNCaP.

Fig.7 minh họa F876L AR biến thể đem lại một phần hoạt tính chất chủ vận đến ARN-509 và enzalutamid. (A) Sự tăng sinh tế bào LNCaP/AR(cs) và LNCaP/SR α F876L. Các tế bào được nuôi cấy trong sự có mặt của môi trường nghèo hormone trong 2 ngày tiếp theo là điều trị phối tử trong 7 ngày. Sự tăng sinh được định lượng bằng thử nghiệm khả năng sống được dựa trên sự phát quang CellTiter-Glo. (B) LNCaP/AR(cs), sự tăng sinh tế bào LNCaP/SR α F876L và LNCaP/pCADNF876L. Các tế bào được nuôi cấy trong môi trường nghèo hormone trong 2 ngày tiếp theo là điều trị phối tử trong 7 ngày. Đối với các thử nghiệm chất đối kháng, các hợp chất được bổ sung trong sự có mặt của 200pM R1881 (100pM nồng độ cuối). Sự tăng sinh được định lượng bằng cách sử dụng thử nghiệm CellTiter-Glo® dựa trên sự phát quang.

Fig.8 minh họa thử nghiệm tương tác AR N/C. Phối tử gây ra tương tác N/C được theo dõi via động vật có vú hai hybrid thử nghiệm trong các tế bào HEPG2. Chất đối kháng được thử nghiệm ở 8 μ M, R1881 ở 1nM.

Fig.9 minh họa phân tích AR ChIP của gen đích AR. Các thử nghiệm ChIP được thực hiện trong các tế bào LNCaP/AR(cs) và LNCaP/SR α F876L được ủ trong 3 ngày trong môi trường nghèo hormone tiếp theo là 4 giờ điều trị phối tử. Các tế bào được điều trị với chất đối kháng 10 μ M trong có mặt hoặc vắng mặt của 1nM R1881. Dữ liệu kiểm soát AR và IgG không đặc hiệu được trình bày như phần trăm đầu vào.

Fig.10 minh họa biến thể AR F876L đem lại kháng ARN-509 và enzalutamid trong cơ thể (*in vivo*). Khối u ghép ngoại lai LNCaP/AR(cs) và LNCaP/SR α F876L. Chuột đực cắt mang khối được điều trị hằng ngày với dung môi hoặc 30 mg/kg/ngày hợp chất. Khối u phát triển cho mỗi nhóm được trình bày là thể tích khối u trung bình $\pm$ SEM.

Fig.11 minh họa danh mục liều để an toàn 1/2 giai đoạn đánh dấu mở, được động học, và nghiên cứu khái niệm của sự thử nghiệm của ARN-509 ở bệnh nhân với sự tăng cao, ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt di căn.

Fig.12 minh họa tương đồng hóa AR-F876L trong bệnh nhân được điều trị ARN-509. (A) đáp ứng PSA của 29 bệnh nhân được phân tích dùng cho biến thể F876L. Thiết bị đầu cuối kết thúc dòng đáp ứng PSA là thời gian mà huyết tương của bệnh nhân đã được lọc dùng cho biến thể F876L bằng cách sử dụng phân tích BEAMing. Huyết tương được sử dụng trong nghiên cứu này ban đầu được thu gom để xác định được động học của ARN-509 và như mẫu đã không được điều chế bằng cách sử dụng phương pháp luận tối ưu hóa tỷ lệ của ctADN vào tế bào bạch huyết ADN. (B) đáp ứng PSA của bệnh nhân dương cho F876L. PSA đáp ứng của bệnh nhân 7 ở chu kỳ điều trị được chỉ báo. Tuần hoàn huyết tương được phân tích dùng cho F876L ở thời điểm được chỉ báo bằng các mũi tên. Mẫu huyết tương không có biến thể có thể phát hiện được ký hiệu như “trọng lượng”, sự có mặt của các biến thể F876L là “m”. Mẫu huyết tương được gọi là dương dùng cho biến thể nếu phần trăm các hạt biến thể là trên ngưỡng (0,02%) và số lượng bản sao biến thể được ước lượng là $\geq 0,5$ (số lượng gen tương đương trong mẫu huyết tương x phân hạt biến thể $\geq 0,5$).

Fig.13 minh họa liên quan đến lượng kháng thể đặc hiệu tiền liệt tuyến (PSA) được phát hiện vượt quá chuỗi nghiên cứu lâm sàng pha 1/2 ARN-509 trong một trong ba bệnh nhân (7, 10, và 13) phát hiện mang biến thể somatic F876Ls trong AR. Mũi tên chỉ mẫu trong đó, các biến thể được phát hiện.

Mô tả chi tiết sáng chế

Thuật ngữ đã biết

Trừ khi được xác định bằng cách khác, tất cả các thuật ngữ khoa học kỹ thuật được sử dụng ở đây có nghĩa tương tự như thường được hiểu bởi những kỹ năng trong lĩnh vực này mà thuộc nội dung đối tượng được yêu cầu bảo hộ. Tất cả bằng sáng chế, đơn sáng chế, đơn đã được công bố và các công bố, trình tự GENBANK, trang web và các vật liệu được công bố khác tham chiếu thông qua toàn bộ mô tả ở đây, trừ khi có lưu ý khác, được kết hợp bằng cách tham chiếu đến toàn bộ sáng chế. Trong trường hợp có nhiều định nghĩa cho các thuật ngữ ở đây, là chiếm ưu thế. Trong đó viện dẫn đến URL hoặc nhận dạng hoặc địa chỉ khác, điều

này được hiểu rằng các nhận dạng này có thể thay đổi thông tin cụ thể trên internet có thể đến và đi, nhưng thông tin tương đương được biết và có thể dễ dàng truy cập, như bằng cách tìm kiếm trên internet và/hoặc cơ sở dữ liệu phổ biến. Sự tham chiếu thêm vào đó đã chứng tỏ sự sẵn có và công khai phổ biến của thông tin này. Thông thường, các đường dùng cho nuôi cấy tế bào, nhiễm tế bào, sản xuất kháng thể và các phương pháp phân tử sinh là các phương pháp thông thường được sử dụng trong kỹ thuật này. Các tiêu chuẩn kỹ thuật này có thể được tìm thấy, ví dụ, tài liệu tham khảo, như, ví dụ, Sambrook et al. (2000) và Ausubel et al. (1994).

Như được sử dụng ở đây, các dạng số ít “a,” “an” và “the” bao gồm nhiều viện dẫn trừ khi phạm vi mệnh lệnh rõ ràng khác. Theo sáng chế này, việc sử dụng số ít bao gồm số nhiều trừ khi được quy định khác. Như được sử dụng ở đây, sử dụng từ “hoặc” nghĩa là “và/hoặc” trừ khi được quy định khác. Hơn nữa, việc sử dụng thuật ngữ “bao gồm” cũng như các thuật ngữ khác (ví dụ, “bao gồm”, “bao gồm”, và “bao gồm”) là không giới hạn.

Như được sử dụng ở đây, phạm vi và số lượng có thể được thể hiện như “khoảng” trị số hoặc phạm vi cụ thể. Khoảng cũng bao gồm lượng chính xác. Do đó “khoảng 5µg” nghĩa là “khoảng 5µg” và cũng “5µg.” Thông thường, thuật ngữ “khoảng” bao gồm lượng mà có thể được dự tính trong lỗi thử nghiệm.

Như được sử dụng ở đây, polypeptit thụ thể androgen (AR) đề cập đến protein hoặc polypeptit thụ thể androgen bất kỳ, bao gồm, nhưng không giới hạn đến, protein được tạo ra tái tổ hợp, protein được tạo ra tổng hợp, protein thụ thể androgen riêng, và protein thụ thể androgen được chiết từ tế bào hoặc mô. Polypeptit AR bao gồm polypeptit liên quan từ các loài khác nhau bao gồm, nhưng không giới hạn các động vật có nguồn gốc từ con người và không có nguồn gốc từ con người. Các polypeptit AR không có nguồn gốc từ con người bao gồm, nhưng không giới hạn đến, loài linh trưởng không phải con người (ví dụ, tinh tinh và khỉ không đuôi), thuộc loài chuột (ví dụ, chuột và chuột), thuộc loài chó (chó), thuộc loài mèo (mèo), thuộc loài thỏ (thỏ), thuộc loài chim (chim), thuộc giống bò (bò), thuộc giống cừu (cừu), thuộc giống lợn (lợn), thuộc giống ngựa (ngựa), thuộc loài cá (cá), thuộc loài ếch (ếch) và các polypeptit AR ở động vật có vú hoặc không phải là động vật có vú khác. Các polypeptit AR mẫu bao gồm, ví dụ, SEQ ID NOS: 1-17. Polypeptit thụ thể androgen bao gồm thụ thể androgen kiểu đại, tạo chất đồng phân biến thể alen, biến

thể somatic bao gồm sự dựa vào khối u, các phân tử tổng hợp từ axit nucleic, protein được phân lập từ mô và tế bào ở người, và các dạng biến đổi của chúng. Các polypeptit thụ thể androgen được đề xuất trong bản mô tả này có thể còn được biến đổi bằng cách biến đổi trình tự gốc axit amin, bằng cách loại bỏ, bổ sung, hoặc thay thế một hoặc nhiều axit amin. Polypeptit thụ thể androgen bao gồm polypeptit AR bất kỳ hoặc vị trí của chúng có hoạt tính AR, bao gồm ví dụ, polypeptit kết hợp miền phối tử gắn kết AR với miền gắn kết ADN khác loại.

Như được sử dụng ở đây, polypeptit thụ thể androgen (AR) biến thể, protein (AR) biến thể, polypeptit AR bị biến đổi, hoặc protein AR bị biến đổi hoặc được sử dụng hoán đổi cho nhau trong bản mô tả này và đề cập đến polypeptit thụ thể androgen bị biến đổi ở một hoặc nhiều vị trí axit amin. Mẫu biến đổi bao gồm, nhưng không giới hạn đến, các thay thế, loại bỏ hoặc bổ sung axit amin.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “kháng androgen” dùng để chỉ nhóm các hợp chất chất đối kháng thụ thể hormone có khả năng ngăn ngừa hoặc ức chế tác dụng sinh học của các androgen ở mô đáp ứng thông thường *trong cơ thể*.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “Chất ức chế AR” hoặc “Chất đối kháng AR” được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này và đề cập đến chất ức chế hoặc làm giảm ít nhất một hoạt tính của polypeptit AR. Mẫu hoạt tính AR bao gồm, nhưng không giới hạn đến, gắn kết đồng chất hoạt hóa, gắn kết ADN, gắn kết phối tử, hoặc chuyển vị hạt nhân.

Như được sử dụng ở đây, "toàn bộ chất đối kháng" đề cập đến chất đối kháng ở nồng độ hiệu quả, ức chế hoàn toàn về cơ bản hoạt tính của polypeptit AR. Như được sử dụng ở đây, “chất đối kháng một phần” đề cập đến chất đối kháng có khả năng ức chế một phần hoạt tính của polypeptit AR, trừ khi, ngay cả ở nồng độ cao không phải toàn bộ chất đối kháng. Đối với ‘hoàn toàn về cơ bản’ nghĩa là ít nhất khoảng 80%, ít nhất khoảng 90%, ít nhất khoảng 95%, ít nhất khoảng 96%, ít nhất khoảng 97%, ít nhất khoảng 98% ít nhất khoảng 99%, hoặc ức chế lớn hơn hoạt tính của polypeptit AR.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “Chất ức chế AR thế hệ thứ ba” hoặc “chất đối kháng AR thế hệ thứ ba” được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này và đề cập đến chất mà ức chế ít nhất một hoạt tính của polypeptit AR chứa một hoặc nhiều axit amin biến đổi mà kháng đối với sự ức chế bằng chất đối kháng AR

thể hệ thứ hai, như, ví dụ, ARN-509 (CAS No. 956104-40-8), enzalutamit (như được biết là MDV3100; CAS No: 915087-33-1), hoặc RD162 (CAS No. 915087-27-3). Theo một số phương án, chất ức chế AR thể hệ thứ ba ức chế ít nhất một hoạt tính của polypeptit AR kiểu đại, như, nhưng không giới hạn đến, gắn kết đồng chất hoạt hóa, gắn kết ADN, gắn kết phối tử, hoặc chuyển vị hạt nhân. Theo một số phương án, chất ức chế AR thể hệ thứ ba ức chế hoạt tính polypeptit AR đột biến cũng bị ức chế bằng chất ức chế AR thể hệ thứ nhất hoặc thứ hai.

Như được sử dụng ở đây, cụm từ “kháng với sự ức chế” đề cập đến việc giảm khả năng của chất đối kháng AR để ức chế (nghĩa là, đối kháng) một hoặc nhiều hoạt tính của polypeptit AR bị biến đổi so với polypeptit AR loại tự do. Ví dụ, chất đối kháng AR là ít hiệu quả ở ức chế polypeptit AR bị biến đổi so với polypeptit AR loại tự do. Theo một số phương án, hoạt tính đối kháng giảm chống lại polypeptit AR bị biến đổi nằm trong khoảng 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% hoặc 100% so với hoạt tính đối kháng chống lại polypeptit AR kiểu đại. Mẫu hoạt tính AR bao gồm, nhưng không giới hạn đến, gắn kết đồng chất hoạt hóa, gắn kết ADN, gắn kết phối tử, hoặc chuyển vị hạt nhân. Theo một số phương án, chất đối kháng AR là không thể liên kết hoặc liên kết với ái lực được làm giảm với polypeptit AR bị biến đổi.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chất ức chế AR thể hệ thứ hai” hoặc “chất đối kháng AR thể hệ thứ hai” được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này và đề cập đến chất mà thể hiện toàn bộ hoạt tính chất đối kháng của polypeptit AR kiểu đại, nhưng không thể hiện toàn bộ hoạt tính chất đối kháng của polypeptit AR chứa một hoặc nhiều axit amin biến đổi kháng đối với sự ức chế, như biến đổi ở vị trí axit amin 876 trong polypeptit AR. Theo một số phương án, chất ức chế AR thể hệ thứ hai không thể hiện toàn bộ hoạt tính chất đối kháng trên polypeptit AR có sự thay thế axit amin là F876L. Theo một số phương án, chất ức chế AR thể hệ thứ hai gây ra hoạt tính AR (nghĩa là, chất chủ vận AR) ở nồng độ tương đương hoặc cao hơn nồng độ cần thiết để ức chế AR kiểu đại. Chất ức chế AR thể hệ thứ hai khác với chất ức chế AR thể hệ thứ nhất, như bicalutamit và flutamit, trong đó chất ức chế AR thể hệ thứ hai hoạt động như toàn bộ chất đối kháng trong các tế bào biểu hiện mức độ cao của AR, như ví dụ, trong ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt (CRPC). Chất ức chế AR thể hệ thứ nhất, như bicalutamit và flutamit, hoạt động như chất chủ vận

trong CRPC. Mẫu chất ức chế AR thế hệ thứ hai bao gồm ARN-509, enzalutamit và RD162. Theo một số phương án, chất ức chế AR thế hệ thứ hai là chất chủ vận của polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, chất ức chế AR thế hệ thứ hai liên kết với polypeptit AR tại hoặc gần gần kết phối tử site của polypeptit AR.

Thuật ngữ “axit nucleic” đề cập đến deoxyribonucleotit, deoxyribonucleosit, ribonucleosit, hoặc ribonucleotit và polyme của chúng ở dạng sợi đơn hoặc sợi kép. Trừ khi giới hạn cụ thể, thuật ngữ bao gồm axit nucleic chứa chất tương tự đã biết của nucleotit tự nhiên mà có đặc tính tương tự như axit nucleic và được chuyển hóa theo cách tương tự để nucleotit xảy ra tự nhiên. Trừ khi giới hạn cụ thể khác, thuật ngữ cũng đề cập đến chất tương tự oligonucleotit bao gồm PNA (axit peptidonucleic), chất tương tự ADN được sử dụng trong công nghệ antisense (ví dụ, photphorothioates, photphoroamidates). Khi có quy định khác, chuỗi axit nucleic riêng biệt cũng hoàn toàn bao gồm biến thể bị biến đổi vừa phải của chúng (bao gồm nhưng không giới hạn đến, các thay thế mã thoái biến) và bổ sung trình tự cũng như trình tự chỉ ra một cách rõ ràng. Cụ thể, các thay thế mã thoái biến được thực hiện bằng cách tạo ra trình tự trong đó, vị trí thứ ba của một hoặc nhiều mã được chọn (hoặc toàn bộ) được thay thế bằng hỗn bazơ và/hoặc lượng dư deoxyinosin (Batzer et al. (1991) *Axit nucleic Res.* 19:5081; Ohtsuka et al. (1985) *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608; và Cassol et al. (1992) *Mol. Cell. Probes* 6, 327-331; và Rossolini et al. (1994) *Mol. Cell. Probes* 8:91-98).

Thuật ngữ “axit amin” đề cập đến axit amin xảy ra tự nhiên và không tự nhiên, cũng như chất tương tự axit amin và chất mô phỏng axit amin mà có chức năng theo cách tương tự để axit amin xảy ra tự nhiên. Axit amin được mã hóa tự nhiên là 20 axit amin phổ biến (alanin, arginin, asparagin, axit aspartic, xystein, glutamin, axit glutamic, glyxin, histidin, isoleuxin, leuxin, lyzin, methionin, phenylalanin, prolin, serin, threonin, tryptophan, tiroxin, và valin) và pyrolyzin và selenoxystein. Chất tương tự axit amin đề cập đến chất có cấu trúc hóa học cơ bản giống như axit amin xảy ra tự nhiên, ví dụ, cacbon α liên kết với hydro, nhóm cacboxyl, nhóm amin, và nhóm R, như, homoserin, norleuxin, methionin sulfoxit, methionin methyl sulfonium. Chất tương tự này có nhóm R bị biến đổi (như,

norleuxin) hoặc các mạch chính peptit bị biến đổi, nhưng giữ cấu trúc hóa học cơ bản giống như axit amin xảy ra tự nhiên.

Axit amin được tham chiếu ở đây bằng ba ký hiệu đã biết thông thường của nó hoặc bằng một ký tự được đề cập bởi ủy ban danh pháp hóa sinh IUPAC-IUB. Nucleotit, tương tự như vậy, được gọi bằng mã ký tự được chấp nhận thông thường của chúng.

Thuật ngữ “polypeptit”, peptit” và “protein” được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này đề cập đến polyme của lượng dư axit amin. Các thuật ngữ áp dụng đối với polyme axit amin xảy ra tự nhiên cũng như polyme axit amin trong đó, một hoặc nhiều lượng dư axit amin là axit amin xảy ra không phải tự nhiên, ví dụ, chất tương tự axit amin. Các thuật ngữ bao gồm chuỗi axit amin theo chiều dài bất kỳ, bao gồm toàn bộ các protein chiều dài, trong đó lượng dư axit amin được liên kết bằng các liên peptit cộng hóa trị.

Như được sử dụng ở đây, biến đổi đề cập đến sự biến đổi trình tự axit amin của polypeptit hoặc trình tự nucleotit trong phân tử axit nucleic và bao gồm loại bỏ, chèn, và thay thế axit amin và nucleotit tương ứng.

Để xác định phần trăm tương đồng của hai trình tự axit amin hoặc hai axit nucleic, các trình tự có thể được căn chỉnh cho mục đích so sánh tối ưu (ví dụ, khoảng trống được đưa vào trong trình tự axit amin thứ nhất hoặc trình tự axit nucleic cho liên kết tối ưu với trình tự amin thứ hai hoặc axit nucleic). Lượng dư axit amin hoặc nucleotit ở vị trí axit amin hoặc vị trí nucleotit tương ứng có thể sau đó được so sánh. Khi vị trí trong trình tự thứ nhất được sử dụng bằng lượng dư axit amin hoặc nucleotit tương tự như vị trí tương ứng trong trình tự thứ hai, sau đó các phân tử tương đồng ở vị trí đó. Phần trăm tương đồng giữa hai trình tự là chức năng của số các vị trí tương đồng được chia sẻ bởi các trình tự (nghĩa là, % tương đồng = $\frac{\text{\# các vị trí tương đồng}}{\text{tổng \# của các vị trí}}$ (ví dụ, các vị trí chồng chéo) $\times 100$). Theo một số phương án hai trình tự có chiều dài giống nhau.

Để xác định phần trăm tương đồng giữa hai trình tự, thuật toán của Karlin và Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-2268, được thay đổi trong Karlin và Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5877 là được sử dụng. Như thuật toán được hợp nhất thành chương trình NBLAST và XBLAST của Altschul, et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410. Tìm kiếm nucleotit BLAST được

thực hiện bằng chương trình NBLAST, số điểm=100, độ dài ký tự=12 để thu được trình tự nucleotit tương đồng với phân tử axit nucleic được mô tả hoặc bộc lộ trong bản mô tả này. Việc tìm kiếm protein BLAST được thực hiện bằng chương trình XBLAST, số điểm=50, độ dài ký tự=3. Để thu được sự căn chỉnh khoảng trống dùng cho mục đích so sánh, khoảng trống BLAST được sử dụng như được mô tả trong Altschul et al. (1997) *Axit nucleic Res.* 25:3389-3402. Khi sử dụng BLAST và khoảng trống chương trình BLAST, các thông số mặc định của chương trình tương ứng (ví dụ, XBLAST và NBLAST) là được sử dụng. Xem trang web của Trung Tâm Quốc Gia về Thông Tin Công Nghệ Sinh Học để biết thêm chi tiết (trên World Wide Web at ncbi.nlm.nih.gov). Protein thích hợp dùng cho sử dụng trong phương pháp được mô tả ở đây cũng bao gồm các protein có giữa 1 đến 15 thay đổi axit amin, ví dụ, các thay thế axit amin 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, hoặc 15, loại bỏ, hoặc bổ sung, so với trình tự axit amin của protein bất kỳ được mô tả ở đây. Theo phương án khác, trình tự axit amin được biến đổi ít nhất 75% tương đồng, ví dụ, 77%, 80%, 82%, 85%, 88%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% tương đồng với trình tự axit amin của protein bất kỳ được mô tả ở đây. Các protein biến thể trình tự này thích hợp dùng cho các phương pháp được mô tả ở đây miễn là hoạt tính sinh học đủ giữ trình tự axit amin được biến đổi với chức năng trong chế phẩm và các phương pháp được mô tả ở đây. Trường hợp các thay thế axit amin được thực hiện, các thay thế sẽ giữ các thay thế axit amin. Trong số các axit amin phổ biến, ví dụ, “bảo toàn sự thay thế axit amin” là được minh họa bằng cách thay thế một số axit amin trong mỗi nhóm sau đây: (1) glyxin, alanin, valin, leuxin, và isoleuxin, (2) phenylalanin, tiroxin, và tryptophan, (3) serin và threonin, (4) aspartat và glutamat, (5) glutamin và asparagin, và (6) lyzin, arginin và histidin. Những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này nhận ra rằng, nói chung, duy nhất các thay thế axit amin trong khu vực không cần thiết của polypeptit không làm thay đổi đáng kể hoạt tính sinh học (xem, ví dụ, Watson *et al.* *Molecular Biology of Gen*, 4th Edition, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. co., p.224). Bảng BLOSUM62 là ma trận thay thế axit amin có nguồn gốc từ khoảng 2,000 khu vực nhiều sự căn chỉnh các đoạn trình tự protein, đại diện cho các khu vực được bảo quản cao khoảng hơn 500 nhóm các protein liên quan (Henikoff et al (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:10915-10919). Theo đó, tần số thay thế BLOSUM62 là

được sử dụng để định nghĩa bảo toàn các thay thế axit amin mà, theo một số phương án, được đưa vào trình tự axit amin được mô tả hoặc được đề cập ở đây. Mặc dù nó có thể thiết lập các thay thế axit amin dựa vào các đặc tính hóa học (như được đề cập nêu trên), thuật ngữ “bảo toàn sự thay thế axit amin” tốt hơn dùng để thay thế được đại diện bởi trị số BLOSUM62 lớn hơn -1. Ví dụ, sự thay thế axit amin là bảo toàn nếu sự thay thế được đặc trưng bởi trị số BLOSUM62 khoảng 0, 1, 2, hoặc 3. Theo hệ thống này, được ưu tiên là bảo toàn các thay thế axit amin được đặc trưng bởi trị số BLOSUM62 khoảng ít nhất 1 (ví dụ, 1, 2 hoặc 3), trong khi được ưu tiên hơn là bảo toàn các thay thế axit amin được đặc trưng bởi trị số BLOSUM62 khoảng ít nhất 2 (ví dụ, 2 hoặc 3).

Như được sử dụng ở đây, lượng dư tương ứng đề cập đến lượng dư xảy ra ở quỹ đạo căn chỉnh. Polypeptit liên quan hoặc biến thể được liên kết bằng phương pháp bất kỳ đã biết bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp này thường tối đa hóa sự phù hợp, và bao gồm các phương pháp như sử dụng sự căn chỉnh bằng tay và bằng cách sử dụng sẵn có nhiều chương trình căn chỉnh (ví dụ, BLASTP) và phương pháp đã biết khác bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Bằng cách căn chỉnh trình tự polypeptit, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định lượng dư tương ứng, sử dụng được bảo quản và tương đồng lượng dư axit amin như hướng dẫn. Các vị trí tương ứng cũng có thể dựa trên sự căn chỉnh cấu trúc, ví dụ bằng cách sử dụng máy tính mô phỏng sự căn chỉnh của cấu trúc protein. Trong trường hợp khác, các khu vực tương ứng có thể được xác định.

Như được sử dụng ở đây, biến thể alen hoặc tham chiếu đến biến thể alen để polypeptit được mã hóa bằng gen khác từ dạng tham chiếu của gen (nghĩa là, được mã hóa bằng alen). Cụ thể, dạng tham chiếu của gen mã hóa dạng kiểu đại và/hoặc dạng trội của polypeptit từ tập hợp hoặc bộ phận tham chiếu đơn của loài. Cụ thể, biến thể alen, bao gồm biến thể giữa và một số loài, có ít nhất 80%, 90% hoặc lớn hơn sự tương đồng axit amin với kiểu đại và/hoặc dạng trội từ loài tương tự; mức độ tương đồng phụ thuộc vào gen và liệu sự so sánh giữa các loài hoặc các chủng loại. Thông thường, biến thể alen các chủng loại có ít nhất khoảng 80%, 85%, 90% hoặc 95% tương đồng hoặc lớn hơn với kiểu đại và/hoặc dạng trội, bao gồm 96%, 97%, 98%, 99% hoặc lớn hơn tương đồng với kiểu đại và/hoặc dạng trội của polypeptit.

Như được sử dụng ở đây, biến thể các loài đề cập đến biến thể của polypeptit tương tự giữa và một số loài. Thông thường, biến thể các loài có ít nhất khoảng 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, hoặc 95% tương đồng hoặc lớn hơn với kiểu đại và/hoặc dạng trội từ loài khác, bao gồm 96%, 97%, 98%, 99% hoặc lớn hơn tương đồng với kiểu đại và/hoặc dạng trội của polypeptit.

Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ "điều trị," "điều trị" hoặc "điều trị," và các đương lượng ngữ pháp khác, bao gồm làm dịu, làm giảm hoặc cải thiện một hoặc nhiều triệu chứng bệnh hoặc tình trạng bệnh, cải thiện, ngăn ngừa hoặc làm giảm bên ngoài, mức độ nghiêm trọng hoặc tần số của một hoặc nhiều triệu chứng bổ sung của bệnh hoặc tình trạng bệnh, cải thiện hoặc ngăn ngừa nguyên nhân chuyển hóa cơ bản của một hoặc nhiều triệu chứng bệnh hoặc tình trạng bệnh, ức chế bệnh hoặc tình trạng bệnh, như, ví dụ, làm chậm sự phát triển của bệnh hoặc tình trạng bệnh, giảm bớt bệnh hoặc tình trạng bệnh, gây thoái hóa của bệnh hoặc tình trạng bệnh, giảm bớt tình trạng bệnh được gây ra bởi bệnh hoặc tình trạng bệnh, hoặc ức chế triệu chứng của bệnh hoặc tình trạng bệnh cả phòng bệnh và/hoặc điều trị. Theo ví dụ không phải giới hạn, đối với lợi ích phòng bệnh, hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được đề cập ở đây được dùng cho riêng biệt có nguy cơ phát triển bệnh rối loạn đặc biệt, dẫn đến phát triển rối loạn đặc biệt, hoặc báo cáo riêng một hoặc nhiều triệu chứng sinh lý của bệnh rối loạn. Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được đề cập ở đây được dùng cho đối tượng điều trị sau đây bằng một hoặc nhiều tác nhân điều trị. Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được đề cập ở đây được dùng cho đối tượng kết hợp với điều trị bằng một hoặc nhiều tác nhân điều trị.

Như được sử dụng ở đây, việc ngăn ngừa hoặc phòng bệnh đề cập đến việc làm giảm nguy cơ phát triển bệnh hoặc tình trạng bệnh.

Các thuật ngữ "lượng hiệu quả", "lượng hiệu quả điều trị" hoặc "lượng hiệu quả được phẩm" như được sử dụng ở đây, đề cập đến lượng hợp chất chất ức chế AR đủ để điều trị bệnh rối loạn. Theo một số phương án, hiệu quả làm giảm trong và/hoặc làm dịu dấu hiệu, triệu chứng, hoặc gây ra bệnh rối loạn, hoặc bất kỳ sự thay đổi mong muốn khác của hệ thống sinh học. Ví dụ, "lượng hiệu quả" dùng cho điều trị sử dụng lượng chế phẩm này bao gồm hợp chất chất ức chế AR được đề cập ở đây được yêu cầu để cung cấp làm giảm đáng kể về mặt lâm sàng trong việc

làm rối loạn. Lượng thích hợp “hiệu quả” trong bất kỳ trường hợp riêng biệt được xác định bằng cách sử dụng bất kỳ kỹ thuật thích hợp, (ví dụ, nghiên cứu tăng liều).

Thuật ngữ "được dụng" như được sử dụng ở đây, đề cập đến vật liệu, (ví dụ, chất mang hoặc chất pha loãng), mà không phá hủy hoạt tính sinh học hoặc đặc tính của hợp chất chất ức chế AR được mô tả ở đây, và tương đối độc hại (nghĩa là, vật liệu được dùng riêng biệt mà không gây hiệu quả sinh học không mong muốn hoặc tương tác theo cách có hại với bất kỳ các thành phần chế phẩm trong đó nó được chứa).

Như được sử dụng ở đây, việc điều chỉnh đề cập đến mẫu về căn bản tương đồng với mẫu thử nghiệm, ngoại trừ việc nó không được điều trị bằng thông số thử nghiệm, hoặc, nếu nó là mẫu huyết tương, có thể từ tình nguyện viên bình thường không bị ảnh hưởng với tình trạng bệnh quan tâm. Việc kiểm soát cũng có thể kiểm soát bên trong.

Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ "đối tượng", "riêng biệt" và "bệnh nhân" được sử dụng thay thế cho nhau. Không có thuật ngữ được giải thích như yêu cầu giám sát của chuyên gia y tế (ví dụ, bác sĩ, y tá, trợ lý bác sĩ, hộ lý, nhân viên chăm sóc đặc biệt). Như được sử dụng ở đây, đối tượng có thể là động vật bất kỳ, bao gồm động vật có vú (ví dụ, người hoặc động vật không phải người) và không phải động vật có vú. Theo một phương án về các phương pháp và chế phẩm được đề xuất trong bản mô tả này, động vật có vú là người.

Như được sử dụng ở đây, “tiếp xúc” đề cập đến hành động chạm, làm tiếp xúc, hoặc mang chất vào gần ngay lập tức. "Tiếp xúc" có thể đạt được bằng cách trộn các thành phần trong hỗn hợp lỏng hoặc bán lỏng.

Tổng quan: Chức năng AR và thuốc kháng ung thư

Thụ thể androgen (AR) là một phân tử của steroid và siêu họ thụ thể hạt nhân. Trong họ lớn này của protein, chỉ có năm thụ thể steroid ở động vật có xương sống là được biết và bao gồm thụ thể androgen, thụ thể estrogen, thụ thể progesteron, thụ thể glucocorticoid, và thụ thể mineralocorticoid. AR là protein hòa tan mà chức năng như yếu tố phiên mã nội bào. Chức năng AR được điều chỉnh bằng cách gắn kết của các androgen, mà thay đổi hình dạng dây bắt đầu của thụ thể mà hiệu quả tương tác thụ thể protein và tương tác thụ thể ADN.

AR chủ yếu được biểu hiện trong mô đích androgen, như tiền liệt tuyến, cơ xương, gan, và hệ thần kinh trung ương (CNS), với mức biểu hiện cao nhất được quan sát trong tiền liệt tuyến, tuyến thượng thận, và mào tinh hoàn. AR trong trường hợp đã biết được hoạt hóa bằng cách gắn kết các androgen nội sinh, bao gồm testosterone và 5 α -dihydrotestosterone (5 α -DHT).

AR là thụ thể hạt nhân 110 kD mà, khi hoạt hóa bằng androgen, phiên mã trung gian của các gen đích điều chỉnh sự phát triển và biệt hóa của các tế bào biểu mô tiền liệt tuyến. AR được mã hóa bởi gen AR nằm trên nhiễm sắc thể X tại Xq11-12. Gen AR bao gồm 8 exon mã hóa toàn bộ chiều dài thụ thể androgen. Tương tự như các thụ thể steroid khác, AR được tháo chủ yếu được đặt trong bào tương và kết hợp với phức của protein sốc nhiệt (HSPs) thông qua tương tác với miền gắn kết phối tử. Khi chất chủ vận gắn kết, AR đi qua chuỗi các thay thế hình dạng: các protein sốc nhiệt phân tán từ AR, và AR bị biến đổi trải qua nị trùng hóa, photphoryl hóa, và chuyển vị vào hạt nhân, là trung gian bởi các tín hiệu định vị hạt nhân. Sau đó, thụ thể được di chuyển liên kết với yếu tố đáp ứng androgen (ARE), được đặc trưng bởi 5'-TGTTCT-3' trình tự liên ứng nửa ngồi hai hexameric sáu-nucleotit được sắp xếp lại đi lặp lại đảo ngược cách nhau bởi ba nucleotit ngẫu nhiên và được đặt trong vùng khởi đầu hoặc khu vực tăng cường của đích gen AR. Bổ sung bộ đồng điều chỉnh phiên mã khác (bao gồm chất đồng hoạt hóa và chất đồng ức chế) và máy phiên mã còn bảo đảm điều biến thích hợp của biểu hiện gen AR được điều chỉnh. Các quy trình được bắt đầu bằng cách thay đổi hình dạng gây ra bởi phối tử trong miền gắn kết phối tử.

Tín hiệu AR là quan trọng để phát triển và duy trì cơ quan sinh sản ở nam bao gồm tuyến tiền liệt, như hao tổn nuôi dưỡng con đực di truyền của biến thể AR chức năng và chuột được thí nghiệm với các khuyết tật AR không phát triển tiền liệt tuyến. Sự phụ thuộc này của các tế bào tiền liệt tuyến trên tín hiệu AR liên tục ngay cả khi biến đổi khối u. Sự suy giảm androgen (ví dụ, sử dụng chất chủ vận hormone giải phóng gonadotropin (GnRH)s liên tục là phương pháp điều trị ung thư tiền liệt tuyến. Tuy nhiên, sự suy giảm androgen thường có hiệu quả trong thời gian hạn chế và phát triển ung thư tiền liệt tuyến trở lại có khả năng tăng trưởng bất kể mức thấp của androgen tuần hoàn.

Ung thư tiền liệt tuyến là bệnh ung thư phổ biến nhất ở nam giới. Ung thư tiền liệt tuyến chiếm khoảng 29 phần trăm của tất cả các trường hợp ung thư mới được chuẩn đoán và 10 phần trăm các ca tử vong bệnh ung thư ở nam giới. Ngoài ra, Nam giới ở Mỹ trong suốt cuộc đời của họ có khoảng 17 phần trăm cơ hội phát triển ung thư tiền liệt tuyến xâm lấn. Tại chuẩn đoán ban đầu, tỷ lệ lớn ung thư tiền liệt tuyến có nguy cơ thấp đến trung bình, nghĩa là nguy cơ tử vong 10 năm là tương đối thấp (lên đến 24%) với sự can thiệp ít. Tuy nhiên, ung thư tiền liệt tuyến cao và di căn có sống sót trung bình khoảng 2,5-3 năm và thực hiện điều trị tích cực bao gồm phẫu thuật và điều trị cắt hóa học.

Cho rằng hầu hết các tế bào ung thư tiền liệt tuyến phụ thuộc vào AR cho sự tăng sinh và sống sót của chúng, điều trị thường bao gồm việc dùng chất mà ngăn chặn sản xuất của testosterone (ví dụ, chất chủ vận GnRHs), một mình hoặc kết hợp với kháng androgen (ví dụ, bicalutamid), đối kháng hiệu quả của testosterone còn lại bất kỳ. Đáng tiếc, trong khi thường ban đầu thành công như được chứng minh bằng cách nhỏ giọt kháng thể đặc hiệu tiền liệt tuyến (PSA) và thoái hóa của các khối u có thể nhìn thấy nếu có, khối u di căn không tránh khỏi trở nên kháng với điều trị hocmon ở giai đoạn không tồn tại điều trị chữa bệnh.

Ung thư tiền liệt tuyến kháng với điều trị hocmon hiện này gọi là 'kháng cắt', ngụ ý rằng họ có tiến triển ngoài các điểm mà tại đó các loại thuốc nhằm mục tiêu bất kỳ các điểm trên trục androgen sẽ có lợi ích lâm sàng bất kỳ. Chứng minh tiền lâm sàng và lâm sàng chỉ báo rằng AR là mục tiêu điều trị khả thi ngay cả khi kháng cắt bệnh ung thư. AR biến thể được báo cáo xảy ra lên đến 33 phần trăm của các trường hợp ung thư tiền liệt tuyến và thường được quan sát sau khi điều trị trong tình trạng kháng cắt phụ thuộc AR. Biến thể được tìm thấy rằng tính đặc hiệu phối tử thay đổi và hiệu nghiệm và kết quả trong hoạt tính thụ thể độc lập phối tử. Các biến thể đặc hiệu thay đổi rộng nhưng phụ thuộc vào phác đồ điều trị. Ngoài ra, tăng cường điều chỉnh của AR kết hợp với tiến triển với tình trạng kháng cắt trong cả các mô hình bệnh nhân và động vật.

Hai chất, abirateron axetat (Zytiga; CAS No. 154229-19-3) và MDV3100 (enzalutamid; CAS No. 915087-33-7), gần đây được sử dụng trong giai đoạn cuối thử nghiệm lâm sàng để điều trị ở nam giới với ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt (CRPC). Abirateron axetat đích 7- α -hydroxylaza/17,20-lyaza (CYP17A), do đó, ức

chế sinh tổng hợp androgen còn lại. MDV3100 là kháng androgen phát hiện trong bộ lọc để hoạt tính chất chủ vận thiếu kháng androgen có hiệu quả trong phạm vi quá biểu hiện AR. Hiệu quả lâm sàng của MDV3100 và abirateron axetat hỗ trợ giả thiết AR tiếp tục phát triển hoạt hóa và sống sót của ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt. Đáng tiếc, tương tự với điều trị cắt bỏ androgen thể hệ thứ nhất, điều trị kéo dài bằng abirateron axetat hoặc kết quả cuối cùng chất đối kháng AR thể hệ thứ hai trong kháng.

Kháng với abirateron axetat và MDV3100 đã được quan sát thấy trong cả hai mô hình của ung thư tiền liệt tuyến và trong bệnh nhân. Dữ liệu sơ bộ cho thấy, tương tự với ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt, phát triển kháng kháng androgen thể hệ thứ hai thông qua nhiều cơ chế và AR được cho là vẫn còn đích điều trị trong tình trạng này. Trong cả hai kiểu ghép ngoại lai và trong bệnh nhân, CYP17A tăng cường điều chỉnh và sự có mặt của các mức picogram của các androgen được ghi nhận trong các tập hợp kháng. CYP17A có lẽ tăng cường điều chỉnh hoạt hóa kháng thông qua hoạt tính AR bằng cách tổng hợp androgen intratumoral. Trong trường hợp khác, kháng tương quan với mức tăng AR cũng như khu trú hạt nhân. Ngoài ra, nhiều đường tế bào tín hiệu đã biết để AR hoạt tính trong sự vắng mặt của phối tử nội sinh có thể hoạt hóa kháng điều trị thể hệ thứ hai. Quan sát các khối u với mức độ cao của Src được hoạt hóa đáp ứng kém với điều trị MDV3100 và abirateron axetat hỗ trợ giả thiết này. Cho đến nay, không có biến thể AR được mô tả đặc tính kháng với MDV3100, ARN-509 hoặc abirateron.

ARN-509 là hợp chất thiohydantoin tổng hợp phát hiện bằng cách sử dụng hóa dược chỉ dẫn quan hệ hoạt tính cấu trúc (SAR) để xác định kháng androgen không phải steroid mà duy trì toàn bộ hoạt tính chất đối kháng trong tình trạng biểu hiện AR tăng. Hoạt tính kháng khối u biểu hiện ARN-509 trong kiểu ghép ngoại lai kháng và nhạy với cắt của ung thư tiền liệt tuyến và hiệu quả kháng androgenic ở chó mà cắt sự sao hình.

Tương đồng hóa của chất ức chế AR-dòng tế bào kháng và polypeptit AR đột biến

Được mô tả ở đây là chứng minh các ví dụ thực hiện sản xuất dòng tế bào kháng thuốc. Theo một số phương án, các phương pháp được đề cập được sử dụng để tạo ra dòng tế bào kháng lại sự ức chế bằng chất đối kháng AR thể hệ thứ hai, như, nhưng không giới hạn đến, ARN-509, enzalutamid (MDV3100) hoặc RD162.

Theo một số phương án, các phương pháp được đề cập được sử dụng để tạo ra dòng tế bào kháng lại sự ức chế bằng chất đối kháng AR mà ức chế sản xuất androgen và biểu hiện gắn kết với thụ thể AR. Theo một số phương án, chất đối kháng AR mà ức chế sản xuất androgen là chất ức chế CYP17A và biểu hiện gắn kết với AR. Theo một số phương án, chất đối kháng AR mà ức chế sản xuất androgen và biểu hiện gắn kết AR là galeteron (TOK001) hoặc abirateron axetat. Theo một số phương án, chất đối kháng AR mà ức chế sản xuất androgen và biểu hiện gắn kết AR là TAK-700.

Như được mô tả ở đây, dòng tế bào kháng được tạo ra trong cơ thể trong ghép ngoại lai tế bào ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt (CRPC) và trong ống nghiệm (*in vitro*) trong dòng tế bào ung thư tiền liệt tuyến đáp ứng androgen bằng cách tiếp xúc với nồng độ tăng của thuốc kháng androgen ARN-509 hoặc MDV3100. Trong sự tăng sinh tế bào và các thử nghiệm phiên mã, dòng tế bào được tách biệt thành hai loại riêng biệt.

Dòng tế bào loại 1 được biểu hiện mức độ cao của AR so với dòng tế bào bố mẹ và được tăng sinh của chúng trong sự vắng mặt của androgen được bổ sung. Phát triển độc lập phôi tử của các tế bào loại 1 không thay đổi trong sự có mặt của ARN-509, MDV3100 hoặc bicalutamid. Androgen tổng hợp, R1881, được giới hạn sự tăng sinh trong tế bào loại 1 và chống lại hoặc MDV3100 hoặc ARN-509, điều này chứng tỏ rằng AR trong các dòng tế bào vẫn liên kết với MDV3100 và ARN-509.

Dòng tế bào kháng loại 2 vẫn phụ thuộc androgen để tương tự phát triển như dòng tế bào bố mẹ của chúng. Trong khi ARN-509 và MDV3100 được giới hạn sự tăng sinh của dòng tế bào bố mẹ, cả các hợp chất được biểu hiện hoạt tính chất chủ vận và kích thích sự tăng sinh của dòng tế bào loại 2. Phân tích axit nucleic mã hóa AR ở dòng tế bào loại 2 cho thấy dòng tế bào được biểu hiện AR biến thể với biến thể trong miền gắn kết phôi tử. Biến thể biến thể thymidin (t) vào xytozin (C) sai nghĩa dẫn đến sự thay thế axit amin phenylalanin ở vị trí 876 của AR kiểu đại dùng cho leuxin (F876L).

Như được mô tả ở đây, theo các ví dụ, biến thể trong gen AR được xác định trong mẫu huyết tương from bệnh nhân ung thư tiền liệt tuyến chịu nghiên cứu lâm sàng 1/2 pha ARN-509. Biến thể được xác định bao gồm biến thể thymidin (t) vào xytozin (C) sai nghĩa ở vị trí 2988 (vị trí thứ nhất của bộ ba mã hóa phenylalanin, được mã hóa trong 8 exon của gen AR), và biến thể xytozin (C) đến alanin (A) sai nghĩa ở

vị trí 2990 (vị trí thứ ba của bộ ba mã hóa phenylalanin) trong sự thay thế axit amin phenylalanin ở vị trí 876 của AR kiểu đại dùng cho leuxin (F876L). Bệnh nhân được xác định là có biến thể này cũng thể hiện các mức tăng của kháng thể đặc hiệu tiền liệt tuyến (PSA) trong quá trình nghiên cứu chỉ ra increasing kháng lại điều trị.

Được mô tả ở đây là polypeptit AR đột biến chứa sự thay thế axit amin của phenylalanin ở vị trí 876 của AR kiểu đại dùng cho leuxin (F876L) và axit nucleic mã hóa polypeptit. Cũng được mô tả ở đây là các phương pháp sản xuất axit nucleic AR biến thể và polypeptit được mô tả ở đây. Cũng được mô tả ở đây là chế phẩm, sự tổ hợp và kit chứa axit nucleic AR biến thể và polypeptit được mô tả ở đây. Cũng đề cập đến phương pháp sử dụng polypeptit AR đột biến để xác định AR biến thể tương tác các phân tử, bao gồm các chất ức chế androgen, bao gồm các hợp chất ức chế AR thế hệ thứ ba. Cũng đề cập là chế phẩm chứa AR biến thể tương tác các phân tử, bao gồm dược phẩm của nó. Cũng được đề cập là các phương pháp điều trị sử dụng các phân tử tương tác AR biến thể được xác định. Cũng được mô tả ở đây là axit nucleic AR biến thể là axit nucleic tổng hợp. Cũng được mô tả ở đây là axit nucleic AR biến thể là các phân tử cADN. Cũng được mô tả ở đây là polypeptit AR đột biến được sản xuất bằng axit nucleic AR biến thể là axit nucleic tổng hợp. Cũng được mô tả ở đây là polypeptit AR đột biến được sản xuất bằng axit nucleic AR biến thể là các phân tử cADN. Cũng được mô tả ở đây là axit nucleic AR biến thể không chứa ADN genomic AR. Cũng được mô tả ở đây là axit nucleic AR biến thể không bị methyl hóa. Cũng được mô tả ở đây là axit nucleic AR biến thể không chứa trình tự intron AR. Cũng được mô tả ở đây là axit nucleic AR biến thể bao gồm trình tự của nucleotit từ hai hoặc nhiều hơn exon của trình tự genomic AR. Theo một số phương án, axit nucleic AR biến thể bao gồm trình tự nucleotit mã hóa phenylalanin ở vị trí tương ứng với vị trí 876 của polypeptit AR kiểu đại.

Như được mô tả ở đây, tương đồng hóa biến thể ở vị trí 876 trong AR, như ví dụ F876L, cho phép thiết kế và sàng lọc cho chất ức chế hiệu quả cho ức chế của biến thể AR có một hoặc nhiều kháng biến thể. Các chất ức chế này là hữu ích trong các ứng dụng lâm sàng và điều trị. Theo một số phương án, chất ức chế là hữu ích để điều trị bệnh ung thư, như ví dụ, bệnh ung thư trung gian AR, như, ví dụ, bệnh ung thư tiền liệt tuyến, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư gan (nghĩa là, thuộc tế bào

gan), hoặc bệnh ung thư bàng quang, như ví dụ, tiền liệt tuyến kháng thuốc, vú, gan (nghĩa là, thuộc tế bào gan), hoặc bệnh ung thư bàng quang.

Như được mô tả ở đây, theo một số phương án, đối tượng được sàng để tương đồng hóa biến thể ở vị trí 876 trong AR, như ví dụ F876L. Theo một số phương án, tương đồng hóa biến thể này cho phép dùng cho đơn thuốc của điều trị bệnh ung thư hoặc biến đổi của điều trị bệnh ung thư. Theo một số phương án, tương đồng hóa biến thể này được sử dụng để phân lớp đối tượng để điều trị cụ thể, như ví dụ, điều trị bằng chất ức chế mà ức chế hoạt tính của AR biến thể (nghĩa là, chất ức chế AR thể hệ thứ ba). Theo một số phương án, tương đồng hóa biến thể này được sử dụng để mô tả đối tượng có nguy cơ tái phát cao của bệnh hoặc tình trạng bệnh, như, ví dụ, bệnh ung thư tiền liệt tuyến, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư gan (nghĩa là, thuộc tế bào gan), hoặc bệnh ung thư bàng quang. Theo một số phương án, tương đồng hóa biến thể này được sử dụng để mô tả đối tượng thiếu đáp ứng với chất ức chế AR cụ thể, như ví dụ ARN-509, MDV3100, hoặc RD162. Theo một số phương án, tương đồng hóa biến thể này được sử dụng để mô tả đối tượng thiếu đáp ứng với chất ức chế AR là chất ức chế CYP17A, như, ví dụ galeteron (TOK001), TAK-700 hoặc abirateron axetat.

Polypeptit AR đột biến

Được đề xuất trong bản mô tả này là polypeptit AR đột biến. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến được phân lập là polypeptit AR đột biến được phân lập. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến được phân lập không phải polypeptit AR đột biến tự nhiên. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến được phân lập tái tổ hợp Polypeptit AR đột biến. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này biểu hiện hoạt tính thụ thể androgen. Ví dụ, polypeptit AR đột biến gắn kết với yếu tố đáp ứng androgen và biểu hiện hoạt hóa của gen đáp ứng AR. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến chứa một hoặc nhiều sự thay thế axit amin mà đề kháng với toàn bộ đối kháng bằng kháng androgen. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến chứa một hoặc nhiều sự thay thế axit amin mà đề kháng với toàn bộ đối kháng bằng chất ức chế AR thể hệ thứ hai, như, nhưng không giới hạn đến, ARN-509, enzalutamid (MDV3100) hoặc RD162. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến chứa một hoặc nhiều sự thay thế axit amin mà kháng đối với sự ức chế bằng ARN-509. Theo một số phương

án, polypeptit AR đột biến chứa một hoặc nhiều sự thay thế axit amin mà kháng đối với sự ức chế bằng enzalutamit (MDV3100). Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến chứa một hoặc nhiều sự thay thế axit amin mà kháng đối với sự ức chế bằng RD162.

Theo một số phương án, điều trị của polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này bằng chất ức chế AR thế hệ thứ hai gây ra hoạt tính AR. Ví dụ, chất ức chế AR thế hệ thứ hai hoạt động như chất chủ vận của polypeptit AR đột biến. Theo một số phương án, điều trị của polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này với ARN-509 gây ra hoạt tính AR. Theo một số phương án, điều trị của polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này với enzalutamit (MDV3100) gây ra hoạt tính AR. Theo một số phương án, điều trị của polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này bằng RD162 gây ra hoạt tính AR.

Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm sự biến đổi ở vị trí tương ứng với vị trí axit amin 876 của polypeptit AR kiểu đại được nêu trong SEQ ID NO: 1 (đăng ký số P10275) hoặc vị trí tương ứng trong polypeptit AR kiểu đại được biểu hiện tại SEQ ID NO: 2 (đăng ký số NP_000035,2). Theo một số phương án, sự biến đổi là thay thế phenylalanin của axit amin ở vị trí tương ứng với vị trí axit amin 876 của polypeptit AR kiểu đại được nêu ra trong SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, biến thể thụ thể androgen (AR) polypeptit không bao gồm phenylalanin ở vị trí tương ứng với vị trí axit amin 876 của polypeptit AR kiểu đại được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1.

Theo một số phương án, sự biến đổi là thay thế axit amin phenylalanin ở vị trí tương ứng với vị trí axit amino 876 của polypeptit AR kiểu đại được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1, và axit amino được thay thế được chọn trong số các leuxin, isoleuxin, valin, alanin, glyxin, methionin, serin, threonin, xystein, tryptophan, lyzin, arginin, histidin, prolin, tiroxin, asparagin, glutamin, axit aspartic và glutamic. Theo một số phương án, biến thể thụ thể androgen (AR) polypeptit bao gồm leuxin, isoleuxin, valin, alanin, glyxin, methionin, serin, threonin, xystein, tryptophan, lyzin, arginin, histidin, prolin, tiroxin, asparagin, glutamin, aspartic hoặc axit glutamic ở vị trí tương ứng với vị trí axit amin 876 của polypeptit AR kiểu đại được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, sự biến đổi là thay thế axit amin phenylalanin ở vị trí tương ứng với vị trí axit amin 876 của polypeptit AR kiểu đại

được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1, và axit amin được thay thế được chọn trong số các leuxin, isoleuxin, valin, alanin, glyxin, methionin và tryptophan. Theo một số phương án, biến thể thụ thể androgen (AR) polypeptit bao gồm leuxin, isoleuxin, valin, alanin, glyxin, methionin hoặc tryptophan ở vị trí tương ứng với vị trí axit amin 876 của polypeptit AR kiểu đại được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, sự biến đổi là thay thế axit amin phenylalanin vào leuxin ở vị trí tương ứng với vị trí axit amin 876 của polypeptit AR kiểu đại được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm leuxin ở vị trí tương ứng với vị trí axit amin 876 của polypeptit AR kiểu đại được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1.

Theo một số phương án, sự biến đổi bao gồm việc loại bỏ axit amin phenylalanin ở vị trí tương ứng với vị trí axit amin 876 của polypeptit AR kiểu đại được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1.

Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm tạo trình tự axit amin được biểu hiện tại SEQ ID NO: 5. Theo một số phương án polypeptit AR đột biến bao gồm polypeptit có leuxin ở vị trí tương ứng với vị trí axit amin 876 và có trình tự axit amin 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% tương đồng với polypeptit có trình tự được biểu hiện tại SEQ ID NO: 5. Theo một số phương án polypeptit AR đột biến bao gồm polypeptit không có phenylalanin ở vị trí tương ứng với vị trí axit amin 876 và có trình tự axit amin 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% tương đồng với polypeptit có trình tự được biểu hiện tại SEQ ID NO: 5.

Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm sự biến đổi ở vị trí axit amin 876 và biến đổi ở một hoặc nhiều vị trí axit amin bổ sung. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm sự biến đổi ở vị trí axit amin 876 và biến đổi ở 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 hoặc nhiều vị trí axit amin. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm sự biến đổi ở vị trí 876 và biến đổi ở một vị trí axit amin bổ sung. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm leuxin ở vị trí axit amin 876 và biến đổi ở 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 hoặc nhiều vị trí axit amin bổ sung. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm leuxin ở vị trí 876 và

biến đổi ở một vị trí axit amin bổ sung. Theo một số phương án, sự biến đổi ở vị trí axit amin 876 là sự thay thế F876L.

Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm sự biến đổi ở vị trí 876 và biến đổi ở vị trí axit amin bổ sung mà kháng với chất đối kháng AR thể hệ thứ nhất hoặc thứ hai hoặc chất đối kháng AR mà ức chế sản xuất androgen. Theo một số phương án, sự biến đổi ở vị trí axit amin bổ sung vào sự biến đổi ở axit amin 876 tăng kháng của polypeptit AR với chất đối kháng AR thể hệ thứ nhất hoặc thứ hai hoặc chất đối kháng AR mà ức chế sản xuất androgen so với polypeptit AR bao gồm sự biến đổi ở một vị trí axit amin 876. Theo một số phương án, sự biến đổi ở vị trí axit amin 876 là sự thay thế F876L.

Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm sự biến đổi ở vị trí 876 và biến đổi được chọn trong số các AR biến đổi described in, ví dụ, Grasso et al. (2012) *Nature* 487(7406):239-43; Ning et al. (2012) *Urology* 80(1):216-8; Cong et al. (2012) *Gen* 500(2):220-3; Hay et al. (2012) *PLoS One* 2012;7(3):e32514; Koochekpour (2010) *Asian J Androl.* 12(5):639-57 ; Waltering et al. (2012) *Mol Cell Endocrinol.* 360:38-43; Robbins (2012) *Mol Cell Endocrinol.* 352(1-2):26-33; hoặc Gottlieb et al. (2012) *Hum Mutat.* 33(5):887-94. Theo một số phương án, sự biến đổi ở vị trí axit amin 876 là sự thay thế F876L.

Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm sự biến đổi ở vị trí 876 và biến đổi được chọn trong số các AR biến đổi kết hợp với ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt. Theo một số phương án, sự biến đổi kết hợp với ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt là sự thay thế axit amin như, ví dụ, T877A, W741C, W741L, W741R, L701H or H874Y. Theo một số phương án, sự biến đổi ở vị trí axit amin 876 là sự thay thế F876L.

Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm sự biến đổi ở vị trí axit amin 876 và biến đổi ở vị trí axit amin 877. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm leuxin ở vị trí 876 và biến đổi ở vị trí axit amin 877. Theo một số phương án, sự biến đổi ở vị trí axit amin 877 là sự thay thế axit amin threonin. Theo một số phương án, axit amin được thay thế ở vị trí axit amin 877 được chọn trong số các leuxin, isoleuxin, valin, alanin, phenylalanin, glyxin, methionin, serin, xystein, tryptophan, lyzin, arginin, histidin, prolin, tiroxin, asparagin, glutamin, axit axit aspartic và glutamic. Theo một số phương án, axit amin được thay thế ở vị trí

axit amin 877 là alanin. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm sự biến đổi ở vị trí 876 và alanin ở vị trí axit amin 877. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm leuxin ở vị trí 876 và alanin ở vị trí axit amin 877.

Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm sự biến đổi ở vị trí 876 và biến đổi ở vị trí axit amin 741. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm leuxin ở vị trí 876 và biến đổi ở vị trí axit amin 741. Theo một số phương án, sự biến đổi ở vị trí axit amin 741 là sự thay thế axit amin tryptophan. Theo một số phương án, axit amin được thay thế ở vị trí axit amin 741 được chọn trong số các leuxin, isoleuxin, valin, alanin, phenylalanin, glyxin, methionin, serin, threonin, xystein, lyzin, arginin, histidin, prolin, tiroxin, asparagin, glutamin, axit axit aspartic và glutamic. Theo một số phương án, axit amin được thay thế ở vị trí axit amin 741 là leuxin, xystein hoặc arginin. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm sự biến đổi ở vị trí 876 và leuxin ở vị trí axit amin 741. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm sự biến đổi ở vị trí 876 và xystein ở vị trí axit amin 741. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm sự biến đổi ở vị trí 876 và arginin ở vị trí axit amin 741. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm leuxin ở vị trí 876 và leuxin ở vị trí axit amin 741. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm leuxin ở vị trí 876 và xystein ở vị trí axit amin 741. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm leuxin ở vị trí 876 và arginin ở vị trí axit amin 741.

Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm sự biến đổi ở vị trí 876 và biến đổi ở vị trí axit amin 701. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm leuxin ở vị trí 876 và biến đổi ở vị trí axit amin 701. Theo một số phương án, sự biến đổi ở vị trí axit amin 701 là sự thay thế axit amin leuxin. Theo một số phương án, axit amin được thay thế ở vị trí axit amin 701 được chọn trong số các isoleuxin, valin, alanin, phenylalanin, glyxin, methionin, histidin, serin, threonin, xystein, lyzin, arginin, tryptophan, prolin, tiroxin, asparagin, glutamin, axit axit aspartic và glutamic. Theo một số phương án, axit amin được thay thế ở vị trí axit amin 701 là histidin. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm sự biến đổi ở vị trí 876 và histidin ở vị trí axit amin 701. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm leuxin ở vị trí 876 và histidin ở vị trí axit amin 701.

Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm sự biến đổi ở vị trí 876 và biến đổi ở vị trí axit amin 874. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm leuxin ở vị trí 876 và biến đổi ở vị trí axit amin 874. Theo một số phương án, sự biến đổi ở vị trí axit amin 874 là sự thay thế axit amin histidin. Theo một số phương án, axit amin được thay thế ở vị trí axit amin 874 được chọn trong số các leuxin, isoleuxin, valin, alanin, phenylalanin, glyxin, methionin, serin, threonin, xystein, lyzin, arginin, tryptophan, prolin, tiroxin, asparagin, glutamin, axit axit aspartic và glutamic. Theo một số phương án, axit amin được thay thế ở vị trí axit amin 874 là tiroxin. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm sự biến đổi ở vị trí 876 và tiroxin ở vị trí axit amin 874. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm leuxin ở vị trí 876 và tiroxin ở vị trí axit amin 874.

Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến là polypeptit AR đột biến bao gồm sự biến đổi ở vị trí 876 và một hoặc nhiều vị trí axit amin bổ sung so với polypeptit AR kiểu đại được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1. Mẫu biến thể bao gồm, ví dụ, biến thể các loài, biến thể alen, biến thể nối ARN và biến thể chứa biến thể axit amin bảo toàn và không bảo toàn. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm dải polyglutamin khoảng 6 phần dư glutamin liên tiếp đến 39 phần dư glutamin liên tiếp. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm dải polyglutamin khoảng 16 phần dư glutamin liên tiếp đến 29 phần dư glutamin liên tiếp. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm dải polyglutamin khoảng 21 phần dư glutamin liên tiếp. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm dải polyglutamin khoảng 22 phần dư glutamin liên tiếp. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm dải polyglutamin khoảng 23 phần dư glutamin liên tiếp. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm dải polyglyxin khoảng 10 liên tiếp glyxin phần dư đến 27 liên tiếp glyxin phần dư. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm dải polyglyxin khoảng 23 liên tiếp glyxin phần dư. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm dải polyglyxin khoảng 24 liên tiếp glyxin phần dư.

Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm một phần của polypeptit AR đột biến được biểu hiện tại SEQ ID NO: 5. Theo một số phương án, biểu hiện một phần hoạt tính của polypeptit AR. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm ADN miền gắn kết của polypeptit AR và miền gắn kết phối tử

của polypeptit AR bao gồm sự biến đổi ở vị trí axit amin 876 của polypeptit AR đột biến được biểu hiện tại SEQ ID NO: 5. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến chủ yếu chứa việc ADN miền gắn kết của polypeptit AR và miền gắn kết phối tử của polypeptit AR bao gồm sự biến đổi ở vị trí axit amin 876 của polypeptit AR đột biến được biểu hiện tại SEQ ID NO: 5. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm tạo trình tự axit amin từ khoảng vị trí axit amin 554 đến vị trí axit amin 919 của polypeptit AR đột biến được biểu hiện tại SEQ ID NO: 5. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm miền gắn kết phối tử của polypeptit AR đột biến. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến chủ yếu chứa việc miền gắn kết phối tử của polypeptit AR đột biến. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm tạo trình tự axit amin từ khoảng vị trí axit amin 554 đến vị trí axit amin 919.

Theo một số phương án, polypeptit AR là protein kết hợp bao gồm miền gắn kết phối tử của polypeptit AR bao gồm sự biến đổi ở vị trí axit amin 876 của polypeptit AR kiểu đại được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1 liên kết với polypeptit khác loại. Theo một số phương án, sự biến đổi là sự thay thế axit amin là F876L. Các phương pháp dùng cho thể hệ của các protein kết hợp là được biết trong kỹ thuật này và bao gồm các kỹ thuật ADN tái tổ hợp tiêu chuẩn. Ví dụ, theo một số phương án, các đoạn ADN mã hóa cho trình tự polypeptit khác nhau là được thất cùng nhau trong khung phù hợp với các kỹ thuật thông thường, ví dụ bằng cách áp dụng phần cuối đầu cùn hoặc đầu chữ chi để thất, sự tiêu hóa enzym hạn chế để cung cấp cho phần cuối thích hợp, độn đầy trong đầu gắn kết là thích hợp, điều trị photphataza kiềm để tránh sự ghép nối không mong muốn, và thất enzymatic. Theo một số phương án, gen kết hợp có thể được tổng hợp bằng các kỹ thuật thông thường bao gồm sự tổng hợp ADN tự động. Theo một số phương án, khuếch đại PCR của các đoạn gen có thể được thực hiện bằng cách sử dụng mỗi mỏ neo đưa lên phần nhô bổ sung giữa hai đoạn gen liên tiếp sau đó có thể được ủ và được khuếch đại lại để tạo ra trình tự gen chimeric (xem, ví dụ, *Current Phác đồ in Molecular Biology*, eds. Ausubel et al. John Wiley & Sons: 1992). Theo một số phương án, vectơ biểu hiện có sẵn trên thị trường mã hóa nửa kết hợp (ví dụ, polypeptit GST). Axit nucleic mã hóa polypeptit AR bị biến đổi có thể được nhân bản vô tính thành vectơ biểu hiện

này như vậy nửa kết hợp là được kết hợp trong khung với polypeptit AR được biến đổi.

Theo một số phương án, polypeptit AR là protein kết hợp bao gồm miền gắn kết phối tử của polypeptit AR bao gồm sự biến đổi ở vị trí axit amin 876 của polypeptit AR kiểu đại được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1 liên kết với miền gắn kết ADN khác loại. Theo một số phương án, polypeptit AR là protein kết hợp bao gồm miền gắn kết phối tử của polypeptit AR đột biến được biểu hiện tại SEQ ID NO: 5 liên kết với miền gắn kết ADN khác loại. Theo một số phương án miền gắn kết ADN khác loại là miền gắn kết GAL4 ADN. Theo một số phương án miền gắn kết ADN khác loại là miền gắn kết LexA ADN. Theo một số phương án, miền gắn kết phối tử của polypeptit AR bao gồm sự biến đổi ở vị trí axit amin 876 của polypeptit AR kiểu đại được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1 liên kết với miền gắn kết ADN khác loại thông qua mối liên kết peptit. Theo một số phương án, polypeptit AR là protein kết hợp bao gồm miền gắn kết phối tử của polypeptit AR đột biến được biểu hiện tại SEQ ID NO: 5 liên kết với miền gắn kết ADN khác loại thông qua mối liên kết peptit.

Theo một số phương án, polypeptit AR là protein kết hợp bao gồm miền gắn kết phối tử của polypeptit AR bao gồm sự biến đổi ở vị trí axit amin 876 của polypeptit AR kiểu đại được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1 liên kết với peptit khác loại để sử dụng trong thử nghiệm tương tác protein, như, nhưng không giới hạn đến thử nghiệm hybrid hai men, hệ thống hai hybrid dựa trên tế bào động vật có vú (M2H), thử nghiệm (FRET) chuyển dịch năng lượng cộng hưởng Förster (Huỳnh quang), chuyển dịch năng lượng cộng hưởng phát quang sinh học (BRET), hoặc thử nghiệm huỳnh quang phân giải thời gian tương đồng (HTRF®). Theo một số phương án, polypeptit AR là protein kết hợp bao gồm miền gắn kết phối tử của polypeptit AR đột biến được biểu hiện tại SEQ ID NO: 5 liên kết với peptit khác loại để sử dụng trong thử nghiệm tương tác protein, như, nhưng không giới hạn đến thử nghiệm hybrid hai men, hệ thống hai hybrid dựa trên tế bào động vật có vú (M2H), thử nghiệm (FRET) chuyển dịch năng lượng cộng hưởng Förster (Huỳnh quang), chuyển dịch năng lượng cộng hưởng phát quang sinh học (BRET), hoặc thử nghiệm huỳnh quang phân giải thời gian tương đồng (HTRF®).

Theo một số phương án, miền gắn kết phối tử của polypeptit AR bao gồm sự biến đổi ở vị trí axit amin 876 của polypeptit AR kiểu đại được biểu hiện tại SEQ ID

NO: 1 liên kết với polypeptit có thể tìm ra. Theo một số phương án, miền gắn kết phối tử của polypeptit AR đột biến được biểu hiện tại SEQ ID NO: 5 là liên kết với polypeptit có thể tìm ra. Theo một số phương án, miền gắn kết phối tử của polypeptit AR bao gồm sự biến đổi ở vị trí axit amin 876 của polypeptit AR kiểu đại được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1 liên kết với protein huỳnh quang, như, nhưng không giới hạn đến, protein huỳnh quang màu xanh lá cây (GFP), màu đỏ (RFP), màu lục lam (CFP), màu vàng (YFP), hoặc màu xanh (BFP). Theo một số phương án, miền gắn kết phối tử của polypeptit AR đột biến được biểu hiện tại SEQ ID NO: 5 là liên kết với protein huỳnh quang, như, nhưng không giới hạn đến, protein huỳnh quang màu xanh lá cây (GFP), màu đỏ (RFP), màu lục lam (CFP), màu vàng (YFP), hoặc màu xanh (BFP). Theo một số phương án, miền gắn kết phối tử của polypeptit AR bao gồm sự biến đổi ở vị trí axit amin 876 của polypeptit AR kiểu đại được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1 liên kết với protein phát quang sinh học. Theo một số phương án, miền gắn kết phối tử của polypeptit AR đột biến được biểu hiện tại SEQ ID NO: 5 là liên kết với protein phát quang sinh học. Theo một số phương án, miền gắn kết phối tử của polypeptit AR bao gồm sự biến đổi ở vị trí axit amin 876 của polypeptit AR kiểu đại được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1 liên kết với tag peptit. Theo một số phương án, miền gắn kết phối tử của polypeptit AR đột biến được biểu hiện tại SEQ ID NO: 5 là liên kết với tag peptit. Theo một số phương án, tag peptit là tag epitope được nhận dạng bằng kháng thể đặc hiệu tag. Theo một số phương án tag là tag epitope, như, nhưng không giới hạn đến c-myc, V-5, hemagglutinin (HA), FLAG. Theo một số phương án tag là tag ái lực, như, nhưng không giới hạn đến, biotin, strep-tag, protein gắn kết chitin (CBP), protein gắn kết maltoza (MBP), glutathione-S-chuyển dịchase (GST), hoặc tag poly(His).

Theo một số phương án, được đề xuất trong bản mô tả này là chuỗi bao gồm polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến là liên kết với vi mạch. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến là liên kết trực tiếp với vi mạch. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến là liên kết gián tiếp với vi mạch thông qua bộ liên kết. Theo một số phương án, được đề xuất trong bản mô tả này là vi mạch chuỗi bao gồm polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này.

Axit nucleic

Được đề xuất trong bản mô tả này là axit nucleic mã hóa Polypeptit AR đột biến. Được đề xuất trong bản mô tả này là axit nucleic mã hóa bất kỳ của polypeptit AR đột biến được mô tả ở đây. Các phương pháp dùng cho suy luận axit nucleic mà cụ thể mã hóa polypeptit AR là được biết trong kỹ thuật này và liên quan đến các kỹ thuật sinh học phân tử tiêu chuẩn. Mẫu axit nucleic mã hóa Polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này là được cung cấp. Điều này được hiểu rằng do sự suy thoái của sự tồn tại axit nucleic nhiều biến thể mã gen mã hóa polypeptit tương tự. Axit nucleic mã hóa polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này bao gồm biến thể này. Theo một số phương án, axit nucleic AR biến thể là axit nucleic tổng hợp. Theo một số phương án, axit nucleic AR biến thể là các phân tử cADN. Theo một số phương án, axit nucleic AR biến thể không chứa ADN genomic. Theo một số phương án, axit nucleic AR biến thể không bị methyl hóa. Theo một số phương án, axit nucleic AR biến thể không chứa trình tự genomic AR. Theo một số phương án, axit nucleic AR biến thể bao gồm trình tự nucleotit từ hai hoặc nhiều hơn exon của trình tự genomic AR, bao gồm 8 exon hoặc vị trí của chúng bao gồm tạo trình tự axit nucleic mã hóa ở vị trí 876 của polypeptit AR. Theo một số phương án, axit nucleic AR biến thể bao gồm trình tự nucleotit mã hóa phenylalanin ở vị trí tương ứng với vị trí 876 của polypeptit AR kiểu dại.

Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa Polypeptit AR đột biến bao gồm sự biến đổi so với axit nucleic mã hóa polypeptit AR kiểu dại. Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa polypeptit AR đột biến bao gồm sự biến đổi nơi polypeptit được mã hóa bao gồm sự thay thế axit amin phenylalanin ở vị trí tương ứng với vị trí axit amin 876 của polypeptit AR kiểu dại được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa polypeptit AR đột biến bao gồm sự biến đổi nơi polypeptit được mã hóa không bao gồm phenylalanin ở vị trí tương ứng với vị trí axit amin 876 của polypeptit AR kiểu dại được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1.

Theo một số phương án axit nucleic biến đổi là biến thể sai nghĩa hoặc loại bỏ của một hoặc nhiều bộ ba mã hóa polypeptit. Theo một số phương án, sự biến đổi là biến thể sai nghĩa chuyển đổi bộ ba axit nucleic mã hóa phenylalanin ở vị trí amin 876 của polypeptit AR. Theo một số phương án, bộ ba axit nucleic mã hóa phenylalanin ở vị trí amin 876 của polypeptit AR là TTC hoặc TTT. Theo một số

phương án, bộ ba axit nucleic mã hóa phenylalanin ở vị trí amin 876 của polypeptit AR là TTC. Theo một số phương án, bộ ba axit nucleic mã hóa phenylalanin ở vị trí amin 876 của polypeptit AR là TTT. Theo một số phương án, thay đổi biến đổi bộ ba axit nucleic mã hóa phenylalanin ở vị trí amin 876 của polypeptit AR từ TTC đến bộ ba axit nucleic mã hóa leuxin. Theo một số phương án, thay đổi biến đổi bộ ba axit nucleic mã hóa phenylalanin ở vị trí amin 876 của polypeptit AR từ TTT đến bộ ba axit nucleic mã hóa leuxin. Theo một số phương án, bộ ba axit nucleic mã hóa leuxin được chọn trong số các TTA, TTG, CTT, CTC, CTA hoặc CTG.

Theo một số phương án, sự biến đổi là biến thể sai nghĩa bao gồm sự thay thế của Thymin (T) cho Xytozin (C). Theo một số phương án, thay đổi biến đổi bộ ba axit nucleic mã hóa phenylalanin ở vị trí amin 876 của polypeptit AR từ TTC đến CTC. Theo một số phương án, sự biến đổi là biến thể sai nghĩa bao gồm sự thay thế của Thymin (T) cho Xytozin (C) ở vị trí axit nucleic 2626 của trình tự axit nucleic AR được biểu hiện tại SEQ ID NO:18.

Theo một số phương án, sự biến đổi là biến thể sai nghĩa bao gồm sự thay thế của Thymin (T) cho Adenin (A). Theo một số phương án, thay đổi biến đổi bộ ba axit nucleic mã hóa phenylalanin ở vị trí amin 876 của polypeptit AR từ TTT đến TTA. Theo một số phương án, sự biến đổi là biến thể sai nghĩa bao gồm sự thay thế của Thymin (T) cho Adenin (A) ở vị trí axit nucleic 2628 của trình tự axit nucleic AR được biểu hiện tại SEQ ID NO:18.

Theo một số phương án, sự biến đổi là biến thể sai nghĩa bao gồm sự thay thế của Thymin (T) cho Guanin (G). Theo một số phương án, thay đổi biến đổi bộ ba axit nucleic mã hóa phenylalanin ở vị trí amin 876 của polypeptit AR từ TTT đến TTG. Theo một số phương án, sự biến đổi là biến thể sai nghĩa bao gồm sự thay thế của Thymin (T) cho Guanin (G) ở vị trí axit nucleic 2628 của trình tự axit nucleic AR được biểu hiện tại SEQ ID NO:18.

Theo một số phương án, sự biến đổi bao gồm biến thể sai nghĩa bao gồm sự thay thế của Thymin (T) cho Xytozin (C) ở vị trí thứ nhất của bộ ba mã hóa F876 của polypeptit AR và biến thể sai nghĩa thứ hai bao gồm sự thay thế của Thymin (T) cho Adenosine (A) ở vị trí thứ ba của bộ ba mã hóa F876 của polypeptit AR. Theo một số phương án, thay đổi biến đổi bộ ba axit nucleic mã hóa phenylalanin ở vị trí amin 876 của polypeptit AR từ TTT đến CTA. Theo một số phương án, sự biến đổi

là biến thể sai nghĩa bao gồm sự thay thế của Thymin (T) cho Xytozin (C) ở vị trí axit nucleic 2626 và biến thể sai nghĩa thứ hai bao gồm sự thay thế của Thymin (T) cho Adenosine (A) ở vị trí axit nucleic 2628 của trình tự axit nucleic AR được biểu hiện tại SEQ ID NO:18.

Theo một số phương án, sự biến đổi bao gồm biến thể sai nghĩa bao gồm sự thay thế của Thymin (T) cho Xytozin (C) ở vị trí thứ nhất của bộ ba mã hóa F876 của polypeptit AR và biến thể sai nghĩa thứ hai bao gồm sự thay thế của Thymin (T) cho Guanin (G) ở vị trí thứ ba của bộ ba mã hóa F876 của polypeptit AR. Theo một số phương án, thay đổi biến đổi bộ ba axit nucleic mã hóa phenylalanin ở vị trí amin 876 của polypeptit AR từ TTT đến CTG. Theo một số phương án, sự biến đổi là biến thể sai nghĩa bao gồm sự thay thế của Thymin (T) cho Xytozin (C) ở vị trí axit nucleic 2626 và biến thể sai nghĩa thứ hai bao gồm sự thay thế của Thymin (T) cho Guanin (G) ở vị trí axit nucleic 2628 của trình tự axit nucleic AR được biểu hiện tại SEQ ID NO:18.

Theo một số phương án axit nucleic mã hóa polypeptit AR đột biến bao gồm trình tự của nucleotit được biểu hiện tại SEQ ID NO: 19. Theo một số phương án axit nucleic mã hóa polypeptit AR đột biến bao gồm axit nucleic có trình tự axit nucleotit 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% tương đồng với axit nucleic có trình tự của nucleotit được biểu hiện tại SEQ ID NO: 19, trong đó AR biến thể được mã hóa bao gồm sự biến đổi so với polypeptit AR kiểu đại ở vị trí tương ứng với vị trí axit amin 876. Theo một số phương án axit nucleic mã hóa polypeptit AR đột biến bao gồm axit nucleic có trình tự axit nucleotit 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% tương đồng với axit nucleic có trình tự của nucleotit được biểu hiện tại SEQ ID NO: 19, trong đó AR biến thể được mã hóa không bao gồm phenylalanin ở vị trí tương ứng với vị trí axit amin 876. Theo một số phương án axit nucleic mã hóa polypeptit AR đột biến bao gồm axit nucleic có trình tự axit nucleotit 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% tương đồng với axit nucleic có trình tự của nucleotit được biểu hiện tại SEQ ID NO: 19, trong đó AR biến thể được mã hóa bao gồm leuxin ở vị trí tương ứng với vị trí axit amin 876.

Theo một số phương án, axit nucleic được đề xuất trong bản mô tả này mã hóa polypeptit AR đột biến là axit nucleic được phân lập. Theo một số phương án,

axit nucleic được đề xuất trong bản mô tả này mã hóa polypeptit AR đột biến là phân tử ADN. Theo một số phương án, axit nucleic được đề xuất trong bản mô tả này mã hóa polypeptit AR đột biến là phân tử cADN. Theo một số phương án, axit nucleic được đề xuất trong bản mô tả này mã hóa polypeptit AR đột biến là phân tử ARN. Theo một số phương án, axit nucleic được đề xuất trong bản mô tả này mã hóa polypeptit AR đột biến là ức chế phân tử ARN (nghĩa là, ARNi). Theo một số phương án, axit nucleic được đề xuất trong bản mô tả này là phân tử axit nucleic mà bổ sung, hoặc gắn kết với, axit nucleic mã hóa polypeptit AR đột biến.

Theo một số phương án, axit nucleic được đề xuất trong bản mô tả này mã hóa polypeptit AR đột biến hoặc vị trí của chúng chứa axit nucleic mã hóa axit amin ở vị trí 876 không phải là phenylalanin. Theo một số phương án, axit nucleic được đề xuất trong bản mô tả này mã hóa polypeptit AR đột biến hoặc vị trí của chúng chứa axit nucleic mã hóa leuxin ở vị trí axit amin 876.

Theo một số phương án, axit nucleic được đề cập ở đây là oligonucleotit mã hóa một phần của polypeptit AR đột biến. Theo một số phương án axit nucleic được đề xuất trong bản mô tả này là oligonucleotit mã hóa một phần của polypeptit AR đột biến mà chứa nucleotit bộ ba mã hóa axit amin tương ứng với vị trí axit amin 876. Theo một số phương án, bộ ba mã hóa axit amin không phải là phenylalanin. Theo một số phương án, bộ ba mã hóa axit amin là leuxin.

Theo một số phương án, axit nucleic được đề xuất trong bản mô tả này là vector bao gồm axit nucleic mã hóa bất kỳ của polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, axit nucleic được đề xuất trong bản mô tả này là vector bao gồm axit nucleic mã hóa bất kỳ của polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này là vector biểu hiện. Theo một số phương án, axit nucleic được đề xuất trong bản mô tả này là vector bao gồm axit nucleic mã hóa bất kỳ của polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này có thể thực hiện liên kết với vùng khởi đầu để biểu hiện của polypeptit AR đột biến.

Theo một số phương án, vector là vector plasmit. Theo một số phương án, vector là vector virus. Theo một số phương án, vector virus là vector virus ADN hoặc ARN. Mẫu các vector virus bao gồm, nhưng không giới hạn đến vector vaccinia, adenovirus, virus kèm adeno (AAV), retrovirus, hoặc herpesvirus.

Theo một số phương án, được đề xuất trong bản mô tả này là chuỗi bao gồm axit nucleic mã hóa bất kỳ của polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, axit nucleic AR biến thể liên kết với vi mạch. Theo một số phương án, axit nucleic AR biến thể liên kết trực tiếp với vi mạch. Theo một số phương án, axit nucleic AR biến thể liên kết gián tiếp với vi mạch thông qua bộ liên kết. Theo một số phương án, được đề xuất trong bản mô tả này là vi mạch chuỗi bao gồm axit nucleic mã hóa bất kỳ của polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này.

Sản xuất axit nucleic và polypeptit

Theo một số phương án, phân tử axit nucleic được phân lập mã hóa polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này được tạo ra bằng các phương pháp tái tổ hợp tiêu chuẩn. Theo một số phương án, phân tử axit nucleic được phân lập mã hóa polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này được tạo ra bằng cách khuếch đại trình tự AR biến thể từ ADN genomic. Theo một số phương án, phân tử axit nucleic được phân lập mã hóa polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này được tạo ra bằng phản ứng chuỗi polymeraza sử dụng môi đặc hiệu trình tự AR. Theo một số phương án, phân tử axit nucleic được phân lập mã hóa polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này được tạo ra bằng phiên mã ngược của mARN mã hóa polypeptit AR đột biến.

Theo một số phương án, phân tử axit nucleic được phân lập mã hóa polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này được chèn vào vector biểu hiện và được biểu hiện trong tế bào chủ hoặc tế bào không phải dịch chiết. Theo một số phương án, phân tử axit nucleic được phân lập mã hóa polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này là hoạt động liên kết với

để biểu hiện mã hóa polypeptit trong tế bào hoặc tế bào không phải dịch chiết. Theo một số phương án, vùng khởi đầu chủ yếu vùng khởi đầu. Theo một số phương án, vùng khởi đầu là chất xúc tác có thể cảm ứng.

Theo một số phương án, phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này là "ngoại sinh" với tế bào, nghĩa là bên ngoài để các tế bào vào vector là được đưa vào hoặc trình tự là tương đồng với trình tự trong tế bào nhưng trong vị trí trong đó tế bào axit nucleic bào chủ trong đó, trình tự là thường không được tìm thấy. Các vector bao gồm plasmid, cosmid, virus (vi khuẩn, virus

động vật, và virus thực vật), và nhiễm sắc thể nhân tạo (ví dụ, YACs). Một trong những kỹ năng trong kỹ thuật này sẽ được trang bị tốt để xây dựng vector thông qua các kỹ thuật tái tổ hợp tiêu chuẩn, mà được mô tả trong Sambrook et al., 1989 và Ausubel et al., 1996, cả hai được kết hợp trong bản mô tả này bằng cách tham chiếu.

Các phương pháp để biểu hiện của protein trong tế bào cũng được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, ví dụ, biểu hiện trong tế bào, như tế bào động vật và thực vật. Mẫu tế bào động vật dùng cho biểu hiện của polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này bao gồm nhưng không giới hạn đến vi khuẩn, men, tế bào côn trùng, và tế bào động vật có vú, như ví dụ các tế bào ở người, động vật linh trưởng, loài gặm nhấm, thuộc giống bò, và thuộc giống cừu. Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa AR biến thể được phức hợp thành genome của tế bào chủ.

Theo một số phương án, phương pháp để biểu hiện của polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này bao gồm nuôi cấy tế bào chủ chứa vector biểu hiện mã hóa polypeptit AR đột biến như polypeptit AR đột biến là được tạo ra bằng tế bào. Theo một số các phương pháp, axit nucleic mã hóa polypeptit biến thể được nối với axit nucleic mã hóa trình tự đơn như trình tự đơn được biểu hiện là kết hợp peptit với polypeptit AR đột biến. Theo một số phương án trình tự đơn cho phép để đưa ra polypeptit AR đột biến bằng tế bào chủ.

Theo một số phương án polypeptit AR đột biến được phân lập từ tế bào chủ biểu hiện Polypeptit biến thể. Theo một số phương án dịch chiết được chiết từ tế bào chủ và polypeptit AR đột biến được phân lập bằng các phương pháp lọc như nhưng không giới hạn đến sắc ký hoặc không thay đổi với kháng thể đặc hiệu để các polypeptit AR hoặc đặc hiệu với polypeptit AR đột biến cụ thể.

Kháng thể

Theo một số phương án kháng thể liên kết với polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này, và gắn kết bằng ái lực thấp hoặc không liên kết với polypeptit AR kiểu đại. Theo một số phương án kháng thể liên kết với polypeptit AR đột biến trong sự có mặt của chất ức chế thể hệ thứ hai, như, nhưng không giới hạn đến ARN-509, enzalutamid (MDV3100) hoặc RD162.

Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể mà nhận dạng cụ thể polypeptit AR

đột biến, nhưng không nhận dạng polypeptit AR kiểu đại. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể mà nhận dạng cụ thể polypeptit AR đột biến có leuxin ở vị trí axit amin 876, nhưng không nhận dạng polypeptit AR kiểu đại. Theo một số phương án, kháng thể được đưa ra chống lại một hoặc nhiều dạng alen của polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này. Kỹ thuật dùng cho sử dụng protein đặc hiệu hoặc oligopeptit như kháng thể để gọi ra kháng thể that nhận dạng cụ thể epitopes trên peptit hoặc protein là đã biết. Theo một phương án, trình tự ADN của các dạng alen được mong muốn của gen đích được nhân bản vô tính bằng cách chèn vào vector biểu hiện thích hợp và được dịch chuyển vào protein trong tế bào chủ không nhận hoặc có nhân. Protein có thể được phục hồi và được sử dụng như kháng thể để gọi ra việc sản xuất kháng thể đặc hiệu. Theo các phương án khác, ADN của các dạng alen được mong muốn của gen đích được khuếch đại bằng kỹ thuật PCR và sau đó được di chuyển trong ống nghiệm thành protein được sử dụng như kháng thể để gọi ra việc sản xuất kháng thể đặc hiệu. Theo các phương án khác, trình tự ADN của các alen thay thế là được sử dụng như cơ sở cho thể hệ của peptit tổng hợp đại diện cho trình tự axit amin của alen để sử dụng như kháng thể để gọi ra việc sản xuất kháng thể đặc hiệu.

Theo một số phương án, kháng thể được tạo ra bằng các kỹ thuật kháng thể đơn dòng tiêu chuẩn hoặc được tạo ra thông qua hệ thống biểu hiện dựa trên sự tái tổ hợp. Thông thường xem, Abbas, Lichtman, và Pober, Cellular và Molecular Immunology, W. B. Saunders Co. (1991). Thuật ngữ "kháng thể" nghĩa là bao gồm các phân tử kháng thể nguyên vẹn cũng như các đoạn kháng thể hoặc các dẫn xuất, như Fab và F(ab')₂, mà có khả năng đặc biệt gắn kết với kháng thể. Kháng thể được sản xuất ưu tiên chỉ gắn kết biến thể protein được sản xuất trong dạng alen mà được sử dụng như kháng thể để tạo các kháng thể. Các phương pháp tạo kháng thể alen đặc hiệu cũng được mô tả trong U.S. Pat. No. 6,200,754 và U.S. Pat. No. 6,054,273, toàn bộ nội dung trong đó được kết hợp trong bản mô tả này bằng cách tham chiếu.

Theo một số phương án, kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này là kháng thể nhân bản. "kháng thể nhân bản" đề cập đến loại kháng thể được bố trí có CDR của nó có nguồn gốc từ globulin miễn dịch người cho không phải là con người, các phần có nguồn gốc globulin miễn dịch còn lại của phân tử là có nguồn gốc từ một

hoặc nhiều globulin miễn dịch ở người(s). Theo một số phương án, phần dư hỗ trợ sườn được biến đổi để duy trì gắn kết ái lực (xem, ví dụ, Queen et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson et al. Bio/Technology, 9:421 (1991)). Theo một số phương án, kháng thể chấp nhận ở người thích hợp là một lựa chọn từ cơ sở dữ liệu thông thường, ví dụ, cơ sở dữ liệu KABAT®, cơ sở dữ liệu Los Alamos, và cơ sở dữ liệu Swiss Protein, bằng cách tương đồng với nucleotit và trình tự axit amin của người cho kháng thể. Theo một số phương án, kháng thể ở người được mô tả bằng cách tương đồng với vùng sườn của người cho kháng thể (trên nền axit amin) thích hợp để cung cấp vùng chứa chuỗi nặng và/hoặc vùng sườn thay đổi chuỗi nặng để chèn CDR người cho. Theo một số phương án, kháng thể chấp nhận thích hợp có khả năng chuỗi ánh sáng cho không đổi hoặc vùng sườn biến đổi được chọn theo cách tương tự. Theo một số phương án, các chuỗi nặng và ánh sáng chấp nhận kháng thể có nguồn gốc từ kháng thể chấp nhận tương tự. Theo một số phương án, các chuỗi nặng và ánh sáng chấp nhận kháng thể có nguồn gốc từ kháng thể chấp nhận khác nhau. Các kỹ thuật trước mô tả một số cách sản xuất kháng thể nhân bản này-xem, ví dụ, EP-A-0239400 và EP-A-054951.

Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu dùng cho polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt của polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này trong mẫu, ví dụ, mẫu thử nghiệm, mẫu tế bào, dịch chiết tế bào, mẫu sinh học, hoặc mẫu bệnh nhân, sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các kỹ thuật này bao gồm, ví dụ, Western blot, mô hóa học miễn dịch, miễn dịch huỳnh quang gián tiếp, và chip kháng thể. Theo một số phương án, kháng thể mà nhận dạng cụ thể polypeptit AR đột biến là chất ức chế AR thể hệ thứ ba. Theo một số phương án, khả năng của kháng thể mà nhận dạng cụ thể polypeptit AR đột biến để ức chế hoạt tính sinh học polypeptit AR đột biến có thể được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả ở đây để xác định chất ức chế AR thể hệ thứ ba.

Chuẩn đoán các thử nghiệm để phát hiện polypeptit AR đột biến và axit nucleic mã hóa polypeptit AR đột biến

Được đề xuất trong bản mô tả này là phương pháp chuẩn đoán bao gồm phát hiện của polypeptit AR đột biến trong đối tượng hoặc axit nucleic mã hóa polypeptit AR đột biến trong đối tượng. Theo một số phương án, đối tượng có bệnh hoặc tình

trạng bệnh AR-trung gian. Theo một số phương án, phương pháp chuẩn đoán được sử dụng để sàng lọc đối tượng có bệnh ung thư mà kháng với điều trị bằng kháng androgen, như chất đối kháng AR thế hệ thứ nhất hoặc thứ hai, xác định đối tượng để điều trị bằng kháng androgen, như chất đối kháng AR thế hệ thứ nhất hoặc thứ hai, giám sát điều trị của đối tượng nhận kháng điều trị androgen, như chất đối kháng AR thế hệ thứ nhất hoặc thứ hai, tối ưu hóa điều trị của đối tượng nhận kháng điều trị androgen, như chất đối kháng AR thế hệ thứ nhất hoặc thứ hai, và sự tổ hợp của chúng. Theo một số phương án, các phương pháp bao gồm chọn đối tượng để điều trị bằng chất đối kháng AR thế hệ thứ ba. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm dùng cho đối tượng chất đối kháng AR thế hệ thứ ba như được mô tả ở đây. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến được phát hiện bao gồm sự biến đổi ở vị trí tương ứng với vị trí axit amin 876 của polypeptit AR kiểu đại được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến được phát hiện bao gồm sự thay thế axit amin phenylalanin vào leuxin ở vị trí tương ứng với vị trí axit amin 876 của polypeptit AR kiểu đại được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, đối tượng có polypeptit AR đột biến bao gồm sự biến đổi ở vị trí axit amin 876 kháng lại sự ức chế bằng chất đối kháng thế hệ thứ nhất hoặc thứ hai.

Theo một số phương án, đối tượng có polypeptit AR đột biến bao gồm sự biến đổi ở vị trí axit amin 876 kháng lại sự ức chế bằng chất đối kháng thế hệ thứ nhất hoặc thứ hai. Theo một số phương án, đối tượng có polypeptit AR đột biến bao gồm sự biến đổi ở vị trí axit amin 876 kháng lại sự ức chế bằng chất đối kháng thế hệ thứ nhất và thứ hai. Theo một số phương án, đối tượng có polypeptit AR đột biến bao gồm leuxin ở vị trí axit amin 876 kháng lại sự ức chế bằng chất đối kháng thế hệ thứ nhất hoặc thứ hai. Theo một số phương án, đối tượng có polypeptit AR đột biến bao gồm leuxin ở vị trí axit amin 876 kháng lại sự ức chế bằng chất đối kháng thế hệ thứ nhất và thứ hai. Theo một số phương án, đối tượng có polypeptit AR đột biến bao gồm sự biến đổi ở vị trí axit amin 876 kháng lại sự ức chế bằng chất ức chế CYP17A gắn kết với AR, như ví dụ, galeteron (TOK001), TAK-700 hoặc abirateron axetat. Theo một số phương án, đối tượng có polypeptit AR đột biến bao gồm sự biến đổi ở vị trí axit amin 876 kháng lại sự ức chế bằng chất ức chế CYP17A gắn kết với AR, như ví dụ, galeteron (TOK001), TAK-700 hoặc abirateron axetat.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến các phương pháp dùng cho polypeptit AR kháng lại sự ức chế với chất đối kháng AR thể hệ thứ hai trong đối tượng, bao gồm: (a) thử nghiệm mẫu chứa phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit AR từ đối tượng để xác định liệu polypeptit AR được mã hóa bị biến đổi ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí axit amin 876 của trình tự axit amin được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1; và (b) mô tả AR là kháng với ức chế với chất đối kháng AR thể hệ thứ hai nếu đối tượng có biến đổi. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm dùng chất đối kháng AR thể hệ thứ ba được đề xuất trong bản mô tả này để ức chế của AR biến thể. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm việc không dùng chất đối kháng AR thể hệ thứ hai. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm dùng chất đối kháng AR thể hệ thứ hai nếu đối tượng không có sự biến đổi. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư tiền liệt tuyến. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm bước thu mẫu axit nucleic từ đối tượng.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến các phương pháp dùng cho mô tả AR kháng lại sự ức chế với chất đối kháng AR thể hệ thứ nhất trong đối tượng, bao gồm: (a) thử nghiệm mẫu chứa phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit AR từ đối tượng để xác định liệu polypeptit AR được mã hóa bị biến đổi ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí axit amin 876 của trình tự axit amin được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1; và (b) mô tả AR là kháng với ức chế với chất đối kháng AR thể hệ thứ nhất nếu đối tượng có biến đổi. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm dùng chất đối kháng AR thể hệ thứ ba được đề xuất trong bản mô tả này để ức chế của AR biến thể. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm việc không dùng chất đối kháng AR thể hệ thứ hai. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm dùng chất đối kháng AR thể hệ thứ hai nếu đối tượng không có sự biến đổi. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư tiền liệt tuyến. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm thu mẫu axit nucleic từ đối tượng.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến các phương pháp dùng cho đặc tính AR kháng lại sự ức chế bằng chất đối kháng AR là chất ức chế CYP17A trong

đối tượng, bao gồm: (a) thử nghiệm mẫu chứa phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit AR từ đối tượng để xác định liệu polypeptit AR được mã hóa bị biến đổi ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí axit amin 876 của trình tự axit amin được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1; và (b) mô tả AR là kháng với ức chế bằng chất đối kháng AR là chất ức chế CYP17A nếu đối tượng có biến đổi. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm dùng chất đối kháng AR thế hệ thứ ba được đề xuất trong bản mô tả này để ức chế của AR biến thể. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm việc không dùng chất đối kháng AR thế hệ thứ hai. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm dùng chất đối kháng AR thế hệ thứ hai nếu đối tượng không có sự biến đổi. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư tiền liệt tuyến. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt. Theo một số phương án chất ức chế CYP17A là galeteron (TOK001), TAK-700 hoặc abirateron axetat. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm thu mẫu axit nucleic từ đối tượng.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến các phương pháp chọn đối tượng cho điều trị bằng chất đối kháng AR thế hệ thứ hai, bao gồm (a) thử nghiệm mẫu chứa phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit AR từ đối tượng để xác định liệu polypeptit AR được mã hóa bị biến đổi ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí axit amin 876 của trình tự axit amin được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1; và (b) mô tả đối tượng là ứng viên để điều trị bằng chất đối kháng AR thế hệ thứ hai nếu đối tượng không có sự biến đổi. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm mô tả đối tượng không phải là ứng viên để điều trị bằng chất đối kháng AR thế hệ thứ hai nếu đối tượng có biến đổi. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm dùng chất đối kháng AR thế hệ thứ ba được đề xuất trong bản mô tả này để ức chế của AR biến thể. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư tiền liệt tuyến. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm bước thu mẫu axit nucleic từ đối tượng.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến các phương pháp chọn đối tượng cho điều trị bằng chất đối kháng AR thế hệ thứ nhất, bao gồm (a) thử nghiệm mẫu chứa phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit AR từ đối tượng để xác định liệu polypeptit AR được mã hóa bị biến đổi ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí axit

amin 876 của trình tự axit amin được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1; và (b) mô tả đối tượng là ứng viên để điều trị bằng chất đối kháng AR thế hệ thứ nhất nếu đối tượng không có sự biến đổi. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm mô tả đối tượng không phải là ứng viên để điều trị bằng chất đối kháng AR thế hệ thứ nhất nếu đối tượng có biến đổi. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm dùng chất đối kháng AR thế hệ thứ ba được đề xuất trong bản mô tả này để ức chế của AR biến thể. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư tiền liệt tuyến. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm bước thu mẫu axit nucleic từ đối tượng.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến các phương pháp chọn đối tượng cho điều trị bằng chất đối kháng AR là chất ức chế CYP17A, bao gồm (a) thử nghiệm mẫu chứa phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit AR từ đối tượng để xác định liệu polypeptit AR được mã hóa bị biến đổi ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí axit amin 876 của trình tự axit amin được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1; và (b) mô tả đối tượng là ứng viên để điều trị bằng chất đối kháng AR là chất ức chế CYP17A nếu đối tượng không có sự biến đổi. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm mô tả đối tượng không phải là ứng viên để điều trị bằng chất ức chế CYP17A nếu đối tượng có biến đổi. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm dùng chất đối kháng AR thế hệ thứ ba được đề xuất trong bản mô tả này để ức chế của AR biến thể. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư tiền liệt tuyến. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt. Theo một số phương án chất ức chế CYP17A là galeteron (TOK001), TAK-700 hoặc abirateron axetat. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm bước thu mẫu axit nucleic từ đối tượng.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến các phương pháp chọn đối tượng để điều trị bằng chất đối kháng AR thế hệ thứ ba, bao gồm (a) thử nghiệm mẫu chứa phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit AR từ đối tượng để xác định liệu polypeptit AR được mã hóa bị biến đổi ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí axit amin 876 của trình tự axit amin được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1; và (b) mô tả đối tượng là ứng viên cho điều trị bằng chất đối kháng AR thế hệ thứ ba nếu đối tượng có biến đổi. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm dùng chất đối kháng

AR thể hệ thứ ba được đề xuất trong bản mô tả này để ức chế của AR biến thể. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư tiền liệt tuyến. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm bước thu mẫu axit nucleic từ đối tượng.

Theo một số phương án, đề cập đến phương pháp xác định liệu đối tượng hoặc có thể trở nên kháng với điều trị bằng chất đối kháng AR thể hệ thứ hai, bao gồm: (a) thử nghiệm mẫu chứa phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit AR từ đối tượng để xác định liệu polypeptit AR được mã hóa bị biến đổi ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí axit amin 876 của trình tự axit amin được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1; và (b) mô tả đối tượng kháng hoặc có thể trở nên kháng với điều trị bằng chất đối kháng AR thể hệ thứ hai nếu đối tượng có biến đổi. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm dùng của chất ức chế AR thể hệ thứ ba được đề xuất trong bản mô tả này để ức chế của AR biến thể. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư tiền liệt tuyến. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm bước thu mẫu axit nucleic từ đối tượng.

Theo một số phương án, đề cập đến phương pháp xác định liệu đối tượng hoặc có thể trở nên kháng với điều trị bằng chất đối kháng AR thể hệ thứ nhất, bao gồm: (a) thử nghiệm mẫu chứa phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit AR từ đối tượng để xác định liệu polypeptit AR được mã hóa bị biến đổi ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí axit amin 876 của trình tự axit amin được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1; và (b) mô tả đối tượng kháng hoặc có thể trở nên kháng với điều trị bằng chất đối kháng AR thể hệ thứ nhất nếu đối tượng có biến đổi. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm dùng của chất ức chế AR thể hệ thứ ba được đề xuất trong bản mô tả này để ức chế của AR biến thể. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư tiền liệt tuyến. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm bước thu mẫu axit nucleic từ đối tượng.

Theo một số phương án, đề cập đến phương pháp xác định liệu đối tượng hoặc có thể trở nên kháng với điều trị bằng chất đối kháng AR là chất ức chế CYP17A, bao gồm: (a) thử nghiệm mẫu chứa phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit AR từ đối tượng để xác định liệu polypeptit AR được mã hóa bị biến đổi ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí axit amin 876 của trình tự axit amin được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1; và (b) mô tả đối tượng kháng hoặc có thể trở nên kháng với điều trị bằng chất đối kháng AR là chất ức chế CYP17A nếu đối tượng có biến đổi. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm dùng của chất ức chế AR thế hệ thứ ba được đề xuất trong bản mô tả này để ức chế của AR biến thể. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư tiền liệt tuyến. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt. Theo một số phương án chất ức chế CYP17A là galeteron (TOK001), TAK-700 hoặc abirateron axetat. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm bước thu mẫu axit nucleic từ đối tượng.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến các phương pháp để giám sát liệu đối tượng nhận chất đối kháng AR thế hệ thứ hai dùng cho điều trị bệnh ung thư bị phát triển hoặc sẽ phát triển kháng lại điều trị, bao gồm (a) thử nghiệm mẫu chứa phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit AR từ đối tượng để xác định liệu polypeptit AR được mã hóa bị biến đổi ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí axit amin 876 của trình tự axit amin được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1; và (b) mô tả đối tượng kháng hoặc sẽ trở nên kháng với việc điều trị bằng chất đối kháng AR thế hệ thứ hai nếu đối tượng có biến đổi. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm dùng chất đối kháng AR thế hệ thứ ba được đề xuất trong bản mô tả này để ức chế của AR biến thể. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư tiền liệt tuyến. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm bước thu mẫu axit nucleic từ đối tượng.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến các phương pháp để giám sát liệu đối tượng nhận chất đối kháng AR thế hệ thứ nhất dùng cho điều trị bệnh ung thư bị phát triển hoặc sẽ phát triển kháng lại điều trị, bao gồm (a) thử nghiệm mẫu chứa phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit AR từ đối tượng để xác định liệu polypeptit AR được mã hóa bị biến đổi ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí axit

amin 876 của trình tự axit amin được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1; và (b) mô tả đối tượng kháng hoặc sẽ trở nên kháng với việc điều trị bằng chất đối kháng AR thể hệ thứ nhất nếu đối tượng có biến đổi. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm dùng chất đối kháng AR thể hệ thứ ba được đề xuất trong bản mô tả này để ức chế của AR biến thể. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư tiền liệt tuyến. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm bước thu mẫu axit nucleic từ đối tượng.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến các phương pháp để giám sát liệu đối tượng nhận chất đối kháng AR là chất ức chế CYP17A dùng cho điều trị bệnh ung thư bị phát triển hoặc sẽ phát triển kháng lại điều trị, bao gồm (a) thử nghiệm mẫu chứa phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit AR từ đối tượng để xác định liệu polypeptit AR được mã hóa bị biến đổi ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí axit amin 876 của trình tự axit amin được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1; và (b) mô tả đối tượng kháng hoặc sẽ trở nên kháng với việc điều trị bằng chất đối kháng AR là chất ức chế CYP17A nếu đối tượng có biến đổi. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm dùng chất đối kháng AR thể hệ thứ ba được đề xuất trong bản mô tả này để ức chế của AR biến thể. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư tiền liệt tuyến. Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt. Theo một số phương án, chất ức chế CYP17A là galeteron (TOK001), TAK-700 hoặc abirateron axetat. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm bước thu mẫu axit nucleic từ đối tượng.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến các phương pháp để tối ưu hóa điều trị của đối tượng nhận chất đối kháng AR thể hệ thứ hai dùng cho điều trị bệnh ung thư, bao gồm: (a) thử nghiệm mẫu chứa phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit AR từ đối tượng để xác định liệu polypeptit AR được mã hóa bị biến đổi ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí axit amin 876 của trình tự axit amin được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1; và (b) đình chỉ điều trị bằng chất đối kháng AR thể hệ thứ hai nếu đối tượng có biến đổi hoặc tiếp tục điều trị bằng chất đối kháng AR thể hệ thứ hai nếu đối tượng không có sự biến đổi. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm bước thu mẫu axit nucleic từ đối tượng.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến các phương pháp để tối ưu hóa điều trị của đối tượng nhận chất đối kháng AR thể hệ thứ nhất dùng cho điều trị bệnh ung thư, bao gồm: (a) thử nghiệm mẫu chứa phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit AR từ đối tượng để xác định liệu polypeptit AR được mã hóa bị biến đổi ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí axit amin 876 của trình tự axit amin được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1; và (b) đình chỉ điều trị bằng chất đối kháng AR thể hệ thứ nhất nếu đối tượng có biến đổi hoặc tiếp tục điều trị bằng chất đối kháng AR thể hệ thứ nhất nếu đối tượng không có sự biến đổi. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm bước thu mẫu axit nucleic từ đối tượng.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến các phương pháp để tối ưu hóa điều trị của đối tượng nhận chất đối kháng AR là chất ức chế CYP17A dùng cho điều trị bệnh ung thư, bao gồm: (a) thử nghiệm mẫu chứa phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit AR từ đối tượng để xác định liệu polypeptit AR được mã hóa bị biến đổi ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí axit amin 876 của trình tự axit amin được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1; và (b) đình chỉ điều trị bằng chất đối kháng AR là chất ức chế CYP17A nếu đối tượng có biến đổi hoặc tiếp tục điều trị bằng chất đối kháng AR là chất ức chế CYP17A nếu đối tượng không có sự biến đổi. Theo một số phương án chất ức chế CYP17A là galeteron (TOK001), TAK-700 hoặc abirateron axetat. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm bước thu mẫu axit nucleic từ đối tượng.

Theo một số phương án, AR bị biến đổi là kháng để đối kháng toàn bộ bằng chất đối kháng AR thể hệ thứ hai, như, ví dụ, ARN-509, enzalutamit (MDV3100) hoặc RD162. Theo một số phương án, chất đối kháng AR thể hệ thứ hai, như, ví dụ, ARN-509, enzalutamit (MDV3100) hoặc hoạt tính chất chủ vận biểu hiện RD162 theo hướng AR bị biến đổi. Theo một số phương án, AR bị biến đổi là kháng để đối kháng toàn bộ bằng chất đối kháng AR thể hệ thứ nhất. Theo một số phương án, AR bị biến đổi là kháng để đối kháng toàn bộ bằng chất đối kháng AR là CYP17A.

Theo một số phương án, đối tượng có bệnh phụ thuộc AR hoặc trung gian AR hoặc tình trạng bệnh. Theo một số phương án, bệnh hoặc tình trạng bệnh phụ thuộc AR hoặc AR trung gian là tăng sản tiền liệt tuyến lành tính, chứng mọc lông nhiều, mụn trứng cá, u tuyến và khối u của tiền liệt tuyến, tế bào u bướu lành tính hoặc ác tính chứa AR, hyperpilosity, tăng tiết bã nhờn, bệnh lạc nội mạc tử cung, bệnh buồng

trứng đa nang, bệnh rụng tóc, chứng giảm năng tuyến sinh dục, chứng loãng xương, ức chế sự tạo tinh trùng, sinh lực, chứng suy mòn, chứng chán ăn, bổ sung androgen dùng cho tuổi liên quan đến việc làm giảm mức testosterone, ung thư tiền liệt tuyến, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư bàng quang, gan bệnh ung thư, bệnh ung thư nội mạc tử cung, bệnh ung thư dạ con, bốc hỏa, bệnh của Kennedy, bệnh teo cơ và nhược cơ, teo da, loãng xương, thiếu máu, chứng xơ cứng động mạch, bệnh tim mạch, bệnh mất năng lượng, bệnh suy nhược, bệnh đái tháo đường loại 2 hoặc tích tụ mỡ ở bụng.

Theo một số phương án, đối tượng mắc bệnh ung thư. Theo một số phương án, đối tượng có khối u dạng rắn. Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh ung thư tiền liệt tuyến, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư gan, hoặc bệnh ung thư bàng quang. Theo một số phương án, bệnh ung thư là bệnh ung thư tiền liệt tuyến.

Theo một số phương án, mẫu là từ mô bất kỳ hoặc dịch lỏng từ sinh vật. Mẫu bao gồm, nhưng không giới hạn, đến toàn bộ máu, được tách ra từ xương, hút từ xương, dịch màng phổi, dịch màng bụng, dịch tủy trung tâm, dịch ổ bụng, dịch tụy, dịch não tủy, dịch não, cổ trướng, dịch màng ngoài tim, nước tiểu, nước bọt, rửa phế quản, mồ hôi, nước mắt, chảy tai, đờm, dịch tràn, tinh dịch, chảy dịch âm đạo, sữa, nước ối, và dịch tiết của đường hô hấp, đường ruột hoặc đường sinh dục. Theo các phương án cụ thể, mẫu là mẫu sinh thiết u bướu. Theo các phương án cụ thể, mẫu từ dịch lỏng hoặc mô là một phần của, hoặc kết hợp với, hệ thống bạch huyết hoặc hệ tuần hoàn. Theo một số phương án, mẫu là mẫu máu đó là tĩnh mạch, động mạch, ngoại vi, mô, mẫu máu dây. Theo các phương án cụ thể, mẫu là mẫu huyết thanh. Theo một số phương án, mẫu chứa một hoặc nhiều tế bào u bướu tuần hoàn (CTCs). Theo một số phương án, mẫu chứa một hoặc nhiều tế bào u bướu bị khuếch tán (DTC, ví dụ trong mẫu hút tủy xương).

Các phương pháp để cách ly axit nucleic và các protein từ các tế bào được chứa trong mô và mẫu dịch lỏng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo các phương án cụ thể, mẫu axit nucleic thu được từ đối tượng được phân lập từ các tế bào được chứa trong sinh thiết u bướu từ đối tượng. Theo các phương án cụ thể, mẫu axit nucleic thu được từ đối tượng được phân lập từ các tế bào trong hút tủy xương. Theo các phương án cụ thể, mẫu axit nucleic thu được từ đối tượng được phân lập từ các tế bào được chứa mẫu huyết thanh. Theo các phương án cụ thể, mẫu axit nucleic thu được từ đối tượng được phân lập từ các tế bào được chứa mẫu bạch huyết.

Theo một số phương án, mẫu thu được từ đối tượng bằng thiết bị thích hợp bất kỳ của việc thu mẫu bằng cách sử dụng các phương pháp lâm sàng thông thường và đã biết. Các thủ thuật để thu được mẫu dịch lỏng từ đối tượng đã biết. Ví dụ, các thủ thuật để vẽ và xử lý toàn bộ máu và bạch huyết đã biết và có thể được sử dụng để thu được mẫu dùng cho sử dụng trong phương pháp được đề cập. Thông thường, để chọn mẫu máu, chất chống đông (ví dụ, EDTA, hoặc citrat và heparin hoặc CPD (citrat, photphat, dextroza) hoặc các chất tương tự) được bổ sung vào mẫu để ngăn ngừa sự đông tụ của máu. Theo một số ví dụ, mẫu máu được thu gom trong ống thu gom chứa lượng EDTA để ngăn ngừa sự đông tụ của mẫu máu.

Theo một số phương án, mẫu là sinh thiết mô và thu được, ví dụ, bằng sinh thiết kim, Sinh thiết kim được dẫn CT, sinh thiết hút, sinh thiết nội soi, sinh thiết soi phế quản, rửa phế quản, sinh thiết đường rạch, sinh thiết cắt, sinh thiết bấm, sinh thiết cạo, sinh thiết da, sinh thiết tủy xương, và thủ thuật cắt vòng bằng điện (LEEP). Thông thường, không phải là hoại tử, sinh thiết vô khuẩn hoặc mẫu thu được lớn hơn 100 mg, nhưng có thể nhỏ hơn, như ít hơn 100 mg, 50 mg hoặc ít hơn, 10 mg hoặc ít hơn hoặc 5 mg hoặc ít hơn; hoặc lớn hơn, như nhiều hơn 100 mg, 200 mg hoặc nhiều hơn, hoặc 500 mg hoặc nhiều hơn, 1 gm hoặc nhiều hơn, 2 gm hoặc nhiều hơn, 3 gm hoặc nhiều hơn, 4 gm hoặc nhiều hơn hoặc 5 gm hoặc nhiều hơn. Kích cỡ mẫu được chiết cho thử nghiệm phụ thuộc vào số các yếu tố bao gồm, nhưng không giới hạn đến, số các thử nghiệm được thực hiện, sự khỏe mạnh của mẫu mô, kiểu bệnh ung thư, và tình trạng bệnh của bệnh nhân. Theo một số phương án, mô được đặt trong bình vô khuẩn, như ống vô khuẩn hoặc đĩa cấy, và bị ngập tùy ý trong thiết bị thích hợp. Thông thường, tế bào được tách ra thành huyền phù tế bào bằng thiết bị cơ học và/hoặc điều trị enzym cũng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Thông thường, tế bào được thu gom và sau đó được làm các thủ thuật tiêu chuẩn để cách ly axit nucleic dùng cho thử nghiệm.

Theo một số phương án, mẫu thu được từ đối tượng ở khoảng thời gian ổn định, như, ví dụ, một ngày, hai ngày, ba ngày, bốn ngày, năm ngày, sáu ngày, một tuần, hai tuần, tuần, bốn tuần, một tháng, hai tháng, ba tháng, bốn tháng, năm tháng, sáu tháng, một năm, hằng ngày, hằng tuần, hai tháng một lần, hằng quý, hai lần một năm hoặc hằng năm. Theo một số phương án, việc chọn mẫu được thực hiện ở thời gian được xác định trước hoặc ở khoảng thời gian ổn định so với điều trị bằng một

hoặc nhiều thuốc chống bệnh ung thư. Theo một số phương án, việc chọn mẫu được thực hiện ở thời gian được xác định trước hoặc ở khoảng thời gian ổn định so với điều trị bằng chất đối kháng AR, như chất đối kháng AR thế hệ thứ nhất hoặc thứ hai. Ví dụ, mẫu được thu gom ở thời gian được xác định trước hoặc ở khoảng thời gian ổn định trước khi, trong thời gian, hoặc điều trị sau đây hoặc giữa các điều trị liên tiếp. Theo các ví dụ cụ thể, mẫu thu được từ đối tượng trước khi dùng điều trị chống bệnh ung thư và sau đó lặp lại ở khoảng thời gian ổn định sau khi điều trị đã được thực hiện. Theo các ví dụ cụ thể, mẫu thu được từ đối tượng trước khi dùng chất đối kháng AR, như chất đối kháng AR thế hệ thứ nhất hoặc thứ hai, điều trị và sau đó lặp lại ở khoảng thời gian ổn định sau khi điều trị đã được thực hiện. Theo một số phương án, chất đối kháng AR được chọn trong số các bicalutamit, flutamit, hydroxyflutamit, nilutamit, ARN-509, enzalutamit (MDV3100), và RD162. Theo một số phương án, chất đối kháng AR là chất ức chế CYP17A. Theo một số phương án, chất ức chế CYP17A được chọn trong số các galeteron (TOK001), TAK-700 hoặc abirateron axetat.

Thể tích của mẫu dịch lỏng có thể là thể tích bất kỳ thích hợp để phát hiện AR biến thể theo các phương pháp được đề xuất. Theo một số ví dụ, thể tích dùng cho mẫu dịch lỏng là phụ thuộc vào phương pháp thử nghiệm cụ thể được sử dụng. Ví dụ, các phương pháp thử nghiệm cụ thể có thể đòi hỏi thể tích mẫu dịch lỏng lớn hơn hoặc nhỏ hơn phụ thuộc vào các yếu tố như, nhưng không giới hạn đến, công suất của thiết bị hoặc phương pháp được sử dụng và mức công suất của phương pháp thử nghiệm. Theo một số ví dụ về mẫu dịch lỏng được pha loãng trong môi trường thích hợp trước khi áp dụng phương pháp thử nghiệm. Theo một số ví dụ, mẫu dịch lỏng thu được từ đối tượng và a một phần hoặc phân ước của mẫu được sử dụng trong phương pháp thử nghiệm. Một phần hoặc phân ước có thể được pha loãng trong môi trường thích hợp trước khi áp dụng phương pháp thử nghiệm.

Theo một số phương án, mẫu thu được từ đối tượng là động vật có vú. Mẫu động vật có vú là đối tượng bao gồm, nhưng không giới hạn đến bộ động vật linh trưởng, như con người, khỉ không đuôi và các loại khỉ; các loài gặm nhấm, như chuột, các loại chuột, thỏ, và các loại thỏ; các loài động vật nhai lại, như dê, bò, hươu nai, và cừu; ngựa, lợn, chó, mèo, và hoặc các loài động vật khác. Theo một số

phương án, mẫu thu được từ bệnh nhân. Theo một số ví dụ, bệnh nhân là người bệnh.

Theo một số phương án, mẫu axit nucleic thu được từ đối tượng là mẫu axit nucleic genomic. Theo một số phương án, mẫu axit nucleic thu được từ đối tượng là mẫu ARN. Theo một số phương án, mARN được phân lập từ ARN tổng trong mẫu ARN. Theo một số phương án, mẫu ARN được phiên mã ngược lại thành cADN. Theo một số phương án, mẫu axit nucleic genomic được khuếch đại bằng phương pháp khuếch đại axit nucleic. Theo một số phương án, phương pháp khuếch đại axit nucleic là chuỗi phản ứng polymeraza (PCR). Theo một số phương án, mẫu axit nucleic genomic được khuếch đại sử dụng bộ mỗi nucleotit đặc hiệu dùng cho gen AR. Theo một số phương án, bộ sườn mỗi nucleotit trình tự axit nucleic mã hóa axit amin ở vị trí 876 của polypeptit AR. Theo một số phương án, sản phẩm khuếch đại là axit nucleic mã hóa axit amin ở vị trí 876 của polypeptit AR. Theo một số phương án, mỗi đặc hiệu trình tự được kết hợp để có thể tìm ra phân tử, như đánh dấu huỳnh quang, đánh dấu phát quang sinh học, đánh dấu sự phát quang bằng phản ứng hóa học, đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ, đánh dấu enzym, có thể tìm ra cơ chất, hoặc peptit hoặc phân tử gắn kết với phân tử có thể tìm ra thứ hai.

Theo một số phương án, thử nghiệm bao gồm trình tự mẫu axit nucleic. Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa AR trong mẫu axit nucleic được khuếch đại thứ nhất bằng phương pháp như chuỗi phản ứng polymeraza (PCR) sử dụng mỗi đặc hiệu trình tự, và sau đó đoạn PCR được khuếch đại được sắp xếp theo trình tự. Các phương pháp sắp xếp theo trình tự mẫu dùng cho sử dụng trong phương pháp được đề cập ở đây cũng được biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, nhưng không giới hạn đến, các phương pháp dideoxy hoặc các phương pháp kết thúc chuỗi, trình tự Maxam-Gilbert, trình tự ký hiệu song song liên tục (hoặc MPSS), trình tự polony, trình tự pyro, trình tự nhuộm Illumina, trình tự SOLiD (hoặc trình tự bằng cách thắt), trình tự bán dẫn ion, trình tự ADN nanoball, trình tự heliscope, và trình tự thời gian thực phân tử đơn (SMRT).

Theo một số phương án, mẫu huyết tương hoặc mẫu huyết thanh chứa khối u tuần hoàn ADN (ctADN), ARN (ctARN) hoặc microARN (xem ví dụ Chan et al. (2007) *Br J Cancer*. 96(5):681-5). Theo một số phương án, ADN mã hóa AR biến thể được đánh giá bằng phương pháp trình tự PCR BEAMing (các hạt, khuếch đại,

nhũ tương, chất từ tính) (xem, ví dụ Li *et al.* (2006) *Nat Methods*. 3(2):95-7; Li *et al.* (2006) *Nat Methods*. 3(7):551-9; và Diehl *et al.* (2008) *Nat Med*. 14(9): 985–990). BEAMing là kỹ thuật trong đó, các phân tử ADN riêng biệt kẹp chặt với các hạt chất từ tính trong nhũ tương dầu trong nước và sau đó được chia thành ngăn khuếch đại PCR. Tình trạng biến thể của ADN liên kết với các hạt sau đó được xác định bằng cách lai hóa to đoạn dò đặc hiệu alen huỳnh quang dùng cho biến thể hoặc AR kiểu đại. Đếm tế bào dòng sau đó được sử dụng để định lượng mức độ của biến thể ADN có mặt trong huyết tương hoặc huyết thanh (xem ví dụ Higgins *et al.* (2012) *Clin Cancer Res* 18: 3462-3469).

Theo một số phương án, mẫu thử nghiệm để phát hiện sự có mặt của ADN mã hóa AR biến thể bao gồm phát hiện biến thể với đoạn dò oligonucleotit đặc hiệu trình tự là đặc hiệu dùng cho axit nucleic mã hóa AR biến thể nhưng không phải AR kiểu đại. Theo một số phương án, thử nghiệm bao gồm (a) tiếp xúc mẫu với đoạn dò oligonucleotit đặc hiệu trình tự Axit nucleic AR biến thể, theo đó nếu trình tự axit nucleic biến thể có mặt trong mẫu, phức ADN đoạn dò được tạo ra, và (b) phát hiện phức ADN đoạn dò. Theo một số phương án, đoạn dò oligonucleotit là đặc hiệu dùng cho axit nucleic mã hóa leuxin ở vị trí tương ứng với axit amin 876 của polypeptit AR. Theo một số phương án, đoạn dò đặc hiệu trình tự được kết hợp để có thể tìm ra phân tử, như đánh dấu huỳnh quang, đánh dấu phát quang sinh học, đánh dấu sự phát quang bằng phản ứng hóa học, đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ, đánh dấu enzym, có thể tìm ra cơ chất, hoặc peptit hoặc phân tử gắn kết với phân tử có thể tìm ra thứ hai.

Theo một số phương án, thay đổi nucleotit đơn có thể tìm ra bằng PCR bằng cách dựa trên PCR phân cắt các dấu hiệu trình tự polymorphic được khuếch đại (CAPS) tạo nên giới hạn vị trí trong trình tự biến thể (Michaels *et al.* (1998) *Plant J*. 14(3):381-5) hoặc các đoạn dò kẹp trình tự đặc hiệu kẹp chặt với một nửa tìm ra, như, nhưng không giới hạn đến, chất huỳnh quang (Mhlanga và Malmberg (2001) *Method* 25:463-471). Theo một số phương án, đoạn dò đặc hiệu trình tự được kết hợp để có thể tìm ra phân tử, như đánh dấu huỳnh quang, đánh dấu phát quang sinh học, đánh dấu sự phát quang bằng phản ứng hóa học, đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ, đánh dấu enzym, có thể tìm ra cơ chất, hoặc peptit hoặc phân tử gắn kết với phân tử có thể tìm ra thứ hai. Theo một số phương án, đoạn dò oligonucleotit là đặc hiệu

dùng cho axit nucleic mã hóa leuxin ở vị trí tương ứng với axit amin 876 của polypeptit AR.

Theo một số phương án, mẫu thử nghiệm để phát hiện sự có mặt của ADN mã hóa AR biến thể được thực hiện bằng cách sử dụng chuỗi oligonucleotit (xem ví dụ Hastia et al. (1999) *J Med Gent.* 36(10):730-6). Theo một số phương án, mẫu chứa axit nucleic từ đối tượng được lai giống trực tiếp vào chip. Theo một số phương án, mẫu chứa axit nucleic từ đối tượng được khuếch đại bằng cách sử dụng phương pháp khuếch đại, như, nhưng không giới hạn đến chuỗi phản ứng polymeraza (PCR), và axit nucleic được khuếch đại là được lai giống vào chip. Theo một số phương án, chuỗi oligonucleotit được chứa trên vi mạch. Theo một số phương án, thay đổi nucleotit đơn có thể tìm ra bằng cách sử dụng các vi mạch.

Theo một số phương án, mẫu thử nghiệm bao gồm phát hiện biến thể với kháng thể đặc hiệu dùng cho polypeptit AR đột biến. Theo một số phương án, phương pháp phát hiện polypeptit AR đột biến bao gồm việc thu được mẫu từ đối tượng, trong đó mẫu bao gồm polypeptit AR và mẫu thử nghiệm cho sự có mặt của polypeptit AR đột biến bằng cách tiếp xúc mẫu với kháng thể đặc hiệu để gắn kết với polypeptit AR đột biến, và không gắn kết hoặc gắn kết với ái lực được giảm cho polypeptit AR kiểu dại, trong đó sự có mặt của polypeptit AR đột biến gây ra phức polypeptit AR đột biến-kháng thể. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm phát hiện phức polypeptit AR đột biến-kháng thể. Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm phát hiện phức polypeptit AR đột biến-kháng thể với thuốc thử phát hiện. Theo một số phương án, AR biến thể kháng thể đặc hiệu được kết hợp để có thể tìm ra phân tử, như đánh dấu huỳnh quang, đánh dấu phát quang sinh học, đánh dấu sự phát quang bằng phản ứng hóa học, đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ, đánh dấu enzym, có thể tìm ra cơ chất, hoặc peptit hoặc phân tử gắn kết với protein có thể tìm ra thứ hai (ví dụ, kháng thể thứ hai). Theo một số phương án, gắn kết của AR biến thể kháng thể đặc hiệu được phát hiện bằng thử nghiệm dùng cho phân tử có thể tìm ra. Theo một số phương án, gắn kết của AR biến thể kháng thể đặc hiệu được phát hiện bằng cách sử dụng kháng thể thứ hai (ví dụ, kháng thể-IgG). Theo một số phương án, mẫu là mẫu sinh thiết u bướu, hút tủy xương, mẫu máu, mẫu huyết thanh, hoặc mẫu bạch huyết.

Tương đồng hóa các phân tử tương tác với biến thể thụ thể androgen

Được đề xuất trong bản mô tả này phương pháp sử dụng polypeptit AR đột biến để sàng lọc các hợp chất ức chế biến thể thụ thể (nghĩa là, Các hợp chất ức chế AR thể hệ thứ ba). Theo một số phương án, các phương pháp được sử dụng để tương đồng hóa Các hợp chất ức chế AR thể hệ thứ ba dùng cho điều trị bệnh ung thư. Theo một số phương án, các phương pháp được sử dụng để tương đồng hóa Các hợp chất ức chế AR thể hệ thứ ba dùng cho điều trị chống bệnh ung thư, như ung thư tiền liệt tuyến kháng với việc điều trị bằng chất đối kháng AR thể hệ thứ hai, như ARN-509, enzalutamid (MDV3100) hoặc RD162.

Theo một số phương án, phương pháp để xác định Các hợp chất ức chế AR thể hệ thứ ba bao gồm (a) biểu hiện polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này trong tế bào, (b) cho tế bào tiếp xúc với hợp chất thử nghiệm, và (c) phát hiện mức độ của hoạt tính AR trong tế bào. Theo một số phương án, tế bào được tiếp xúc với chất chủ vận AR trước khi hoặc cùng lúc như cho tế bào tiếp xúc với hợp chất thử nghiệm. Theo một số phương án tế bào được tiếp xúc với chất chủ vận AR khoảng 1 giờ, 2, giờ, 3 giờ, 4 giờ, 5 giờ, 6 giờ, 8 giờ, 10 giờ, 12 giờ, 14 giờ, 16 giờ, 18 giờ, 20 giờ, 22 giờ, 24 giờ hoặc lâu hơn trước khi cho tế bào tiếp xúc với hợp chất thử nghiệm. Theo một số phương án tế bào được tiếp xúc với chất chủ vận AR ở cùng thời gian như tế bào được tiếp xúc với hợp chất thử nghiệm. Theo một số phương án, chất chủ vận AR được chọn trong số các methyltrienolon (R1881), DHT, miboleron (Mb) và testosterone. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm sự thay thế axit amin ở vị trí tương ứng với vị trí axit amin 876 của polypeptit AR kiểu đại được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến không chứa phenylalanin ở vị trí axit amin 876 trong polypeptit. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến chứa leuxin ở vị trí axit amin 876 trong polypeptit.

Theo một số phương án, dòng tế bào có thể được chuyển nhiễm với axit nucleic mã hóa polypeptit AR đột biến và trong đó, hoạt tính AR có thể được theo dõi là được sử dụng. Theo một số phương án, tế bào không biểu hiện AR kiểu đại. Theo một số phương án, tế bào biểu hiện mức độ thấp của AR kiểu đại. Theo một số phương án, tế bào biểu hiện polypeptit AR đột biến nội sinh. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến nội sinh bao gồm sự biến đổi ở axit amin tương ứng với

axit amin 877 của polypeptit AR kiểu dại. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến nội sinh bao gồm sự biến đổi thay thế Threonin vào Alanin ở vị trí axit amin 877 (T877A). Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm sự biến đổi ở axit amin tương ứng với axit amin 874 của polypeptit AR kiểu dại. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm sự biến đổi thay thế Histidin vào Tiroxin ở vị trí axit amin 874 (H874Y). Theo một số phương án, tế bào được chọn trong số các HeLa, CV1, COS7, HepG2, HEK-293, DU145, PC3, và TSY-PR1. Theo một số phương án, dòng tế bào là bệnh dòng tế bào ung thư tiền liệt tuyến. Theo một số phương án, dòng tế bào được chọn trong số các CWR, LNCaP, VCaP và LAPC4.

Theo một số phương án, ổn định tế bào biểu hiện polypeptit AR đột biến. Theo một số phương án, axit nucleic mã hóa AR biến thể được phức hợp thành genome của tế bào.

Theo một số phương án, mức độ của hoạt tính AR được phát hiện bằng cách sử dụng gen chỉ thị có thể thực hiện liên kết với vùng khởi đầu đáp ứng AR. Theo một số phương án, vùng khởi đầu đáp ứng AR bao gồm một hoặc nhiều yếu tố đáp ứng androgen (ARE) để liên kết polypeptit AR đột biến. Theo một số phương án, vùng khởi đầu được chọn trong số các probasin (Pb), kháng thể đặc hiệu tiền liệt tuyến (PSA), hai đoạn lặp đảo chiều virus khối u vú ở chuột (MMTV LTR), tổng hợp axit béo (FASN), sáu kháng thể biểu mô màng dịch của tiền liệt tuyến 4 (STEAP4), proteaza màng dịch, serin 2 (TMPRSS2), alpha-1-axit glycoprotein 1 (ORM1), hoặc vùng khởi đầu gen homeobox ở người NKX3,1. Theo một số phương án, vùng khởi đầu là vùng khởi đầu tổng hợp chứa một hoặc nhiều ARE.

Theo một số phương án, vùng khởi đầu đáp ứng AR có thể thực hiện liên kết với gen chỉ thị thích hợp mã hóa protein có thể tìm ra. Protein có thể tìm ra mẫu bao gồm, nhưng không giới hạn đến, luxiferaza, protein huỳnh quang, protein phát quang sinh học, β -galactosidaza, kiềm photphataza, và cloramphenicol axetylchuyển dịchaza. Theo một số phương án, giảm biểu hiện của gen chỉ thị sau khi tiếp xúc với hợp chất thử nghiệm so với việc điều chỉnh thích hợp cho thấy hợp chất thử nghiệm hiệu quả dùng cho ức chế của polypeptit AR đột biến. Theo một số phương án, điều chỉnh là biểu hiện cơ bản của gen chỉ thị trước khi cho tế bào tiếp xúc với hợp chất

thử nghiệm. Theo một số phương án biểu hiện của gen chỉ thị được thử nghiệm bằng cách sử dụng dịch chiết tế bào được xử lý sơ bộ từ các tế bào thử nghiệm.

Theo một số phương án, mức độ của hoạt tính AR được phát hiện bằng cách đo biểu hiện của một hoặc nhiều gen đáp ứng androgen nội sinh trong tế bào. Theo một số phương án, gen đáp ứng androgen tăng cường điều chỉnh (nghĩa là, gây ra) theo đáp ứng với điều trị androgen. Theo một số phương án, gen đáp ứng androgen được điều chỉnh xuống (nghĩa là, được chặn) theo đáp ứng với điều trị androgen. Gen đáp ứng androgen mẫu bao gồm, nhưng không giới hạn đến, kháng thể đặc hiệu tiền liệt tuyến (PSA), kháng thể màng đặc hiệu tiền liệt tuyến (PSMA), prostasin, snail homolog 2 (SLUG), proteaza màng dịch, serin 2 (TMPRSS2), sáu kháng thể biểu mô màng dịch của phân tử họ tiền liệt tuyến 4 (STEAP4), FK506 gắn kết protein 5 (FKBP5), orosomucoid 1/alpha-1-acid glycoprotein 1 (hoặcM1), họ mang chất tan 35 (SLC35F2/NOV), yếu tố phát triển giống insulin I (IGF-1) IGF gắn kết protein-3 và -5, chất tăng cường CCAAT gắn kết protein-δ, photphataza và tensin homolog được loại bỏ trên nhiễm sắc thể 10 (PTEN), FASN, NKX3,1, AMIGO2, BDNF, CAMK2N1, HPGD, NCAPD3, PLD1, IL-15, IL-18, và ERBB2/HER2.

Theo một số phương án, mức độ của hoạt tính AR được phát hiện bằng cách đo biểu hiện của một hoặc nhiều các gen nội sinh gây ra bằng cách tiếp xúc với androgen hoặc chất chủ vận AR. Theo một số phương án, việc giảm biểu hiện của một hoặc nhiều gen có thể cảm ứng androgen sau khi tiếp xúc với hợp chất thử nghiệm so với việc điều chỉnh thích hợp cho thấy hợp chất thử nghiệm hiệu quả dùng cho ức chế của polypeptit AR đột biến. Gen có thể cảm ứng androgen mẫu bao gồm nhưng không giới hạn đến, kháng thể đặc hiệu tiền liệt tuyến (PSA), prostasin, snail homolog 2 (SLUG), proteaza màng dịch, serin 2 (TMPRSS2), sáu kháng thể biểu mô màng dịch của phân tử họ tiền liệt tuyến 4 (STEAP4), FK506 gắn kết protein 5 (FKBP5), và orosomucoid 1/alpha-1-acid glycoprotein 1 (hoặcM1). Theo một số phương án, biểu hiện của gen có thể cảm ứng được đánh giá trong sự có mặt của chất chủ vận AR. Theo một số phương án, tế bào được tiếp xúc với chất chủ vận androgen trước khi hoặc đồng thời với hợp chất thử nghiệm.

Theo một số phương án, mức độ của hoạt tính AR được phát hiện bằng cách đo biểu hiện của một hoặc nhiều các gen nội sinh mà được chặn bằng cách tiếp xúc với androgen hoặc chất chủ vận AR. Theo một số phương án, tăng hoặc hồng để

ngăn chặn biểu hiện của một hoặc nhiều androgen được chặn các gen sau khi tiếp xúc với hợp chất thử nghiệm so với việc điều chỉnh thích hợp cho thấy hợp chất thử nghiệm hiệu quả dùng cho ức chế của polypeptit AR đột biến. Theo một số phương án, điều chỉnh là biểu hiện cơ bản của gen trước khi cho tế bào tiếp xúc với hợp chất thử nghiệm. Gen chặn androgen mẫu bao gồm, nhưng không giới hạn đến, kháng thể màng đặc hiệu tiền liệt tuyến (PSMA), họ mang chất tan 35 (SLC35F2/NOV), IGF gắn kết protein-3 và -5, chất tăng cường CCAAT gắn kết protein- δ , photphataza và tensin homolog được loại bỏ trên nhiễm sắc thể 10 (PTEN), IL-15, IL-18, và ERBB2/HER2. Theo một số phương án, biểu hiện của gen có thể chặn được đánh giá trong sự có mặt của chất chủ vận AR. Theo một số phương án, tế bào được tiếp xúc với chất chủ vận androgen trước khi hoặc đồng thời với hợp chất thử nghiệm.

Các phương pháp đo biểu hiện của các gen nội sinh là giềng-đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các phương pháp mẫu dùng để đo biểu hiện gen bao gồm, nhưng không giới hạn đến các phương pháp phân tích protein như, ví dụ, mô hóa học miễn dịch, vết miễn dịch (ví dụ, phân tích western), sắc ký, và các phương pháp phân tích axit nucleic, như, ví dụ, chuỗi phản ứng polymeraza (PCR), PCR định lượng (qPCR), PCR thời gian thực (RT-PCR), phân tích Northern.

Theo một số phương án, hoạt tính polypeptit AR đột biến được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm như, nhưng không giới hạn đến, thử nghiệm gắn kết chất cộng hoạt hóa AR (ví dụ, các thử nghiệm tạo cặn miễn dịch, thử nghiệm hai lai, thử nghiệm chuyển năng lượng cộng hưởng Förster (huỳnh quang), ví dụ, thử nghiệm chất cộng hoạt hóa thụ thể androgen Lanthan Bộ lọc™ TR-FRET), thử nghiệm định hình hình dạng AR (xem, ví dụ, Joseph et al. (2009) *PNAS* 106(29):12178-12183), thử nghiệm gắn kết AR ADN (xem, ví dụ, Roche et al. (1992) *Mol. Endocrinol.* 6(12):2229-35), tạo cặn miễn dịch nhiễm sắc thể, thử nghiệm tương tác đầu cuối N/C (xem, ví dụ, Hsu et al. (2005) *Mol. Endocrinology* 19(2) 350-361 và Ghali et al. (2003) *J Clin Endocrinol Metab.* 88(5):2185-93).

Theo một số phương án, phương pháp để xác định Các hợp chất ức chế AR thể hệ thứ ba bao gồm chọn hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba tiềm năng bằng cách sử dụng mô hình hỗ trợ máy tính với cấu trúc dung dịch hoặc tinh thể ba chiều của polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến bao gồm sự thay thế axit amin ở vị trí tương ứng với vị trí

axit amin 876 của polypeptit AR kiểu đại được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến không chứa phenylalanin ở vị trí axit amin 876 trong polypeptit. Theo một số phương án, polypeptit AR đột biến chứa leuxin ở vị trí axit amin 876 trong polypeptit. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm sự tiếp xúc polypeptit AR đột biến với hợp chất thử nghiệm và phát hiện sự tương tác của hợp chất thử nghiệm với polypeptit AR đột biến. Theo một số phương án, hợp chất thử nghiệm tương tác với polypeptit AR đột biến được xác định là ứng viên hợp chất ức chế AR thế hệ thứ ba.

Theo một số phương án, hợp chất thử nghiệm dùng cho sử dụng trong phương pháp được cung cấp là phần tử của thư viện các hợp chất. Theo một số phương án, thế hệ của thư viện các hợp chất thử nghiệm bằng các phương pháp thích hợp bất kỳ dùng cho sản xuất các hợp chất hóa học. “thư viện các hợp chất thử nghiệm” đề cập đến bảng điều khiển bao gồm vô số các hợp chất thử nghiệm. Tiếp cận mẫu dùng cho tổng hợp thư viện phân tử của các phân tử hữu cơ nhỏ đã được mô tả (Carell et al. (1994). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059; Carell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061). Theo một số phương án các hợp chất thử nghiệm được đề xuất trong bản mô tả này đạt được bằng cách sử dụng bất kỳ trong số cách tiếp cận trong các phương pháp thư viện tổ hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm: thư viện sinh học; thư viện pha rắn hoặc pha lỏng song song có thể có địa chỉ không gian, phương pháp thư viện tổng hợp yêu cầu hoàn lưu, phương pháp thư viện ‘một hạt một hợp chất’, và phương pháp thư viện tổng hợp bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký ái lực. Tiếp cận thư viện sinh học được giới hạn với thư viện peptit, trong khi bốn đường dẫn khác có thể được áp dụng với peptit, oligomer không phải peptit hoặc thư viện phân tử nhỏ của các hợp chất (Lam, K. S. (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145). Các phương pháp mẫu khác dùng cho tổng hợp thư viện phân tử được tìm thấy trong kỹ thuật này, ví dụ in: Erb et al. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422; Horwell et al. (1996) *Immunopharmacology* 33:68-; và in Gallop et al. (1994); *J. Med. Chem.* 37:1233-. Theo một số phương án, thư viện của các hợp chất được đề cập trong giải pháp (ví dụ, Houghten (1992) *Biokỹ thuật* 13:412-421), hoặc trên các hạt (Lam (1991) *Nature* 354:82-84), các vụn (Fodor (1993) *Nature* 364:555-556), vi khuẩn (Ladner U.S. Pat. No. 5,223,409), bào tử (Ladner USP '409), plasmit (Cull et al. (1992) *Proc Natl Acad Sci USA* 89:1865-1869) hoặc trên bề mặt thực

khuẩn (Scott và Smith (1990) *Science* 249:386-390); (Devlin (1990) *Science* 249:404-406); (Cwirla et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87:6378-6382); (Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-310). Theo một số phương án, tổ hợp polypeptit được sản xuất từ thư viện cADN. Mẫu các hợp chất có thể được sàng dùng cho hoạt tính bao gồm, nhưng không giới hạn đến, peptit, axit nucleic, cacbohydrat, phân tử hữu cơ nhỏ, và thư viện chiết sản phẩm tự nhiên.

Chất ức chế AR được xác định bằng các phương pháp sàng lọc

Chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sàng lọc các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này là tác nhân điều biến AR. Theo một số phương án, chất ức chế AR thể hệ thứ ba ức chế hoặc giảm bớt ít nhất một hoạt tính của polypeptit AR. Mẫu hoạt tính AR bao gồm, nhưng không giới hạn đến, gắn kết đồng chất hoạt hóa, gắn kết ADN, gắn kết phổi từ, hoặc chuyển vị hạt nhân. Theo một số phương án, chất ức chế AR thể hệ thứ ba ức chế hoạt tính của polypeptit AR bằng khoảng 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% hoặc 100% so với hoạt tính của polypeptit AR trong sự vắng mặt của chất ức chế. Theo một số phương án, Các hợp chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này là chất chủ vận đảo ngược AR, chất đối kháng AR, sự suy thoái AR, tác nhân điều biến lưu lượng AR và/hoặc chất ức chế gắn kết AR ADN. Theo một số phương án, Các hợp chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này là chất chủ vận ngược AR. Theo một số phương án, Các hợp chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này chất đối kháng AR. Theo một số phương án, Các hợp chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này sự suy thoái AR. Theo một số phương án, Các hợp chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này tác nhân điều biến lưu lượng AR. Theo một số phương án, Các hợp chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này chất ức chế gắn kết AR ADN. Theo một số phương án, chất ức chế AR ức chế ít nhất một hoạt tính của polypeptit AR kiểu đại. Theo một số phương án, chất ức chế AR ức chế ít nhất một hoạt tính polypeptit AR đột biến.

Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này có hoạt tính biến dạng gây co giật tối thiểu và/hoặc tác động tối thiểu trên ngưỡng co giật. Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này hiển thị điều biến tối của kênh clorua được che GABA. Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này hiển thị minimal gắn kết với kênh clorua được che GABA. Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này có đối kháng tối thiểu của kênh clorua được che GABA. Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này là tác nhân điều biến AR bằng cách tương tác tối thiểu với kênh clorua được che GABA. Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này là tác nhân điều biến AR bằng cách tương tác tối thiểu với kênh clorua được che GABA_A. Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này là tác nhân điều biến AR bằng cách tương tác tối thiểu với kênh clorua được che GABA_A và hoặc thâm nhập màng máu não tối thiểu. GABA các thử nghiệm là được biết và bao gồm, nhưng không giới hạn đến, được mô tả trong Ashok K. Mehta và Maharaj K. Ticku "Characterization of the Picrotoxin Site of GABA_A Thụ thể" *Current Phác đồ in Pharmacology* (2000) 1,18,1-1,18,17; Copyright © 2000 by John Wiley & Sons, Inc., được kết hợp bằng cách tham chiếu trong tài liệu này.

Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này ức chế AR chuyển vị hạt nhân. Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này ức chế AR ADN gắn kết với yếu tố đáp ứng androgen. Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này ức chế bổ sung chất cộng hoạt hóa ở vùng khởi đầu đáp ứng AR. Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ

ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này biểu hiện không có hoạt tính chất chủ vận trong tế bào ung thư tiền liệt tuyến biểu hiện quá AR.

Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thế hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này ức chế phát triển của việc nhảy với cắt và ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt kiểu ghép ngoại lai. Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thế hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này ức chế phát triển của việc nhảy với cắt và ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt kiểu ghép ngoại lai biểu hiện AR kiểu đại. Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thế hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này ức chế phát triển của việc nhảy với cắt và ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt kiểu ghép ngoại lai biểu hiện AR biến thể có biến thể F876L. Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thế hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này ức chế phát triển của việc nhảy với cắt và ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt kiểu ghép ngoại lai biểu hiện AR kiểu đại và AR biến thể có biến thể F876L. Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thế hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này ức chế phát triển của việc nhảy với cắt và ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt kiểu ghép ngoại lai biểu hiện AR biến thể có biến thể T877A (ví dụ, khối u ghép ngoại lai được tạo ra từ tế bào LNCaP). Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thế hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này ức chế phát triển của việc nhảy với cắt và ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt kiểu ghép ngoại lai biểu hiện AR kiểu đại và AR biến thể có biến thể T877A (ví dụ, khối u ghép ngoại lai được tạo ra từ tế bào LNCaP/AR). Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thế hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này ức chế phát triển của việc nhảy với cắt và ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt kiểu ghép ngoại lai biểu hiện AR biến thể có biến thể T877A và AR biến thể có biến thể F876L.

Dược phẩm

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến dược phẩm bao gồm một số điều trị hiệu quả của chất ức chế AR thế hệ thứ ba được xác định bằng cách sàng lọc các

phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến việc sử dụng của chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sàng lọc các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này đối với việc chuẩn bị thuốc chữa bệnh.

Theo một số phương án, dược phẩm bao gồm chất ức chế AR thể hệ thứ ba cũng chứa ít nhất một hợp phần không hoạt hóa được dụng. Theo một số phương án, dược phẩm bao gồm chất ức chế AR thể hệ thứ ba là được phối chế dùng cho tiêm trong tĩnh mạch, tiêm dưới da, dùng qua đường miệng, hoặc dùng tại chỗ. Theo một số phương án, dược phẩm bao gồm chất ức chế AR thể hệ thứ ba là viên nén, viên tròn, viên nang, dạng lỏng, dịch huyền phù, gel, chất keo, chất phân tán, huyền phù, dung dịch, nhũ tương, thuốc mỡ, hoặc thuốc ngoài da.

Dược phẩm được phối chế theo cách thông thường bằng cách sử dụng một hoặc nhiều các hợp phần không hoạt hóa được dụng để dàng xử lý hoạt tính các hợp chất thành chế phẩm có thể được sử dụng được phẩm. chế phẩm thích hợp phụ thuộc vào đường dùng lựa chọn. Bản tóm tắt dược phẩm được mô tả ở đây có thể được tìm thấy, ví dụ, trong Remington: The Science và Practice of Pharmacy, Nineteenth Ed (Easton, Pa.: Mack Publishing Company, 1995); Hoover, John E., Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pennsylvania 1975; Liberman, H.A. và Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, New York, N.Y., 1980; và Pharmaceutical Dosage Forms và Drug Delivery Systems, Seventh Ed. (Lippincott Williams & Wilkins 1999), được kết hợp ở đây bằng cách tham chiếu đến bộ lọc này.

Dược đề xuất trong bản mô tả này là dược phẩm chất ức chế AR thể hệ thứ ba, hoặc muối được dụng của chúng, và ít nhất một hợp phần không hoạt hóa được dụng. Theo một số phương án, chất ức chế AR thể hệ thứ ba được mô tả ở đây được dùng làm dược phẩm trong đó, chất ức chế AR thể hệ thứ ba được trộn với các hợp phần hoạt tính khác, như trong kết hợp điều trị. Theo phương án khác, dược phẩm bao gồm các chất làm thuốc hoặc làm dược khác, chất mang, tá dược, chất bảo quản, chất ổn định, chất làm ổn định hoặc nhũ hóa, dung dịch vùng khởi đầu, muối để điều hòa áp suất thẩm thấu, và/hoặc chất đệm. Theo phương án khác, dược phẩm bao gồm các chất có giá trị điều trị khác.

Dược phẩm, như được sử dụng ở đây, đề cập đến hỗn hợp của chất ức chế AR thể hệ thứ ba hoặc muối dược dụng của chúng, với thành phần hóa học khác (nghĩa là, các hợp phần không hoạt hóa dược dụng), như chất mang, tá dược, chất liên kết, chất độn, chất huyền phù, chất thơm, chất làm ngọt, chất phân hủy, chất phân tán, chất xử lý bề mặt, chất bôi trơn, chất màu, chất pha loãng, làm hòa tan, chất làm ẩm, chất làm dẻo, chất làm ổn định, chất tăng cường thẩm, chất làm ướt, chất chống tạo bọt, chất chống oxy hóa, chất bảo quản, hoặc một hoặc nhiều kết hợp của chúng. Dùng dễ dàng dược phẩm của hợp chất cho đối tượng, như động vật có vú.

Một số điều trị hiệu quả có thể khác nhau tùy thuộc vào tình trạng bệnh, tuổi và sức khỏe tương đối của đối tượng, hiệu nghiệm của hợp chất được sử dụng và các yếu tố khác. Các hợp chất có thể được sử dụng đơn lẻ hoặc kết hợp với một hoặc nhiều tác nhân điều trị như thành phần của các hỗn hợp.

Dược phẩm được mô tả ở đây là được dùng cho đối tượng bằng các đường dùng thích hợp, bao gồm nhưng không giới hạn đến, qua đường miệng, ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, trong tĩnh mạch, dưới da, trong cơ), trong mũi, miệng, tại chỗ, trực tràng, hoặc các đường dùng qua da. Dược phẩm được mô tả ở đây bao gồm, nhưng không giới hạn đến, phân tán dịch lỏng dung dịch nước, chất phân tán tự nhũ tương hóa, các dung dịch rắn, chất phân tán liposomal, các sol khí, dạng liều rắn, các bột, các chế phẩm giải phóng trực tiếp, các chế phẩm giải phóng được điều chỉnh, các chế phẩm nóng chảy nhanh, viên nén, nang, viên tròn, các chế phẩm giải phóng chậm, các chế phẩm giải phóng kéo dài, các chế phẩm giải phóng đập, các chế phẩm nhiều hạt, và các chế phẩm giải phóng trực tiếp và được điều chỉnh được pha trộn.

Theo một số phương án, dược phẩm còn bao gồm một hoặc nhiều chất hoạt tính bổ sung điều trị, bao gồm, nhưng không giới hạn đến, corticosteroid, thuốc chống nôn, thuốc giảm đau, thuốc chống bệnh ung thư, thuốc chống viêm, chất ức chế kinase, chất ức chế HSP90, và chất ức chế histon deacetylaza (HDAC).

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến dược phẩm bao gồm một số điều trị hiệu quả polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến dược phẩm bao gồm một số điều trị hiệu quả của axit nucleic mã hóa polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này.

Các phương pháp điều trị

Theo một số phương án, Các hợp chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này được dùng để điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh. Theo một số phương án, được mô tả ở đây là các phương pháp điều trị bệnh phụ thuộc AR hoặc trung gian AR hoặc tình trạng bệnh ở động vật có vú bao gồm việc dùng cho động vật có vú một số điều trị hiệu quả của hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này, hoặc muối được dùng của chúng.

Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến các phương pháp bao gồm việc dùng hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này cho đối tượng (ví dụ, ở người) có bệnh hoặc tình trạng bệnh là AR được trù tính hoặc phụ thuộc AR. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến việc sử dụng hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này đối với việc chuẩn bị thuốc chữa bệnh cho điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh là AR được trù tính hoặc phụ thuộc AR. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này dùng cho điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh là AR được trù tính hoặc phụ thuộc AR. Theo một số phương án, đối tượng (ví dụ, ở người) hiện đang nhận một hoặc nhiều chất hoạt tính bổ sung điều trị khác với hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba.

Theo một số phương án, phương pháp còn bao gồm dùng một hoặc nhiều chất hoạt tính bổ sung điều trị khác với hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, một hoặc nhiều chất hoạt tính bổ sung điều trị khác với hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này là được chọn từ: hormone, chất chủ vận thụ thể hormone hoặc chất đối kháng, corticosteroid, thuốc chống nôn, thuốc giảm đau, thuốc chống bệnh ung thư, thuốc chống viêm, chất ức chế kinase, chất ức chế HSP90, chất ức chế histone deacetylase (HDAC). Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được dùng trước, đồng thời, sau, hoặc không liên tục với một hoặc nhiều chất hoạt tính bổ sung điều trị khác với hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba.

Theo một số phương án, đối tượng được dùng chất chủ vận hoặc chất đối kháng hormon giải phóng gonadotropin (GnRH) kết hợp với hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, chất chủ vận thụ thể GnRH như leuprolit, bruserelin và goserelin được dùng cho đối tượng kết hợp với hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được đề xuất trong bản mô tả này. Chất chủ vận thụ thể GnRHs gây ra bột biến ban đầu trong sản xuất hormon (nghĩa là, “phản ứng ban đỏ lâm sàng”) tiếp theo là ức chế sản xuất hormon lutein hóa, mà có xu hướng gây ra khử testosterone và dihydrotestosterone, mà vẫn tiếp tục phát triển tế bào ung thư tiền liệt tuyến phụ thuộc. Theo một số phương án, đối tượng được dùng chất chủ vận hoặc chất đối kháng hormon giải phóng gonadotropin (GnRH) kết hợp với hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được đề xuất trong bản mô tả này dùng cho điều trị bệnh phụ thuộc AR hoặc trung gian AR hoặc tình trạng bệnh như tiền liệt tuyến, vú, bàng quang hoặc bệnh ung thư thuộc tế bào gan. Theo một số phương án, đối tượng được dùng chất chủ vận hoặc chất đối kháng hormon giải phóng gonadotropin (GnRH) kết hợp với hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được đề xuất trong bản mô tả này dùng cho điều trị ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt (CRPC). Theo một số phương án, đối tượng được dùng hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được đề xuất trong bản mô tả này để làm giảm hoặc ức chế đột biến đầu tiên trong sản xuất hormon được gây ra bởi điều trị bằng chất chủ vận thụ thể GnRH. Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được dùng trước, đồng thời, sau, hoặc không liên tục với chất chủ vận thụ thể GnRH hoặc chất đối kháng.

Theo một số phương án, bệnh hoặc tình trạng bệnh phụ thuộc AR hoặc AR trung gian là tăng sản tiền liệt tuyến lành tính, chứng mọc lông nhiều, mụn trứng cá, u tuyến và khối u của tiền liệt tuyến, tế bào u bướu lành tính hoặc ác tính chứa thụ thể androgen, hyperpilosity, tăng tiết bã nhờn, bệnh lạc nội mạc tử cung, bệnh buồng trứng đa nang, bệnh rụng tóc, chứng giảm năng tuyến sinh dục, chứng loãng xương, ức chế sự tạo tinh trùng, sinh lực, chứng suy mòn, chứng chán ăn, bổ sung androgen dùng cho tuổi liên quan đến việc làm giảm mức testosterone, ung thư tiền liệt tuyến, bệnh ung thư vú, bệnh ung thư nội mạc tử cung, bệnh ung thư dạ con, bệnh ung thư bàng quang, bệnh ung thư thuộc tế bào gan, bóc hòa, và bệnh của Kennedy, bệnh teo cơ và nhược cơ, teo da, loãng xương, thiếu máu, chứng xơ cứng động mạch, bệnh

tim mạch, bệnh mất năng lượng, bệnh suy nhược, bệnh đái tháo đường loại 2 hoặc tích tụ mỡ ở bụng. Theo một số phương án, bệnh hoặc tình trạng bệnh phụ thuộc AR hoặc AR trung gian là bệnh ung thư phụ thuộc AR hoặc AR trung gian, như, ví dụ, ung thư tiền liệt tuyến, vú, bàng quang hoặc bệnh ung thư gan (nghĩa là, thuộc tế bào gan).

Theo một số phương án, được mô tả ở đây là các phương pháp điều trị bệnh ung thư ở động vật có vú bao gồm việc dùng cho động vật có vú một số điều trị hiệu quả của hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này, hoặc muối được dùng của chúng. Theo một số phương án, bệnh ung thư bệnh ung thư phụ thuộc hormone. Theo một số phương án, bệnh ung thư phụ thuộc hormone là bệnh ung thư phụ thuộc AR. Theo một số phương án, bệnh ung thư này là bệnh ung thư tiền liệt tuyến. Theo một số phương án, bệnh ung thư là ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt. Theo một số phương án, phương pháp điều trị bệnh ung thư còn bao gồm dùng cho động vật có vú ít nhất một bổ sung thuốc kháng bệnh ung thư.

Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này được sử dụng để điều trị ung thư tiền liệt tuyến ở động vật có vú, trong đó động vật có vú không được chấp nhận điều trị bằng thuốc kháng bệnh ung thư. Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này được sử dụng để điều trị ung thư tiền liệt tuyến ở động vật có vú, trong đó động vật có vú không được chấp nhận điều trị bằng các hợp chất hóa học trị liệu.

Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này được sử dụng để điều trị ung thư tiền liệt tuyến ở động vật có vú, trong đó động vật có vú đã được dùng một hoặc nhiều thuốc chống bệnh ung thư. Mẫu thuốc chống bệnh ung thư bao gồm, nhưng không giới hạn đến, thuốc điều trị thuộc hormone, bao gồm, nhưng không giới hạn đến chất đối kháng AR thể hệ thứ nhất và thứ hai (ví dụ, bicalutamid, flutamid, hydroxyflutamid, nilutamid, ARN-509, enzalutamid (MDV3100) và RD162) và các hợp chất ức chế sản xuất hormone (ví dụ, androgen), như, ví dụ, galeteron (TOK001), TAK-700 hoặc abirateron axetat, các hợp chất hóa học trị liệu, chất

chống chuyển hóa, kháng thể kháng bệnh ung thư, phẫu thuật, bức xạ, và điều trị nhiệt độ cao. Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này được sử dụng để điều trị ung thư tiền liệt tuyến ở động vật có vú, trong đó động vật có vú đã được dùng một hoặc nhiều các hợp chất hóa học trị liệu. Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này được sử dụng để điều trị ung thư tiền liệt tuyến ở động vật có vú, trong đó động vật có vú đã được điều trị bằng cách phẫu thuật. Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này được sử dụng để điều trị ung thư tiền liệt tuyến ở động vật có vú, trong đó động vật có vú đã được điều trị bằng điều trị bức xạ. Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này được sử dụng để điều trị ung thư tiền liệt tuyến ở động vật có vú, trong đó động vật có vú đã được điều trị bằng cách điều trị nhiệt độ cao.

Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này được sử dụng để điều trị ung thư tiền liệt tuyến ở động vật có vú, trong đó động vật có vú đã được dùng một hoặc nhiều chu kỳ điều trị bằng thuốc kháng bệnh ung thư.

Theo một số phương án, được mô tả ở đây là các phương pháp điều trị bệnh ung thư ở động vật có vú bao gồm việc dùng cho động vật có vú một số điều trị hiệu quả của hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này, hoặc muối được dùng của chúng, trong đó hợp chất là chất chủ vận ngược AR, chất đối kháng AR, suy thoái AR, tác nhân điều biến lưu lượng AR, chất ức chế ADN gắn kết AR, hoặc sự tổ hợp của chúng.

Theo một số phương án, được mô tả ở đây là các phương pháp điều trị bệnh ung thư ở động vật có vú bao gồm việc dùng cho động vật có vú một số điều trị hiệu quả của hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này, hoặc muối được dùng của chúng, trong đó hợp chất là chất chủ vận ngược AR.

Theo một số phương án, được mô tả ở đây là các phương pháp điều trị bệnh ung thư ở động vật có vú bao gồm việc dùng cho động vật có vú một số điều trị hiệu quả của hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này, hoặc muối được dùng của chúng, trong đó hợp chất chất đối kháng AR.

Theo một số phương án, được mô tả ở đây là các phương pháp điều trị bệnh ung thư ở động vật có vú bao gồm việc dùng cho động vật có vú một số điều trị hiệu quả của hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này, hoặc muối được dùng của chúng, trong đó hợp chất là suy thoái AR.

Theo một số phương án, được mô tả ở đây là các phương pháp điều trị bệnh ung thư ở động vật có vú bao gồm việc dùng cho động vật có vú một số điều trị hiệu quả của hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này, hoặc muối được dùng của chúng, trong đó hợp chất là tác nhân điều biến lưu lượng AR.

Theo một số phương án, được mô tả ở đây là các phương pháp điều trị bệnh ung thư ở động vật có vú bao gồm việc dùng cho động vật có vú một số điều trị hiệu quả của hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này, hoặc muối được dùng của chúng, trong đó hợp chất là chất ức chế ADN gắn kết AR.

Theo một số phương án, được mô tả ở đây là các phương pháp điều trị bệnh ung thư ở động vật có vú bao gồm việc dùng cho động vật có vú một số điều trị hiệu quả của hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này, hoặc muối được dùng của chúng, trong đó hợp chất là chất ức chế tổng hợp protein AR.

Theo một số phương án, bệnh ung thư này là bệnh ung thư tiền liệt tuyến. Theo một số phương án, bệnh ung thư là ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt. Theo một số phương án, ung thư tiền liệt tuyến ung thư tiền liệt tuyến kháng ARN-509. Theo một số phương án, ung thư tiền liệt tuyến ung thư tiền liệt tuyến kháng enzalutamit (MDV3100). Theo một số phương án, ung thư tiền liệt tuyến ung thư tiền liệt tuyến kháng RD162. Theo một số phương án, ung thư tiền liệt tuyến ung thư tiền liệt tuyến kháng abirateron axetat. Theo một số phương án, ung thư tiền liệt tuyến ung thư tiền

liệt tuyến kháng galeteron (TOK001). Theo một số phương án, ung thư tiền liệt tuyến ung thư tiền liệt tuyến kháng TAK-700.

Dược phẩm được mô tả ở đây là có thể dùng cho đối tượng theo nhiều cách khác nhau bằng nhiều đường dùng, bao gồm nhưng không giới hạn đến, qua đường miệng, ngoài đường tiêu hóa (ví dụ, trong tĩnh mạch, dưới da, trong cơ), miệng, tại chỗ hoặc các đường dùng qua da. Dược phẩm được mô tả ở đây bao gồm, nhưng không giới hạn đến, phân tán dịch lỏng dung dịch nước, chất phân tán tự nhũ tương hóa, các dung dịch rắn, chất phân tán liposomal, dạng liều rắn, các bột, các chế phẩm giải phóng trực tiếp, các chế phẩm giải phóng được điều chỉnh, các chế phẩm nóng chảy nhanh, viên nén, nang, viên tròn, các chế phẩm giải phóng chậm, các chế phẩm giải phóng kéo dài, các chế phẩm giải phóng đập, các chế phẩm nhiều hạt, và các chế phẩm giải phóng trực tiếp và được điều chỉnh được pha trộn. Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thế hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này được dùng qua đường miệng. Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thế hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này được dùng trong tĩnh mạch.

Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thế hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này được dùng tại chỗ. Theo phương án này, hợp chất chất ức chế AR thế hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này được phối chế thành các loại của chế phẩm có thể dùng tại chỗ, như dung dịch, huyền phù, thuốc bôi ngoài da, gel, bột nhão, dầu gội, cọ rửa, chà xát, vết bẩn, dán thuốc, băng thuốc, dầu thơm, các loại kem hoặc thuốc mỡ. Các hợp chất được phẩm này có thể chứa chất làm hòa tan, chất làm ổn định, chất nâng cao tương lực, chất đệm và chất bảo quản. Theo một khía cạnh, các hợp chất kháng androgen được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này được dùng tại chỗ vào da.

Theo khía cạnh khác việc sử dụng hợp chất chất ức chế AR thế hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này trong sản xuất thuốc chữa bệnh dùng để điều trị bệnh, làm rối loạn hoặc tình trạng bệnh trong đó, hoạt tính AR góp phần vào bệnh lý và/hoặc triệu chứng của bệnh

hoặc tình trạng bệnh. Theo một khía cạnh, bệnh hoặc tình trạng bệnh là bất kỳ bệnh hoặc tình trạng bệnh được chỉ dẫn ở đây.

Theo bất kỳ khía cạnh nêu trên là phương pháp khác trong đó, (a) lượng hiệu quả của hợp chất chất ức chế AR thế hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này là được dùng tổng hợp cho động vật có vú; và/hoặc (b) lượng hiệu quả của hợp chất chất ức chế AR thế hệ thứ ba được dùng qua đường miệng cho động vật có vú; và/hoặc (c) lượng hiệu quả của hợp chất chất ức chế AR thế hệ thứ ba là được dùng trong tĩnh mạch cho động vật có vú; và/hoặc (d) lượng hiệu quả của hợp chất chất ức chế AR thế hệ thứ ba được dùng bằng cách tiêm cho động vật có vú; và/hoặc (e) lượng hiệu quả của hợp chất chất ức chế AR thế hệ thứ ba được dùng tại chỗ cho động vật có vú; và/hoặc (f) lượng hiệu quả của hợp chất chất ức chế AR thế hệ thứ ba được dùng không tổng hợp hoặc cục bộ cho động vật có vú.

Theo bất kỳ khía cạnh nêu trên là phương pháp khác bao gồm dùng đơn của lượng hiệu quả của hợp chất chất ức chế AR thế hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này, bao gồm các phương án khác trong đó, (i) hợp chất chất ức chế AR thế hệ thứ ba được dùng một lần; (ii) hợp chất chất ức chế AR thế hệ thứ ba được dùng cho động vật có vú nhiều nhiều lần trong khoảng thời gian một ngày; (iii) liên tục; hoặc (iv) liên tục.

Theo bất kỳ khía cạnh nêu trên là phương pháp khác bao gồm dùng nhiều lượng hiệu quả của hợp chất chất ức chế AR thế hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này, bao gồm các phương án khác trong đó, (i) hợp chất chất ức chế AR thế hệ thứ ba được dùng liên tục hoặc không liên tục: như trong liều đơn; (ii) thời gian giữa dùng nhiều là mỗi 6 giờ; (iii) hợp chất chất ức chế AR thế hệ thứ ba được dùng cho động vật có vú mỗi 8 giờ; (iv) hợp chất chất ức chế AR thế hệ thứ ba được dùng cho động vật có vú mỗi 12 giờ; (v) hợp chất chất ức chế AR thế hệ thứ ba được dùng cho động vật có vú mỗi 24 giờ. Theo các phương án khác hoặc thay thế, phương pháp này bao gồm nghỉ thuốc, trong đó dùng hợp chất chất ức chế AR thế hệ thứ ba tạm đình chỉ hoặc liều hợp chất được dùng là tạm thời giảm xuống; ở phần cuối của kỳ nghỉ thuốc, liều hợp chất được dùng trở lại. Theo một số phương án, chiều dài của kỳ nghỉ thuốc thay đổi từ 2 ngày đến 1 năm.

Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp làm giảm hoạt tính AR ở động vật có vú bao gồm việc dùng cho động vật có vú hợp chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc làm giảm hoạt tính AR trong các tế bào bệnh tiền liệt tuyến ở động vật có vú. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc làm giảm hoạt tính AR trong các tế bào không phải là bệnh tiền liệt tuyến. Theo một số phương án, phương pháp làm giảm hoạt tính AR bao gồm việc làm giảm gắn kết của các androgen vào thụ thể androgen. Theo một số phương án, phương pháp làm giảm hoạt tính AR bao gồm việc làm giảm nồng độ AR trong tế bào.

Trong một số trường hợp được đề cập ở đây việc sử dụng hợp chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này trong sản xuất thuốc chữa bệnh dùng cho điều trị bệnh hoặc tình trạng bệnh phụ thuộc AR hoặc AR trung gian. Theo một số phương án, bệnh hoặc tình trạng bệnh là bệnh ung thư tiền liệt tuyến. Theo một số phương án, bệnh hoặc tình trạng bệnh phụ thuộc AR hoặc AR trung gian được mô tả ở đây.

Trong một số trường hợp được đề cập ở đây việc sử dụng hợp chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này trong điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh hoặc tình trạng bệnh phụ thuộc AR hoặc AR trung gian. Theo một số phương án, bệnh hoặc tình trạng bệnh phụ thuộc AR hoặc AR trung gian được mô tả ở đây.

Theo bất kỳ phương án được đề cập ở đây, động vật có vú là người. Theo một số phương án, hợp chất ức chế AR thể hệ thứ ba được đề xuất trong bản mô tả này được dùng cho người.

Theo một số phương án, hợp chất ức chế AR thể hệ thứ ba được đề xuất trong bản mô tả này được sử dụng để làm thuyên giảm, giảm bớt, hoặc khử hoạt tính AR.

Theo một số phương án, Các hợp chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng phương pháp được đề cập ở đây là lựa chọn tác nhân điều biến AR. Theo một số phương án, Các hợp chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng phương pháp được đề cập ở đây có tính đặc hiệu cao dùng cho AR và có thể được mong muốn, hoạt tính được lý lựa chọn mô. Được mong muốn, hoạt tính được lý lựa chọn

mô bao gồm, nhưng không giới hạn đến, hoạt tính chất đối kháng AR trong các tế bào bệnh tiền liệt tuyến và không có hoạt tính chất đối kháng AR trong các tế bào không phải là bệnh tiền liệt tuyến. Theo một số phương án, Các hợp chất ức chế AR thể hệ thứ ba được đề cập ở đây là kháng androgen thể hiện không đáng kể hoặc không có hoạt tính Chất chủ vận AR.

Theo một số phương án, được đề cập ở đây là Các hợp chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng phương pháp được đề cập ở đây được chọn từ chất chuyển hóa hoạt tính, chất hồ biến, solvat được dụng, muối được dụng hoặc các tiền chất của hợp chất chất ức chế AR được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, được phẩm bao gồm các hợp chất ức chế AR thể hệ thứ ba được dùng kết hợp với một hoặc nhiều thuốc trị liệu bổ sung, bao gồm, nhưng không giới hạn đến, corticosteroid, thuốc chống nôn, thuốc giảm đau, thuốc chống bệnh ung thư, thuốc chống viêm, chất ức chế kinaza, chất ức chế HSP90, và chất ức chế histon deacetylaza (HDAC). Theo một số phương án, được phẩm bao gồm các hợp chất ức chế AR thể hệ thứ ba được dùng kết hợp với thuốc kháng bệnh ung thư bao gồm, nhưng không giới hạn đến, thuốc điều trị hormone, bao gồm, nhưng không giới hạn đến chất đối kháng AR thể hệ thứ nhất và thứ hai (ví dụ, bicalutamid, flutamid, hydroxyflutamid, nilutamid, ARN-509, enzalutamid (MDV3100) và RD162), hợp chất mà sản xuất ức chế hormone (ví dụ, androgen), như chất ức chế CYP17A, bao gồm, ví dụ, galeteron (TOK001), TAK-700 hoặc abirateron axetat, các hợp chất hóa học trị liệu, chất chống chuyển hóa, kháng thể kháng bệnh ung thư, phẫu thuật, bức xạ, và điều trị nhiệt độ cao. Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba và thuốc trị liệu bổ sung được dùng in the same chế phẩm. Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba và thuốc trị liệu bổ sung được dùng làm chế phẩm riêng biệt. Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba và thuốc trị liệu bổ sung được dùng đồng thời, liên tục, hoặc không liên tục. Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba và thuốc trị liệu bổ sung được dùng bằng đường dùng tương tự. Theo một số phương án, hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba và thuốc trị liệu bổ sung được dùng bằng đường dùng khác nhau.

Kit/Hạng mục sản xuất

Đối với việc sử dụng trong các chương trình chuẩn đoán và điều trị được mô tả ở đây, kit và hạng mục sản xuất cũng được mô tả ở đây. Kit này có thể bao gồm chất mang, đóng gói, hoặc bình chứa được chia thành ngăn để nhận được một hoặc nhiều bình chứa như lọ nhỏ, ống, và dụng cụ tương tự, mỗi bình chứa bao gồm một trong các yếu tố riêng biệt để được sử dụng trong phương pháp được mô tả ở đây. Bình chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, chai, lọ nhỏ, ống tiêm, và ống nghiệm. Bình chứa được tạo ra từ vật liệu được chấp nhận bất kỳ bao gồm, ví dụ, thủy tinh hoặc nhựa.

Theo một số phương án, kit được đề xuất trong bản mô tả này sử dụng trong phát hiện axit nucleic mã hóa polypeptit AR đột biến trong đối tượng hoặc để phát hiện polypeptit AR đột biến trong đối tượng (nghĩa là, kit chuẩn đoán). Theo một số phương án kit được sử dụng để bệnh nhân chọn dùng cho điều trị bằng chất đối kháng AR thể hệ thứ ba, để xác định đối tượng là kháng hoặc có khả năng kháng với chất đối kháng AR thể hệ thứ nhất hoặc thứ hai, để giám sát sự phát triển của kháng với điều trị chất đối kháng AR thể hệ thứ nhất hoặc thứ hai, hoặc sự tổ hợp của chúng. Kit được đề xuất trong bản mô tả này chứa một hoặc nhiều thuốc thử để phát hiện axit nucleic mã hóa polypeptit AR đột biến, để phát hiện polypeptit AR đột biến, để phát hiện của hoạt tính AR trong các tế bào từ đối tượng, hoặc sự tổ hợp của chúng. Thuốc thử mẫu bao gồm nhưng không giới hạn đến, chất đệm, thuốc thử PCR, kháng thể, chất nền để nhuộm enzymatic, chromagen hoặc các vật liệu khác, như bàn trượt, bình chứa, đĩa vi sinh, và tùy chọn, hướng dẫn để thực hiện các phương pháp. Những người có kinh nghiệm trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ nhận dạng nhiều bình chứa và đĩa và thuốc thử khác mà có thể được sử dụng để tiếp xúc với các vật liệu khác nhau. Kit cũng có thể chứa mẫu đối chứng, như ví dụ, axit nucleic hoặc protein, như ví dụ Polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này hoặc axit nucleic mã hóa polypeptit AR đột biến được đề xuất trong bản mô tả này. Theo một số phương án, kit chứa một hoặc nhiều bộ mỗi oligonucleotit để phát hiện biểu hiện gen androgen nội sinh.

Theo một số phương án, bình chứa có thể bao gồm một hoặc nhiều chất đối kháng AR thể hệ thứ nhất hoặc thứ hai hoặc Các hợp chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng phương pháp được mô tả trong bản mô tả này, tùy chọn trong

chế phẩm hoặc kết hợp với chất khác như được mô tả ở đây. Tùy chọn bình chứa có lỗ nạp vô trùng (ví dụ, bình chứa có thể là túi dung dịch trong tĩnh mạch hoặc lọ nhỏ có nút khoét lỗ bằng a kim tiêm dưới da). Kit này tùy chọn bao gồm hợp chất với mô tả nhận dạng hoặc đánh dấu hoặc chỉ dẫn liên quan đến việc sử dụng nó theo các phương pháp được mô tả ở đây.

Thông thường kit sẽ bao gồm một hoặc nhiều bình chứa bổ sung, mới một hoặc nhiều vật liệu khác nhau (như thuốc thử, tùy chọn theo dạng được cô đặc, và/hoặc các thiết bị) mong muốn từ quan điểm thương mại và quan điểm của người sử dụng dùng cho sử dụng hợp chất được mô tả ở đây. Các ví dụ không giới hạn của các vật liệu này bao gồm, nhưng không giới hạn đến, chất đệm, chất pha loãng, bộ lọc, kim, ống tiêm; chất mang, đóng gói, bình chứa, lọ nhỏ và/hoặc ống đánh dấu niêm yết dung lượng và/hoặc hướng dẫn sử dụng, và đóng gói kèm theo hướng dẫn sử dụng. Thông thường bộ hướng dẫn cũng sẽ bao gồm.

Việc đánh dấu có thể được kết hợp với bình chứa. Đánh dấu có thể trên bình chứa khi viết, số hoặc thứ tự khác tạo thành nhãn được gắn, đúc hoặc khắc vào bình chứa; đánh dấu có thể kết hợp với bình chứa khi có mặt chỗ chứa hoặc chất mang mà cũng giữ bình chứa, ví dụ, như chèn đóng gói. Đánh dấu có thể được sử dụng để chỉ ra rằng dung lượng không được sử dụng cho ứng dụng điều cụ thể. Việc đánh dấu cũng chỉ ra phương hướng để sử dụng dung lượng, như theo các phương pháp được mô tả ở đây.

Hạng mục sản xuất, hạng mục này bao gồm vật liệu đóng gói, hợp chất chất ức chế AR thể hệ thứ ba được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được đề xuất trong bản mô tả này trong vật liệu đóng gói, và đánh dấu để chỉ ra rằng hợp chất hoặc chế phẩm, hoặc muối được dụng, chất hỗ biến, được dụng N-oxit, chuyển hóa hoạt tính được, tiền chất được dụng, hoặc solvat được dụng của chúng, được sử dụng để làm giảm, làm thuyên giảm hoặc loại bỏ những ảnh hưởng của thụ thể androgen, hoặc dùng cho điều trị, phòng ngừa hoặc cải thiện một hoặc nhiều triệu chứng bệnh hoặc tình trạng bệnh sẽ được lợi từ việc làm giảm hoặc loại bỏ của hoạt tính thụ thể androgen, là được cung cấp.

Tạo ra dòng tế bào kháng kháng androgen

Được đề xuất trong bản mô tả này các phương pháp tạo ra dòng tế bào ung thư tiền liệt tuyến kháng với việc điều trị bằng chất đối kháng AR. Theo một số

phương án, dòng tế bào ung thư tiền liệt tuyến kháng với việc điều trị bằng ARN-509. Theo một số phương án, dòng tế bào ung thư tiền liệt tuyến kháng với việc điều trị bằng enzalutamit (MDV3100). Theo một số phương án, dòng tế bào kháng được tạo ra bằng phương pháp tạo ra biểu hiện mức độ cao của AR so với dòng tế bào bố mẹ được sử dụng để tạo ra dòng tế bào kháng. Theo một số phương án, dòng tế bào kháng được tạo ra bằng phương pháp biểu hiện khoảng 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, 10 lần hoặc lớn hơn lượng của AR so với dòng tế bào bố mẹ. Theo một số phương án, dòng tế bào kháng biểu hiện AR biến thể protein.

Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm sự tiếp xúc dòng tế bào ung thư tiền liệt tuyến (nghĩa là, dòng tế bào bố mẹ) bằng chất đối kháng AR và nuôi cấy tế bào để được xác định trước trong khoảng thời gian xác định. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm nuôi cấy tế bào làm tăng nồng độ của chất đối kháng AR để được xác định trước trong khoảng thời gian xác định. Theo một số phương án, nồng độ của chất đối kháng AR nằm trong khoảng từ 0,1 μ M đến khoảng 100 μ M, như, ví dụ, từ 1 μ M đến 10 μ M. Theo một số phương án, tế bào được nuôi cấy trong 0,8 μ M, 1,5 μ M, 3 μ M và 6 μ M của chất đối kháng AR. Theo một số phương án, nồng độ của chất đối kháng AR tăng lên khoảng 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 hoặc nhiều lần. Theo một số phương án, nồng độ của chất đối kháng AR tăng lên khoảng 3 lần. Theo một số phương án, tế bào được nuôi cấy trong sự có mặt của chất đối kháng AR 1 ngày, 2 ngày, 3, ngày, 4 ngày, 5 ngày, 6 ngày, 1 tuần, 2 tuần, 3 tuần, 4 tuần, 1 tháng, 1,5 tháng, 2 tháng, 2,5 tháng, 3 tháng hoặc nhiều hơn. Theo một số phương án, tế bào được phân chia và được lặp lại mỗi 2 ngày, mỗi 3 ngày, mỗi 4 ngày, mỗi 5 ngày, mỗi 6 ngày, mỗi tuần hoặc lâu hơn. Theo một số phương án, môi trường nuôi cấy chứa chất đối kháng AR được làm mới mỗi ngày, mỗi 2 ngày, mỗi 3 ngày, mỗi 4 ngày, mỗi 5 ngày, mỗi 6 ngày, mỗi tuần hoặc lâu hơn. Theo một số phương án, chất đối kháng AR là chất đối kháng thế hệ thứ hai. Theo một số phương án, chất đối kháng AR là ARN-509. Theo một số phương án, chất đối kháng AR là enzalutamit (MDV3100).

Theo một số phương án, dòng tế bào ung thư tiền liệt tuyến là dòng tế bào ung thư tuyến tiền liệt tuyến ở người. Theo một số phương án, dòng tế bào ung thư tiền liệt tuyến là dòng tế bào LNCaP. Theo một số phương án, dòng tế bào ung thư tiền

liệt tuyến biểu hiện quá thụ thể androgen. Theo một số phương án, dòng tế bào ung thư tiền liệt tuyến là LNCaP/AR(cs) hoặc LNCaP/AR(cs)-Luc.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ được đề cập ở đây với mục đích minh họa mà không giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ 1: Tạo ra dòng tế bào kháng thuốc trong cơ thể

Tạo ra dòng tế bào kháng với việc điều trị bằng hợp chất AR kháng ARN-509 trong cơ thể chuột mang khối u ghép ngoại lai bệnh ung thư tuyến tiền liệt ở người kháng cắt (LNCaP/AR(cs)). Dòng tế bào LNCaP/AR(cs) vượt quá biểu hiện thụ thể androgen (AR) 3-5 lần so với ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt bắt chước dòng tế bào LNCaP bố mẹ (Chen et al. (2004) *Nature Medicine* 10:33-39).

Khối u ghép ngoại lai LNCaP-AR(cs) được phát triển ở chuột đực giao phối xa không có lông SCID sáu tuần tuổi bị cắt (SHO, Charles Rivers Labochuộtories). 1×10^6 tế bào LNCaP-ARcs trong 50% huyết thanh tự do RPMI và 50% Matrigel™ được tiêm dưới da (100μL/con) ở sườn phải của 10 con chuột 3-5 ngày sau khi cắt. Kích cỡ khối u được theo dõi hằng ngày. Khi khối u đạt được khối lượng trung bình khoảng ~200 mm³ (khoảng 60 ngày sau khi tiêm), các con chuột này đã bắt đầu điều trị bằng một mình tá được lỏng (n=1) hoặc 30mg/kg ARN-509 (n=9) bằng chế độ liều QD (nghĩa là, qua đường miệng trong 15% Vitamin E-TPGS và 65% của dung dịch cacboxymetyl xenluloza (CMC) 0,5% w/v trong chất đệm citrat 20 mM (độ pH 4,0)). Ban đầu, điều trị bằng ARN-509 gây ra thoái hóa khối u. Sau khoảng 75 ngày dùng thuốc, khối u đơn phát triển trở lại và tiến triển đến kích cỡ lớn hơn lúc bắt đầu điều trị. Một khi khối u đạt được ổn định ~800 mm³, chuột được giết và khối u được thu lại. Tế bào u bướu được phân tán bằng tay bởi sự tương đồng với ống tiêm 3 mL. Tế bào u bướu được nuôi cấy trong RPMI dương 10% FBS và 10μM ARN-509. Một dòng tế bào kháng được tạo ra bằng phương pháp này.

Ví dụ 2: Tạo ra dòng tế bào kháng thuốc trong ống nghiệm

Dòng tế bào kháng với việc điều trị bằng các hợp chất AR kháng ARN-509 và MDV3100 được tạo ra trong ống nghiệm bằng cách sử dụng dòng tế bào ung thư tuyến tiền liệt ở người LNCaP.

Duy trì LNCaP (ATCC), LNCaP/AR(cs) (Guo et al. (2006) *Cancer Cell* 0:309-19) và LNCaP/AR-Luc (Tran et al. *Science* (2009) 324(5928):787-90; Ellwood-Yen

et al. (2006) Cancer Res. 66:10513-6) trong RPMI 1640 được bổ sung với 10% FBS (Hyclon). Các tế bào LNCaP (ATCC), LNCaP/AR(cs) hoặc LNCaP/AR(cs)-Luc được nuôi cấy trong nồng độ tăng của ARN-509 hoặc MDV3100 qua quá trình khoảng 6 tháng. Ban đầu, 50 mL tế bào được cấy vào 225 cm² bình nuôi cấy tế bào ở nồng độ nằm trong khoảng 80,000 tế bào/mL và phát triển trong RPMI dương 10% FBS trong sự có mặt của 800nM ARN-509 hoặc MDV3100. Môi trường và thuốc được thay đổi một tuần hai lần và các tế bào được cho vào trong 75 cm² bình nuôi cấy tế bào khi cần. Nồng độ mỗi hợp chất được tăng nhiều lần khoảng từ 1,5μM đến 6μM khi tốc độ phát triển của tế bào được điều trị bằng thuốc tăng lên để kiểm soát tế bào không được điều trị. Sau khoảng 6 tháng chọn thuốc, các tế bào được giữ trong RPMI dương 10% FBS và 6μM ARN-509 hoặc MDV3100. Sau khi chọn, đặt được 10 dòng tế bào độc lập kháng ARN-509 và MDV3100. Hai dòng được bắt nguồn từ tế bào LNCaP (ATCC) được chọn trong sự có mặt của ARN-509. Bốn dòng tế bào được bắt nguồn từ LNCaP/AR(cs), hai dòng tế bào sau khi điều trị bằng ARN-509 và hai dòng sau khi điều trị bằng MDV3100. LNCaP/AR(cs)-Luc were được sử dụng để lấy 4 dòng tế bào kháng, hai dòng điều trị từ ARN-509 và hai dòng điều trị từ MDV3100.

Ví dụ 3: Thử nghiệm tăng sinh vào thuốc kháng thử nghiệm

Thử nghiệm tăng sinh tế bào được thực hiện để thử nghiệm khả năng kháng của dòng tế bào để điều trị ARN-509 và MDV3100.

Thử nghiệm tăng sinh được thực hiện ở tất cả các dòng tế bào kháng ARN-509 và MDV3100 bằng cách tạo mầm tế bào 16μL/giếng ở mật độ khoảng 50,000 tế bào trên mL trong RPMI 1640 loại bỏ phenol màu đỏ (với 5% CSS) vào đĩa nuôi cấy tế bào 384-giếng (đĩa 384 giếng được điều trị TC Polystyren đen đáy sạch phẳng (tím)) và được ủ trong 2 ngày ở 37°C. Đối với các thử nghiệm chất chủ vận, 11 điểm các dung dịch bán log của mỗi hợp chất được thực hiện trong môi trường nuôi cấy và 16μL của mỗi dung dịch pha loãng được bổ sung vào các tế bào. ARN-509, MDV3100 và bicalutamit được chạy ở nồng độ cuối đo khoảng cách từ $3,16 \times 10^{-5}$ M đến $3,18 \times 10^{-10}$ M, trong khi methyltrienolon androgen tổng hợp (R1881) được chạy ở phạm vi nồng độ cuối khoảng từ $3,16 \times 10^{-8}$ M đến $3,18 \times 10^{-13}$ M. Đối với thử nghiệm chất đối kháng, các hợp chất được pha loãng trong môi trường nuôi cấy cũng chứa 200pM R1881 (PerkinElmer, Waltham, MA) (cuối cùng [R1881] =

100pM) và sau đó được bổ sung vào các tế bào (16 μ L). Sau 7 ngày, 16 μ L thử nghiệm khả năng sống được của tế bào phát quang CellTiter-Glo® (Promega, Madison, WI) được bổ sung trực tiếp vào các nuôi cấy tế bào và các đơn vị phát quang tương đối (RLUs) được đo theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Theo chất chủ vận kiểu thử nghiệm, phần trăm khả năng sống được của mẫu được tính như sau: % khả năng sống được = 100 X ([mẫu RLU-môi trường RLU mà không cần tế bào]/[Tế bào được xử lý RLU 1881-môi trường RLU mà không cần tế bào]) (Bảng 1A). Theo thử nghiệm chất đối kháng, phần trăm khả năng sống được của mẫu được tính như sau: % khả năng sống được = 100 X ([mẫu RLU-RLU 0 ngày]/[Tế bào được xử lý RLU R1881 - RLU 0 ngày]) (Bảng 1B).

Bảng 1A. Thử nghiệm tăng sinh chất chủ vận (% Khả năng sống được)

	R1881	Bicalutamit	MDV3100	ARN-509
LNCaP	100,0	+	+	+
LNCaP/AR(cs)	100,0	+	+	+
Loại 1	100,0	++	++	++
Loại 2	100,0	+	++	++

‘+’ = < 30, ‘++’ = > 30

[R1881] = 0,1nM, [Chất đối kháng] = 10 μ M

Bảng 1B. Thử nghiệm chất đối kháng tăng sinh (% Khả năng sống được)

	R1881	Bicalutamit	MDV3100	ARN-509
LNCaP	100,0	+	+	+
LNCaP/AR(cs)	100,0	+	+	+
Loại 1	100,0	++	++	++
Loại 2	100,0	++	++	++

‘+’ = < 30, ‘++’ = > 30

[R1881] = 0,1nM, [Chất đối kháng]=10 μ M

Theo thử nghiệm tăng sinh, cả ARN-509 và enzalutamit là toàn bộ chất đối kháng khả năng tăng sinh ở cả ba dòng tế bào bố mẹ LNCaP (Bảng 1A, Fig.1A).

Dòng tế bào kháng được tách biệt thành hai loại riêng biệt. Không giống dòng tế bào của bố mẹ, loại thứ nhất của tế bào chống ARN-509- và MDV3100 (Loại 1) tăng sinh trong sự vắng mặt của androgen được bổ sung. Phôi tử độc lập phát triển của các tế bào không thay đổi trong sự có mặt của ARN-509, MDV3100 hoặc bicalutamid. Androgen tổng hợp, R1881, ức chế sự tăng sinh trong tế bào loại 1 ở nồng độ cao. Hoạt tính ức chế sự phát triển này của R1881 chống lại hoặc MDV3100 hoặc ARN-509, điều này chứng tỏ rằng AR vẫn có khả năng gắn kết MDV3100 và ARN-509 trong các dòng tế bào.

Dòng tế bào kháng loại 1 bao gồm một dòng tế bào có nguồn gốc từ khối u ghép ngoại lai LNCaP-AR(cs), 2 dòng tế bào có nguồn gốc từ tế bào LNCaP/AR(cs) được chọn trong sự có mặt của ARN-509, 2 dòng tế bào có nguồn gốc từ tế bào LNCaP/AR(cs)s được chọn trong sự có mặt của MDV3100, 2 dòng tế bào có nguồn gốc từ LNCaP/AR(cs)-Luc được chọn trong sự có mặt của ARN-509, và một dòng tế bào có nguồn gốc từ LNCaP/AR(cs)-Luc được chọn trong sự có mặt của MDV3100.

Loại thứ hai của dòng tế bào kháng MDV3100- và ARN-509 (Loại 2) còn lại phụ thuộc androgen dùng cho phát triển, tương tự như dòng tế bào bố mẹ của chúng. Tuy nhiên, không giống hoạt tính của chúng trên dòng tế bào bố mẹ, ARN-509 và MDV3100 can kích thích sự tăng sinh ở dòng tế bào loại 2. Tuy nhiên, bicalutamid không kích thích sự tăng sinh ở dòng tế bào loại 2. Dòng tế bào kháng loại 2 bao gồm hai dòng tế bào có nguồn gốc từ tế bào LNCaP được chọn trong sự có mặt của ARN-509 (LNCaP ARN-509r1 và LNCaP ARN-509r2) và một dòng tế bào có nguồn gốc từ LNCaP/AR(cs)-Luc được chọn trong sự có mặt của MDV3100 (LNCaP ENZr2).

Một phần hoạt tính chất chủ vận độc lập với hợp chất được sử dụng để chọn; ARN-509 và enzalutamid biểu lộ một phần hoạt tính chất chủ vận ở cả ba dòng tế bào bất kể hợp chất được sử dụng để lấy các biến thể kháng. Thích hợp với hoạt tính tăng sinh, ARN-509 hoặc enzalutamid chỉ chống lại một phần phát triển phụ thuộc androgen của các dòng kháng (Bảng 1B, Fig.1B,C).

Ví dụ 4: Các thử nghiệm chỉ thị phiên mã vào thuốc kháng thử nghiệm

Các thử nghiệm chỉ thị phiên mã bằng cách sử dụng yếu tố đáp ứng ARE hoạt động liên kết với gen chỉ thị được thực hiện để kháng thử nghiệm của các tế bào đối với ARN-509, MDV3100, và điều trị bicalutamid.

Các thử nghiệm chỉ thị phiên mã được thực hiện ở tất cả dòng tế bào kháng bằng cách tạo mầm 100 μ L tế bào ở mật độ khoảng 250,000 tế bào/mL vào đĩa nuôi cấy tế bào 96-giếng trong RPMI 1640 được bổ sung với 5% huyết thanh trơ với than và được phép gắn qua đêm ở 37°C.

Với việc ngoại trừ các tế bào LNCaP/AR(cs)-Luc chứa chỉ thị đáp ứng androgen được phức hợp, được chuyển nạp thoáng qua bằng cách sử dụng Lipofectin® (Life Technologies) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Đối với các tế bào LNCaP và LNCaP/AR(cs), ba lần chuyển nạp được thực hiện bằng cách sử dụng vector chỉ thị 428 ng (pGL4 Pb-Luxiferaza (probasin ở chuột hoạt hóa trong pGL4 (Promega, Madison, WI))), 50 ng pRL-CMV (sự chuẩn hóa vector, Promega, Madison, WI) và 0,7 μ L Lipofectin®. Sau khi chuyển nạp, các tế bào được ủ trong 4 giờ.

Sau đó, các tế bào được điều trị bằng các hợp chất thử nghiệm ARN-509, MDV3100 và bicalutamit. Đối với các thử nghiệm chất chủ vận, các hợp chất được pha loãng tuần tự và 50 μ L hợp chất trong RPMI 1640 dương 5% FBS trơ với than được bổ sung vào các tế bào. Đối với các thử nghiệm chất đối kháng, các hợp chất được pha loãng tuần tự và 50 μ L hợp chất với RPMI dương 3nM R1881 được bổ sung với 5% huyết thanh trơ với than được bổ sung vào các tế bào. Sau 48 giờ ủ môi trường được loại bỏ và các tế bào được dung giải trong 40 μ L dịch trích (25 mM Tris Photphat, 2 mM CDTA, 10% Glyxerol, 0,5% Triton X-100, 2 mM DTT). Hoạt tính luxiferaza ở đom đóm được đo ngay lập tức sau khi bổ sung 40 μ L dịch trích luxiferaza (20 mM tricin, 0,1 mM EDTA, 1,07 mM (MgCO₃)₄ Mg(OH)₂•5H₂O, 2,67 mM MgSO₄, 33,3 mM DTT, 270 μ M Coenzym A, 470 μ M luciferin, 530 μ M ATP). *Renilla luxiferaza* được đo sau khi bổ sung 40 μ L dịch đệm coelenterazin (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 coelenterazn, điều chỉnh độ pH cuối đến 5,0).

Hai loại dòng tế bào kháng ARN-509 và MDV3100 được xác định theo thử nghiệm tăng sinh cũng thể hiện các đặc tính riêng biệt trong các thử nghiệm phiên mã. Đối với các thử nghiệm chuyển nạp thoáng qua bằng cách sử dụng chỉ thị Luxiferaza pGL4 Pb hoặc trong các thử nghiệm bằng cách sử dụng chỉ thị probasin-luxiferaza được phức hợp (nghĩa là, các tế bào có nguồn gốc LNCaP/AR(cs)-Luc),

ARN-509 và MDV3100 là chất đối kháng hiệu quả trong tế bào kháng androgen-độc lập loại 1 được chứng minh bởi việc làm giảm hoạt tính luciferaza so với không kiểm soát điều trị (Bảng 2). Tuy nhiên, bicalutamid, thể hiện việc tăng hoạt tính chất chủ vận trong tế bào kháng loại 1 so với các tế bào bố mẹ. Trong tế bào kháng loại 2, MDV3100 là một phần loăng chất chủ vận trong thử nghiệm chỉ thị probasin-luxiferaza, trong khi bicalutamid và ARN-509 được hiển thị không có hoạt tính chất chủ vận.

Bảng 2A. Thử nghiệm chỉ thị chất chủ vận phiên mã (% Hoạt tính tối đa)

	R1881	Bicalutamid	MDV3100	ARN-509
LNCaP	>90	+	+	+
LNCaP/AR(cs)	>90	+	+	+
Loại 1	>90	++	+	+
Loại 2	>90	+	++	+

‘+’ = < 5, ‘++’ = > 5

[R1881] = 10nM, [Chất đối kháng] = 50 μ M

Bảng 2B. Thử nghiệm chỉ thị phiên mã chất đối kháng (% Hoạt tính tối đa)

	R1881	Bicalutamid	MDV3100	ARN-509
LNCaP	>90	+	+	+
LNCaP/AR(cs)	>90	+	+	+
Loại 1	>90	++	+	++
Loại 2	>90	+	++	+

‘+’ = < 5, ‘++’ = > 5

[R1881] = 10nM, [Chất đối kháng] = 50 μ M

Ví dụ 5: Thử nghiệm phiên mã gen nội sinh

Hiệu quả của việc điều trị R1881, MDV3100 và bicalutamid ở phiên mã gen nội sinh đã được kiểm tra.

Thử nghiệm phiên mã gen nội sinh được thực hiện ở tất cả dòng kháng by plating 0,5 mL tế bào ở mật độ khoảng 500,000 tế bào/mL in 24-well đĩa trong RPMI chứa 5% FBS trừ với than (hocmon nghèo) và growing tế bào for 3 ngày ở 37°C. Sau đó, các tế bào được điều trị for 24 h with 10nM R1881, 30 μ M MDV3100 hoặc 30 μ M bicalutamid.

ARN tổng được phân lập bằng cách sử dụng kit cách ly Aurum™ ARN tổng (BIO-RAD, Hercules, CA). ARN (1µg) được phiên mã ngược lại bằng cách sử dụng kit tổng hợp cADN iScript (BIO-RAD, Hercules, CA) để tạo ra cADN. PCR thời gian thực được thực hiện bằng cách sử dụng dụng cụ Applied Biosystems 7900HT và SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA). Phản ứng PCR được thực hiện trong 6µL theo hướng dẫn của nhà sản xuất và phác đồ chu trình nhiệt khoảng 95°C trong 10 phút tiếp theo là 40 chu kỳ khoảng 95°C trong 15 giây và 58°C trong 1 phút. Biểu hiện gen đáp ứng androgen (PSA, SLUG, TMPRSS2, STEAP4, FKBP5, ORM1, NOV, FASN, NKX3.1, AMIGO2, BDNF, CAMK2N1, HPGD, NCAPD3, PLD1) bình thường với biểu hiện GAPDH và được biểu hiện đối với dung môi điều trị của dòng tế bào bố mẹ. Kết quả biểu hiện tương đối được cung cấp trong bảng 3A. Mỗi được sử dụng cho PCR được liệt kê trong bảng 3B.

Hợp chất và loại tương tự hoạt tính chất chủ vận chọn lọc đã được sát trên gen đáp ứng androgen nội sinh, trong bối cảnh của các gen nội sinh, hoạt tính phiên mã của MDV3100 sẽ rõ ràng hơn trong (Bảng 3). Trong tế bào kháng loại 1, bicalutamid hiển thị mạnh hoạt tính phiên mã và MDV3100 là chất chủ vận phiên mã yếu. Ngược lại, trong dòng tế bào kháng loại 2, bicalutamid là chất chủ vận phiên mã yếu trong khi MDV3100 hiển thị mạnh hoạt tính chất chủ vận phiên mã trên gen được thử nghiệm.

Bảng 3A. Hoạt tính phiên mã gen nội sinh (Lần Dung môi)

		PSA	SLUG	TMPRSS2	STEAP4	FKBP5	ORM1	NOV
LNCaP	DMSO	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	R1881	++	+++	++	++++	++	+++	--
	Bicalutamid	+	+	+	+	+	-	+
	MDV3100	+	+	+	-	+	+	+
LNCaP/AR(cs)	DMSO	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	R1881	+++	+++	++	++++	++	++++	--
	Bicalutamid	++	+	+	++	+	+++	+
	MDV3100	+	+	+	+	+	+	+
Loại 1	DMSO	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	R1881	++	+++	+	++++	+++	++++	--
	Bicalutamid	+	+++	+	+++	++	++	+
	MDV3100	+	+	+	+	+	+	+
Loại 2	DMSO	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
	R1881	+++	+++	++	++++	+++	++++	--

Bicalutamid	+	+	+	+	+	+	+
MDV3100	+++	+++	++	+++	++	+++	-

[R1881] = 10nM, [Chất đối kháng] = 30 μ M

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

Bảng 3B: Trình tự Oligonucleotit PCR thời gian thực phiên mã		
Gen	Trình tự mỗi chuyển tiếp	Trình tự mỗi ngược
AMIGO2	AGAGACTCAGAGGCGACCAT (SEQ ID NO: 20)	ATCAGCAAACACAGCAGCTC (SEQ ID NO: 21)
BDNF	AGAGCTGTTGGATGAGGACCAGAA (SEQ ID NO: 22)	AGGCTCCAAAGGCACTTGACTACT (SEQ ID NO: 23)
CAMK2N1	GACCAAGCGGGTTGTTATTGA (SEQ ID NO: 24)	TGCCTTGTCGGTCATATTTTCA (SEQ ID NO: 25)
FKBP5	CGGAGAACCAAACGGAAAGG (SEQ ID NO: 26)	CTTCGCCCACAGTGAATGC (SEQ ID NO: 27)
HPGD	ACAGCAGCCGGTTTATTGTGCTTC (SEQ ID NO: 28)	TGGCATTCACTCTCACACCACTGT (SEQ ID NO: 29)
NCAPD3	ACCACTCACCATCATCTCAAGGCA (SEQ ID NO: 30)	TGCTCTTCTTTGCCAGATCCTCGT (SEQ ID NO: 31)
NOV	GCCTTACCCTTGCACTTAC (SEQ ID NO: 32)	GAGCATGCTGTCCACTCTGT (SEQ ID NO: 33)
ORM1	CTTGCGCATTCCTCAAGTCAGATGT (SEQ ID NO: 34)	TTTCTCTCCTTCTCGTGCTGCTT (SEQ ID NO: 35)
PLD1	GAGCCTGCTACAGATGGTCA (SEQ ID NO: 36)	TGTCTACCAGCAGGACGAAG (SEQ ID NO: 37)
PSA	CCTCTGAAGAATCGATTCC (SEQ ID NO: 38)	GAGGTCCACACACTGAAGTT (SEQ ID NO: 39)
SLUG	TTTCTGGGCTGGCCAAACATAAGC (SEQ ID NO: 40)	ACACAAGGTAATGTGTGGGTCCGA (SEQ ID NO: 41)
STEAP4	CGGCAGGTGTTGTGTGTGGAAT (SEQ ID NO: 42)	AGAAGACACACAGCACAGCAGACA (SEQ ID NO: 43)
TMPRSS2	TAGTGAAACAGTGTGTCTGCCCA (SEQ ID NO: 44)	AGCGTTCAGCACTTCTGAGGTCTT (SEQ ID NO: 45)
FASN	CGCTCTGGTTCATCTGCTCTG (SEQ ID NO: 46)	TCATCAAAGGTGCTCTCGTCTG (SEQ ID NO: 47)
NKX3,1	TGGAGAGGAAGTTCAGCCATCAGA (SEQ ID NO: 48)	AGGAGAGCTGCTTCGCTTAGTCT (SEQ ID NO: 49)

Theo thử nghiệm riêng biệt, biểu hiện gen của các gen sau đây được phân tích trong Các tế bào LNCaP, LNCaP/AR(cs), LNCaP/AR-Luc, LNCaP ARN-509r1, LNCaP ARN-509r2 và LNCaP/AR-Luc ENZr2: PLD, CAM2KN, NOV, BDNF, AMIGO2, FASN, TMPRSS2, NKX3,1, PSA, FKBP5, HPGD, NCAPD3, SLUG, STEAP4, và ORM. Các tế bào được nuôi cấy trong 3 ngày trong môi trường nghèo hormone tiếp theo là điều trị bằng dung môi, 1nM R1881 hoặc 30 μ M hợp chất. Biểu

hiện gen bình thường với GAPDH như được mô tả nêu trên. Kết quả được trình bày trong bảng 4A và 4B.

Bảng 4A. Phiên mã LNCaP. LNCaP/AR(cs) và dòng kháng

Gen	LNCaP				LNCaP/AR(cs)				LNCaP ARN-509r1			
	Dung môi	ARN-509	ENZ	R1881	Dung môi	ARN-509	ENZ	R1881	Dung môi	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
Gen	LNCaP				LNCaP ARN-509r2							
	Dung môi	ARN-509	ENZ	R1881	Dung môi	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

Bảng 4B. Phiên mã LNCaP/AR-Luc và LNCaP/AR-Luc ENZr2

Gen	LNCaP/AR-Luc				LNCaP/AR-Luc ENZr2			
	Dung môi	ARN-509	ENZ	R1881	Dung môi	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

Ví dụ 6: Các thử nghiệm cho cơ chế kháng

Chuỗi CGH, mARN biểu hiện tạo dạng và phân tích trình tự bệnh nhân có nguồn gốc ung thư tiền liệt tuyến khối cũng như nhiều mô hình chuột và trong ống nghiệm có nhiều con đường được kéo theo sự tiến triển đối với tình trạng kháng cắt. Ba trong số những con đường được hoạt hóa phổ biến nhất được tăng cường trong ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt là các con đường PI3K, Raf và AR. Theo ví dụ này, Akt và Erk phosphoryl hóa đã được đánh giá bằng Western blot để đánh giá trạng thái hoạt tính của con đường PI3K và Raf tương ứng.

Đánh giá kiểu thuốc kháng trong dòng tế bào loại 1 và loại 2, Phân tích western đã được thực hiện để đánh giá mức độ protein AR và trạng thái hoạt tính của một số đường tín hiệu tế bào đã biết để điều biến hoạt tính AR và thường được hoạt hóa trong ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt. Biểu hiện tương đối của AR, Akt, Akt được phosphoryl hóa (Ser473), p44/42 MAPK (Erk1/2), p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) được phosphoryl hóa, tubulin và actin được xác định.

Đối với phân tích Western, các tế bào được phát triển trong RPMI 1640 được bổ sung với 5% huyết thanh trơ với than trong 3 ngày. Các tế bào được dung giải trong chất đệm tạo cặn miễn dịch phóng xạ bị biến đổi (mRIPA; 10 mM Tris, 150 mM NaCl, 1% (v/v) NP-40, 0,5% deoxycholat, 0,1% SDS, 5 mM EDTA, pH 7,4) chứa Halt™ Proteaza và dung dịch hỗn hợp thuốc chất ức chế photphatase (kỹ thuật nhiệt). Protein tổng của dịch thủy phân được làm sạch được định lượng bằng thử nghiệm Lowry (thử nghiệm protein Biorad DC). Mẫu chất đệm NuPAGE® LDS và mẫu chất khử được bổ sung vào dịch thủy phân và được đun nóng đến 70°C trong 10 phút. 20µg của protein tổng được tách ở NuPAGE 4-12% Bis Tris Acrylamit Gel và được chuyển vào màng nitrocellulose bằng cách sử dụng mô đun Xcell II™ blot (Invitrogen). Màng được ủ trong Blocking Chất đệm (LI-COR, Lincoln, NE) trong 30 phút ở nhiệt độ phòng, tiếp theo là ủ 60 phút với kháng thể gốc chống lại thụ thể androgen (Santa Cruz Biotechnology cat. No. SC-816), Akt và Phospho-Akt (Ser473) (Cell Signaling cat. Nos. 9272 và 4058 respectively), p44/42 MAPK (Erk1/2) và Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling cat. Nos. 4695 và 4376s respectively) và tubulin hoặc actin (Sigma cat. No T6199 và A4700 Respectively). Sau khi ủ bằng IRDye® Được kết hợp Dê chống Chuột hoặc Thỏ IgG (LI-COR), dải protein được định lượng bằng cách sử dụng hệ thống tạo ảnh Odyssey® Infrỏ.

Bằng western blot, các mức AR trong dòng tế bào kháng loại 1 khoảng 2 đến 4-lần cao hơn so với quan sát trong dòng tế bào LNCaP/AR(cs) (Fig.2). Tương tự to an tăng xấp xỉ 3-lần trong các mức AR là đủ để hỗ trợ sự phát triển tế bào LNCaP theo sự điều chỉnh cắt *trong cơ thể*, còn nâng cao từ 2 đến 4-lần trong các mức AR có thể đủ để đẩy mạnh sự tăng sinh trong sự vắng mặt của các androgen trong ống nghiệm. Ngược lại, các mức AR của dòng kháng loại 2 cũng tương tự như được quan sát trong dòng tế bào bố mẹ. Do đó, chuyển hóa enzalutamid và ARN-509 vào một phần chất chủ vận ở dòng tế bào loại 2 không phải do AR quá mức. Sự khác biệt nhỏ trong tổng số và Akt được photphoryl hóa và Erk được quát sát thấy không có thay đổi thích hợp nhìn thấy trong bất kỳ các loại của dòng tế bào kháng.

Ví dụ 7: Xác định trình tự AR biến thể

MDV3100 và ARN-509 là phiên mã và chất chủ vận tăng sinh ở dòng tế bào kháng loại 2, trong khi bicalutamid vẫn còn chất đối kháng. Biểu hiện AR trong tế bào kháng loại 2 tương tự với dòng tế bào bố mẹ (ví dụ, 6). Do đó, trình tự AR trong tế bào kháng loại 2 được xác định để xác định liệu sự biến thể trong miền phối tử gắn kết AR thúc đẩy tăng cường chức năng hoạt tính.

cADN được tạo ra bằng phiên mã ngược của ARN được phân lập từ các tế bào loại 1 và loại 2 (xem ví dụ 5) được sử dụng như mẫu vào trình tự AR. Sử dụng chuỗi oligonucleotit, các phân đoạn chồng chéo bao quanh miền phối tử gắn kết AR (c.2013-2757) được tạo ra bởi PCR bằng cách sử dụng Phusion® polymeraza (New England Biolabs) sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các sản phẩm PCR là gen được tinh sạch để loại bỏ không phải dải đặc hiệu cũng như chưa được gộp vào oligonucleotit. Các sản phẩm PCR được tinh sạch được căn chỉnh theo trình tự sử dụng oligonucleotit bên trong.

Axit nucleic đơn biến thể được xác định trong miền phối tử gắn kết AR ở vị trí nucleotit 2626 trong ba dòng tế bào có nguồn gốc độc lập. Biến thể sai nghĩa được xác định trong tất cả các dòng là Thymin (t) vào xytozin (C) chuyển hóa Phenylalanin (F) ở vị trí axit amin 876 của polypeptit được mã hóa vào Leuxin (L) (SEQ ID NO: 19). Ngoài ra, trình tự Các sản phẩm PCR được tách dòng phụ riêng biệt từ dòng tế bào LNCaP/AR-Luc ENZr2 chỉ ra rằng trong tất cả dòng tế bào này sinh biến thể F876L trong gen AR nội sinh.

F876 nằm trong vòng xoắn 11 trong phạm vi lỗ gắn kết phối tử AR đó là điểm nóng cho biến thể CRPC AR (Fig.1D). Tuy nhiên, không giống T877 và L701, mà liên kết phối trí hydro với nhóm 17α -OH của dihydrotestosteron, F876 góp phần vào lõi kỵ nước nhỏ được tạo thành bởi phần dư trong vòng xoắn 11 (F786, L880), vòng lặp giữa vòng xoắn 11 và 12 (F891) và vòng xoắn 3 (F697, L701). Trong khi phần dư và sự tương tác phối tử kỵ nước tương tự được chuyển hóa trong thụ thể estrogen và progesteron, F876 không kéo theo trong gắn kết ái lực cao hoặc chọn lọc steroid. Phù hợp với vai trò nhỏ tương đối F876 được dự đoán hoạt động trong gắn kết steroid, AR biến thể-F876L không được báo cáo trong bệnh ung thư tiền liệt tuyến hoặc các quần thể không nhạy với androgen.

Ví dụ 8: Biểu hiện AR biến thể trong các tế bào thiếu AR

Để xác nhận rằng các biến thể F876L tạo ra hoạt tính chất chủ vận với ARN-509 và MDV3100, điểm biến thể được tạo ra trong trường hợp toàn bộ chiều dài AR kiểu dại và thụ thể biến thể LNCaP T877A. Biến thể F876L và F876L/T877A được tạo ra trong pcADN3-AR plasmid bằng cách sử dụng Kit QuickChange II Site-Directed MutaGensis (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các thử nghiệm chỉ thị phiên mã bằng cách sử dụng yếu tố đáp ứng ARE hoạt động liên kết với gen chỉ thị được thực hiện để thử nghiệm hoạt tính phiên mã của AR biến thể theo đáp ứng với ARN-509, MDV3100 và điều trị bicalutamit.

Các thử nghiệm chỉ thị phiên mã được thực hiện bằng cách tạo mầm 100 μ L của các tế bào HEPG2 ở mật độ khoảng 250,000 tế bào/mL vào đĩa nuôi cấy tế bào 96-giếng trong MEM được bổ sung với 10% huyết thanh trơ với than và được phép gắn qua đêm ở 37°C.

Được chuyển nạp thoáng qua bằng cách sử dụng Lipofectin® (Life Technologies) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Ba lần chuyển nạp được thực hiện bằng cách sử dụng vector chỉ thị 378 ng (4X ARE-Luxiferaza hoặc pGL4 Pb-Luxiferaza (probasin ở chuột hoạt hóa trong pGL4 (Promega, Madison, WI)), 50 ng pcADN-AR (kiểu dại hoặc biến thể) 50 ng pRL-CMV (sự chuẩn hóa vector) và 0,7 μ L Lipofectin®. Sau khi chuyển nạp, các tế bào được ủ trong 4 giờ.

Sau khi ủ, các tế bào được điều trị bằng các hợp chất thử nghiệm ARN-509, MDV3100 và bicalutamit. Đối với các thử nghiệm chất chủ vận, các hợp chất được

pha loãng 1:6 và 50 μ L hợp chất trong MEM dương 5% FBS tro với than được bổ sung vào các tế bào cho nồng độ cuối nằm trong khoảng từ 30 μ M đến 0,64nM. Đối với các thử nghiệm chất đối kháng, các hợp chất được pha loãng tuần tự với 1nM R1881 (dùng cho AR kiểu đại) hoặc 5nM R1881 (dùng cho F876L AR).

Sau 48 giờ ủ môi trường được loại bỏ và các tế bào được dung giải trong 40 μ L dịch trích (25 mM Tris Photphat, 2 mM CDTA, 10% Glyxerol, 0,5% Triton X-100, 2 mM DTT). Hoạt tính luxiferaza ở đom đóm được đo ngay lập tức sau khi bổ sung 40 μ L dịch trích luxiferaza (20 mM tricin, 0,1 mM EDTA, 1,07 mM (MgCo₃)₄ Mg(OH)₂•5H₂O, 2,67 mM MgSO₄, 33,3 mM DTT, 270 μ M Coenzym A, 470 μ M luciferin, 530 μ M ATP). *Renilla* luxiferaza được đo sau khi bổ sung 40 μ L dịch đậm coelenterazin (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 coelenterazin, điều chỉnh độ pH cuối đến 5,0).

Đối với các thử nghiệm chuyển nạp thoáng qua, chất đối kháng AR thế hệ thứ hai ARN-509 và MDV3100 gây ra hoạt tính phiên mã phụ thuộc AR trong trường hợp của Biến thể AR F876L hoặc F876L/T877A, trong khi cảm ứng từ bicalutamit là minimal (Bảng 5). Ví dụ, trong các tế bào HEPG2 sử dụng chỉ thị 4XARE-luxiferaza hoặc Pb-luxiferaza, ARN-509 và MDV3100, nhưng không phải là bicalutamit, gây ra hoạt tính phiên mã phụ thuộc AR trong trường hợp của Biến thể AR F876L hoặc F876L/T877A. Điều này chỉ ra rằng, cơ chế kháng ở dòng tế bào loại 2 là Biến thể AR F876L.

Bảng 5. Hoạt tính phiên mã AR (DMSO Lần)

	R1881	Bicalutamit	MDV3100 (enzalutamit)	ARN509
AR WT	+++	+	+	+
AR F876L	+++	+	++	++

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

200

[R1881] = 100nM, [Chất đối kháng] = 6,3 μ M

Thử nghiệm thứ hai đã được thực hiện báo cáo 4X-ARE-Lucifereaza để xác nhận các kết quả nêu trên. Theo thử nghiệm này, nilutamit và hydroxyflutamit kháng

androgen thể hệ thứ nhất cũng được so sánh cùng với bicalutamid, ARN-509 và enzalutamid. Các thử nghiệm chỉ thị phiên mã AR về cơ bản được thực hiện như được mô tả nêu trên với những biến đổi nhỏ. Ba lần chuyển nạp được thực hiện bằng cách sử dụng 50 ng biến thể pCADN3-AR hoặc pCADN3-AR, 65 ng 4X ARE-Luxiferaza, 20 ng pRL (Promega), và 25 ng pCMX. Đối với các thử nghiệm chất chủ vận, các hợp chất được pha loãng tuần tự, và 50 μ L hợp chất dương RPMI 1640 được bổ sung với huyết thanh trợ với than được bổ sung vào các tế bào. Đối với các thử nghiệm chất đối kháng, các hợp chất được pha loãng tuần tự, và 50 μ L hợp chất với RPMI được bổ sung với huyết thanh trợ với than dương methyltrienolon (R1881) được bổ sung vào các tế bào. Nồng độ R1881 cuối được sử dụng trong các thử nghiệm chất đối kháng là 1nM với ngoại trừ của F876L mà sử dụng 5nM R1881.

Như được thể hiện trong Fig.4, trong trường hợp của AR kiểu đại, ARN-509 và enzalutamid là toàn bộ chất đối kháng và với hoạt tính chất chủ vận minimal trong các thử nghiệm chỉ thị phiên mã đáp ứng androgen 4X-ARE. Tuy nhiên, trong các tế bào biểu hiện AR-F876L hoặc AR F876L/T877A, enzalutamid và ARN-509 là một phần chất chủ vận phiên mã (Fig.4A). Ngược lại, bicalutamid, nilutamid và hydroxyflutamid kháng androgen thể hệ thứ nhất thể hiện hoạt tính chất chủ vận minimal trên biến thể F876L (Bảng 6, Fig.4) (E_{max} = phần trăm tối đa đáp ứng R1881). Enzalutamid và ARN-509 là toàn bộ chất đối kháng trên T877A, L701H, H874Y và W741C AR biến thể mà kháng với chất đối kháng AR thể hệ thứ nhất hoặc mở rộng phối tử steroidal đặc hiệu với bệnh nhân CRPC.

Bảng 6.

Hợp chất	Thử nghiệm chỉ thị 4X ARE				
	WT IC ₅₀ ($\square$ M)	WT E _{max}	F876L IC ₅₀ ($\square$ M)	F876L E _{max}	
ARN-509	0,79 $\pm$ 0,15	1,3 $\pm$ 0,3	0,09 $\pm$ 0,06	49,7 $\pm$ 11,1	
Enzalutamid	1,12 $\pm$ 0,17	0,4 $\pm$ 0,1	0,13 $\pm$ 0,04	20,2 $\pm$ 5,2	
Bicalutamid	1,65 $\pm$ 0,93	10,0 $\pm$ 2,9	3,63 $\pm$ 0,04	0,7 $\pm$ 0,3	
Hydroxyflutamid	0,36 $\pm$ 0,04	28,9 $\pm$ 5,0	2,60 $\pm$ 6,61	0,8 $\pm$ 0,2	
Nilutamid	1,11 $\pm$ 0,17	5,1 $\pm$ 2,1	7,59 $\pm$ 1,18	0,6 $\pm$ 0,1	

Để thử nghiệm Khả năng gắn kết ADN của cấu trúc liên hợp VP16-Biến thể AR F876L được tạo ra. pVP16-AR được tạo ra bằng cách tạo dòng phụ toàn bộ chiều dài AR ở người vào pVP16 (Clontech). Điểm AR biến thể được tạo ra trong VP16-AR bằng cách sử dụng Kit QuickChange II Site-Directed MutaGensis (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Các thử nghiệm phiên mã về cơ bản được thực hiện như được mô tả nêu trên. Ba lần chuyển nạp được thực hiện bằng cách sử dụng 35 ng pVP16-AR hoặc pVP16-F876L, 70 ng 4X ARE-Luxiferaza, 20 ng pRL (Promega), và 35 ng pCMX. Hoạt tính chỉ thị 4X ARE-luxiferaza được theo dõi trong sự có mặt của hợp chất làm tăng nồng độ trong sự vắng mặt hoặc có mặt của 90pM R1881 (dùng cho VP16-AR kiểu đại) hoặc 1nM R1881 (dùng cho F876L VP16-AR). Hoạt tính luxiferaza được đo như được mô tả nêu trên.

Reflective of chỉ thị phiên mã thử nghiệm, trong thử nghiệm VP16-AR kiểu đại, which monitors khả năng gắn kết ADN của thụ thể, enzalutamid và ARN-509 là toàn bộ chất đối kháng (Bảng 7, Fig.4) (E_{max} = phần trăm tối đa đáp ứng R1881). Tuy nhiên, trong trường hợp của VP16-AR-F876L, ARN-509 và enzalutamid kích thích gắn kết ADN AR. Do đó, biến thể từ AR F876 đến L là đủ để chuyển thành kháng androgen thể hệ 2nd, enzalutamid và ARN-509, vào một phần chất chủ vận.

Bảng 7.

	AR-VP16			
Hợp chất	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
Enzalutamit	0,21 ± 0,07	2,65 ± 0,73	0,05 ± 0,01	34,32 ± 5,38
Bicalutamit	0,18 ± 0,10	32,77 ± 5.76	2,51 ± 1,11	2,20 ± 1,35
Hydroxyflutamit	0,03 ± 0,01	42,28 ± 4,44	0,97 ± 0,27	5,36 ± 5,35
Nilutamit	0,13 ± 0,08	33,53 ± 9,75	2,12 ± 0,68	2,90 ± 1,80

Ví dụ 9: Tạo ra dòng tế bào ổn định

Theo ví dụ này, dòng tế bào được tạo ra với biểu hiện ổn định của Biến thể AR F876L. Các retrovirus pSR α F876L, pQCXIN-AR và pQCXIN-F876L được tạo ra

đầu tiên bởi tế bào GP2-293 đồng chuyển nạp với pVSV-G (Clontech) theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Tế bào PC3 biểu hiện ổn định kiểu đại hoặc AR-F876L được tạo ra bởi tế bào PC3 truyền chất với retrovirus pQXIN-AR hoặc pQXIN-F876L và chọn lọc trong môi trường RPMI 1640 chứa 500µg/mL gentamycin.

AR-F876L biểu hiện ổn định tế bào LNCaP được tạo ra bởi các tế bào LNCaP chuyển nạp với pCADN-F876L hoặc tế bào LNCaP truyền chất với retrovirus SRαF876L. Dòng vô tính riêng biệt của LNCaP/pCADN-F876L được phân lập sau khi chọn trong 400µg/mL gentamycin. Tổ hợp tế bào LNCaP/SRαF876L lựa chọn 400 mg/mL gentamycin.

Biểu hiện protein AR của tất cả dòng tế bào đã được xác nhận bằng phân tích western sử dụng kháng thể AR N-20 (Santa Cruz Biotechnology).

Ví dụ 10: Thử nghiệm gắn kết AR cân bằng

Các thử nghiệm gắn kết cạnh tranh của AR kiểu đại với F876L AR được thực hiện như được mô tả trong Clegg et al. (2012) *Cancer Research* 72:1494-503 bằng cách sử dụng tế bào PC3 này biểu hiện ổn định kiểu đại AR hoặc AR-F876L ở người như được mô tả nêu trên. Ki được tính là $K_i = IC_{50} / (1 + ([^3H-R1881]/K_d))$, $[^3H-R1881] = 0,6nM$.

Theo thử nghiệm gắn kết AR cân bằng, ARN-509 và enzalutamit liên kết các biến thể với ái lực cao 30 và 48 lần, tương ứng (Bảng 8, Fig.5) (K_d for R1881: AR = 0,5nM; AR-F877L = 0,64nM). Do đó, làm tăng hoạt tính chất chủ vận trên AR kết hợp với làm tăng gắn kết ái lực với cả kiểu đại và thụ thể F876L, cho thấy rằng xác nhận chất chủ vận cho phép ái lực cao thông qua việc làm giảm hằng số phân ly.

Bảng 8.

Hợp chất	Gắn kết AR, WT K_i (nM)	Gắn kết AR, F876L K_i (nM)
ARN-509	18,07 ± 7,46	0,68 ± 0,15
Enzalutamit	26,30 ± 12,77	0,60 ± 0,17
Bicalutamit	26,56 ± 12,51	360,36 ± 283,85
Hydroxyflutamit	14,56 ± 8,25	150,57 ± 55,10
Nilutamit	17,74 ± 5,65	197,42 ± 9,26

Ví dụ 11: Biểu hiện của gen đích AR và sự tăng sinh của dòng tế bào ung thư tiền liệt tuyến ổn định F876L

Như được thể hiện nêu trên, biểu hiện của AR-F876L là đủ để tạo kháng enzalutamit và ARN-509 trong các thử nghiệm dựa trên chỉ thị thoát qua. Theo ví dụ này, hiệu quả của F876L ở gen đích AR nội sinh và sự tăng sinh trong tế bào ung thư tiền liệt tuyến biểu hiện ổn định biến thể đã được kiểm tra. Hai dòng tế bào LNCaP (LNCaP/SR α F876L và LNCaP/pCADNF876L) được thiết kế như được mô tả trong ví dụ 9 đến AR-F876L vượt quá biểu hiện ở mức tương đương với mô hình LNCaP/AR(cs).

Để đo mức độ AR trong tế bào, dịch chiết protein được tạo ra từ các tế bào LNCaP, LNCaP/AR(cs), LNCaP/SR α F876L và LNCaP/pCADNF876L được nuôi cấy trong môi trường nghèo hormone trong 3 ngày. Mức độ protein AR được phân tích bằng western blot. Mức độ AR được định lượng và được chuẩn hóa với actin và được biểu hiện liên quan đến biểu hiện AR trong tế bào LNCaP (Fig.6)

Đối với phân tích gen đích nội sinh, các tế bào LNCaP/AR(cs), LNCaP SR α F876L, và LNCaP/pCADNF876L được nuôi cấy trong 3 ngày trong môi trường nghèo hormone tiếp theo là điều trị bằng dung môi, 1nM R1881 hoặc 1, 3, 10 và 30 μ M ARN-509 hoặc enzalutamit trong sự có mặt hoặc có mặt trên 1nM R1881.

Đối với thử nghiệm tăng sinh, các tế bào LNCaP/AR(cs), LNCaP SR α F876L, và LNCaP/pCADNF876L được nuôi cấy trong sự có mặt của môi trường nghèo hormone trong 2 ngày tiếp theo là điều trị phối từ trong 7 ngày như được mô tả nêu trên. Đối với các thử nghiệm chất đối kháng, ARN-509 hoặc enzalutamit được bổ sung trong sự có mặt của 200pM R1881 (100pM nồng độ cuối). Sự tăng sinh được định lượng bằng thử nghiệm khả năng sống được dựa trên sự phát quang CellTiter-Glo như được mô tả nêu trên.

Trong các tế bào LNCaP/AR(cs), ARN-509 và enzalutamit ảnh hưởng ít đến sự cảm ứng của Gen đích AR hoặc hoạt tính tăng sinh (Fig.7A, Bảng 9A). Cả phiên mã và tăng sinh cảm ứng R1881 được chặn chất đối kháng đến mức độ phù hợp với hoạt tính chất chủ vận của chúng ở nồng độ cao (Fig.7B, Bảng 9B). Ngược lại, trong các tế bào biểu hiện F876L-AR, cả enzalutamit và ARN-509 biểu hiện hoạt tính phiên mã và chất chủ vận tăng sinh mạnh (Figs. 7A và 7B, Bảng 9C-F).

Bảng 9A. Chất chủ vận phiên mã LNCaP/AR(cs)

			- R1881									
			Enzalutamid					ARN-509				
Gen	Dung môi	1nM R1881	0,3µM	1µM	3µM	10µM	30µM	0,3µM	1µM	3µM	10µM	30µM
AMIGO2	1,00	0,98	0,68	0,61	0,62	0,66	1,22	1,14	0,69	0,89	0,65	2,41
BDNF	1,00	0,86	1,04	0,92	0,88	0,95	0,98	1,15	0,93	1,03	1,03	1,80
CAM2KN1	1,00	0,04	0,80	0,70	0,71	0,64	0,64	0,90	0,76	0,99	0,78	1,56
FASN	1,00	4,12	0,47	0,32	0,29	0,31	0,58	0,46	0,40	0,42	0,41	1,30
FKBP5	1,00	100,51	0,91	0,62	0,75	0,61	0,85	0,99	0,71	0,91	0,75	1,87
HPGD	1,00	324,60	0,74	0,57	0,61	0,63	1,29	0,81	0,56	0,78	0,61	1,86
NCAPD3	1,00	95,54	0,66	0,57	0,47	0,56	0,79	0,72	0,74	0,73	0,74	1,34
NKX3,1	1,00	12,72	0,71	0,52	0,51	0,86	1,63	1,11	0,68	0,73	0,85	2,24
NOV	1,00	0,05	1,12	0,91	0,80	1,02	1,01	1,12	1,00	1,11	0,98	2,07
ORM1	1,00	6987,01	0,92	0,90	1,06	0,71	2,02	1,37	1,79	1,20	0,97	1,35
PLD1	1,00	0,03	0,77	0,62	0,63	0,56	0,56	1,28	0,66	0,88	0,65	1,33
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

Bảng 9B. Phiên mã chất đối kháng LNCaP/AR(cs)

			+ 1nM R1881									
			Enzalutamid					ARN-509				
Gen	Dung môi	1nM R1881	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

Bảng 9C. Phiên mã chất chủ vận LNCaP/SRαF876L

			- R1881									
			Enzalutamid					ARN-509				
Gen	Dung môi	1nM R1881	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

Bảng 9D. Phiên mã chất đối kháng LNCaP/SRαF876L

			+ 1nM R1881									
			Enzalutamid					ARN-509				
Gen	Dung môi	1nM R1881	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

Bảng 9E. Chất chủ vận phiên mã LNCaP/pCADNF876L

			- R1881									
			Enzalutamid					ARN-509				
Gen	Dung môi	1nM R1881	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

Bảng 9F. Phiên mã chất đối kháng LNCaP/pCADNF876L

Gen	Dung môi	1nM R1881	+ 1nM R1881									
			Enzalutamid					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
TMPPRS2	1,00	26,85	19,03	16,05	8,14	8,92	15,32	12,13	15,75	14,19	12,99	12,67

Ví dụ 12: Tương tác của biểu hiện N và C của gen đích AR và sự tăng sinh của dòng tế bào ung thư tiền liệt tuyến ổn định F876L

Tương tác của phần cuối amin AR với Phần cuối cacboxy AR là quan trọng cho toàn bộ dung lượng tiến hành AR. Nhiều AR toàn bộ và một phần chất chủ vận kích thích tương tác N-C phụ thuộc AF2. Thử nghiệm tương tác hybrid hai N-C đã được thực hiện để đánh giá sự tương tác của AR N- và C-phần cuối trong biến thể F87L trong sự có mặt của ARN-509 và enzalutamid.

pM-AR1-660, pVP16-AR507-919 và pVP16-F876L507-919 được tạo ra bằng cách tái tạo các sản phẩm PCR thích hợp từ pCADN3-AR và pCADN3-F876L thành pM và pVP16 (Clontech). Đối với thử nghiệm tương tác đầu N-C, ba lần chuyển nạp được thực hiện bằng cách sử dụng 50 ngpM-AR1-660, 75 ng pVP16-AR507-919 hoặc pVP16-F876L507-919, 25 ngpMH100-Luc và 10 ng pRL (Promega). Các tế bào được chuyển nhiễm được ủ 4 giờ sau khi được điều trị với phối tử. ARN-509 và enzalutamid được thử nghiệm ở 8µM và R1881 ở 1nM.

Phù hợp với hoạt tính phiên mã của chúng, enzalutamid và ARN-509 được hoạt hóa tương tác N-C của AR-F876L nhưng không phải AR kiểu đại (Fig.8). Do đó, hoạt tính chất chủ vận của ARN-509 và enzalutamid trên AF-F876L là kết hợp với dạng AF-2 giống chất chủ vận.

Ví dụ 13: Thử nghiệm tạo căn miễn dịch nhiễm sắc thể của AR

Hoạt tính phiên mã của gen đích AR được điều chỉnh androgen yêu cầu chất chủ vận-gây ra gắn kết ADN và bổ sung tiếp theo của các coregulator phiên mã. Để xác nhận các kết quả chỉ thị VP16-AR chỉ ra ARN-509 và enzalutamid kích thích AR-F876L ADN gắn kết, được thực hiện phân tích tạo căn miễn dịch nhiễm sắc thể (ChIP) của 6 gen đích AR từ các tế bào được điều trị với R1881 và/hoặc mỗi chất đối kháng đã được thực hiện.

Các thử nghiệm ChIP được thực hiện như được mô tả trong Joseph et al. (2009) PNAS USA 106:12178-83]. Briefly, các tế bào LNCaP/AR(cs) và LNCaP SRαF876L được đặt trong đĩa 150 mm (7×10^6 cells in 20 mL) trong RPMI 1640 được bổ sung với 10% CSS trong 3 ngày. Các tế bào được điều trị với chất đối kháng 10μM trong có mặt hoặc vắng mặt của 1nM R1881 trong 4 giờ. Điều trị phối từ sau đây, fomandehyt được bổ sung vào môi trường với nồng độ cuối khoảng 1%, được ủ trong 10 phút và được tời với glyxin (125 mM nồng độ cuối) trong 5 phút. Các tế bào được rửa 3X bằng PBS chứa 1X Halt™ Proteaza và Photphataza chỉ sử dụng dung dịch chất ức chế (1X PI, Kỹ thuật nhiệt), dạng viên, được dung giải trong 1 mL chất đệm RIPA (50 mM Tris pH7,5, 0,15 M NaCl, 1% NP-40, 0,5% Na-deoxycholat, 0,05% SDS, 1 mM EDTA, 1X PI) và được nghiền bằng sóng âm cho đến khi kích cỡ đoạn ADN trung bình khoảng ≈500 bp. Các nhiễm sắc thể liên kết ngang được nghiền bằng sóng âm được pha loãng thành 3,3 mL RIPA và được lọc với 100 mL 50% protein A/G agaroza bột nhào (SC-2003, Santa Cruz Biotechnology) chứa 200 mg trên mL ADN tinh trùng cá hồi được nghiền bằng sóng và 500 mg trên mL của BSA. Một mL nhiễm sắc thể được lọc sau đó được tạo căn miễn dịch với 15μg kháng AR (SC-816, Santa Cruz Biotechnology) hoặc IgG thông thường (SC-2027, Santa Cruz Biotechnology), trong 2 giờ ở 4°C và 100 mL của 50% bột nhào của protein A/G agaroza các hạt được bổ sung và được ủ qua đêm ở 4°C. Các hạt được rửa 2 lần liên tục chất đệm muối thấp (50 mM HEPES pH 7,8, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 0,1% Na-deoxycholat, 0,1% SDS),

chất đệm muối cao (giống muối thấp với 500 mM NaCl), chất đệm LiCl (20 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA, 250 mM LiCl, 0,5% NP-40, 0,5% Na-deoxycholat), và chất đệm TE (50 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA). Tất cả các bước rửa được thực hiện trong sự có mặt của 1X PI. Phức protein-ADN được tách rửa trong 225 mL chất đệm rửa giải (50 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA, 1% SDS) ở 65°C gấp đôi trong 15 phút. Phức protein-ADN được tách rửa ngược với liên kết ngang trong sự có mặt của NaCl qua đêm ở 65°C và còn được xử lý với EDTA và proteinaza K ở 42°C trong 1 giờ. Đoạn ADN được tinh sạch trong 10 mM Tris pH 8,5 bằng cách sử dụng kit lọc QIAquick PCR (Qiagen), được pha loãng và được phân tích bằng thời gian thực PCR sử dụng iTaq SYBR Green Supermix với ROX (Bio-Rad). Mẫu được khuếch đại trên dụng cụ ABI 7900HT. Trình tự mỗi oligonucleotit được liệt kê trong bảng 8.

Bảng 8. Trình tự oligonucleotit thời gian thực PCR ChIP		
Gen	Trình tự mỗi được chuyển tiếp	Trình tự mỗi ngược
PSA E2	ACCTGCTCAGCCTTTGTCTCTGAT (SEQ ID NO: 50)	AGATCCAGGCTTGCTTACTGTCCT (SEQ ID NO: 51)
PSA D1	ATTCTGGGTGTTGGGAGTGCAAGGAA (SEQ ID NO: 52)	AGGAGACATGCCCAGGATGAAACA (SEQ ID NO: 53)
STEAP4	ACTAGGCAGGACATTGACATCCCA (SEQ ID NO: 54)	ACAGTAAACCTCTCCACACATGGC (SEQ ID NO: 55)
FASN	TATGACACCCAGGGCTTTTCGTTC (SEQ ID NO: 56)	TAACGTTCCCTGCGCGTTTACAGA (SEQ ID NO: 57)
TMPRSS2	TCCCAAATCCTGACCCCA (SEQ ID NO: 58)	ACCACACAGCCCCCTAGGAGA (SEQ ID NO: 59)
NKX3,1	ACAGGGTGGCCCAAATAGAAC (SEQ ID NO: 60)	CCTGTCTTGGACAAGCGGAGA (SEQ ID NO: 61)
ORM1	GGGTCATTTCACACCTCAAACA (SEQ ID NO: 62)	GGAGAAAGGCCTTACAGTAGTCTC (SEQ ID NO: 63)

Trong các tế bào LNCaP/AR(cs), R1881 được hoạt hóa AR ADN (Fig.9). Phù hợp với dữ liệu chỉ thị VP16-AR, cả ARN-509 và enzalutamid được hoạt hóa các tế bào LNCaP/SR α F876L gắn kết AR ADN. Trong sự có mặt của R1881, tất cả chất đối kháng ức chế kích thích R1881 gắn kết ADN AR đến mức độ phù hợp với một phần chất chủ vận của chúng hoặc hoạt tính chất đối kháng trong cả dòng tế bào (bổ sung Fig.S9).

Ví dụ 14: Hiệu quả trong cơ thể của AR F876L

Để xác định liệu các thay đổi F876L truyền tải kháng vào enzalutamit và ARN-509 trong cơ thể, F876L AR biểu hiện ổn định dòng tế bào LNCaP được tiêm (s.c.) vào chuột thiếu miễn dịch được cắt và khối u được thiết lập.

Tất cả nghiên cứu về động vật được thực hiện theo phác đồ được chấp nhận bởi cơ quan chăm sóc động vật và Ủy ban sử dụng và cơ quan hướng dẫn cho phù hợp, sử dụng nhân đạo động vật cho nghiên cứu được theo dõi. Trong cơ thể ghép ngoại lai các thử nghiệm được thực hiện trong chuột đực không có lông giao phối xa SCID (SHO) (Charles River Laboratories). Chuột được cắt bỏ tinh hoàn bằng cách gây mê isofloran và được đưa ra từ 7-10 ngày để phục hồi. Các tế bào LNCaP/AR(cs) hoặc LNCaP/SR α F876L (như được mô tả nêu trên) bị lơ lửng trong 50% RPMI, 50% Matrigel (BD Biosciences), và 3×10^6 tế bào/ghép ngoại lai được tiêm trong thể tích khoảng 100 μ L. Động vật được quan sát hằng tuần cho đến khi khối u phát triển rõ ràng. Sau 40-60 ngày sau khi tiêm, động vật được chọn ngẫu nhiên vào đoàn hệ của lớp phủ khối u tương ứng trung bình (150-250 mm³) và phạm vi. Tất cả các hợp chất được dùng hằng ngày qua đường miệng với liều khoảng 30 mg/kg/ngày hợp chất. Đối với tất cả nghiên cứu ghép ngoại lai LNCaP/AR(cs) lưu trữ thuốc ARN-509 và enzalutamit được chuẩn bị trong 18% PEG-400, 1% Tween-80 và 1% povidon, và được bào chế dùng cho thuốc trong dung dịch 15% Vitamin E-TPGS và 65% của 0,5% w/v CMC trong chất đệm citrat 20 mM (độ pH 4,0). Dược động học ARN-509 và enzalutamit được đánh giá vào cuối nghiên cứu như được mô tả trước đây (Clegg et al. (2012) *Cancer Research* 72:1494-503).

Phù hợp với dữ liệu trong ống nghiệm, không phải ARN-509 cũng không enzalutamit 30 mg/kg/ngày ảnh hưởng sự phát triển của khối u LNCaP/AR/SR α F876L (Fig.10). Hoạt tính thiếu này không phải là đặc tính của hợp chất tiếp xúc thấp bất ngờ khi nồng độ thuốc trong huyết tương 28 được định lượng và phù hợp với nghiên cứu ghép ngoại lai LNCaP/AR trước (Bảng 9). Ngoài ra, trong thử nghiệm song song, ARN-509 30 mg/kg/ngày biểu hiện mạnh hoạt tính kháng-khối u trong kiểu LNCaP/AR(cs), phù hợp với các kết quả trước (Fig.10).

Bảng 9. Dược động học ghép ngoại lai LNCaP/SRαF876L

Hợp chất	Liều	C ₂₄ (µg/mL)	T _{1/2} (hr)	AUC ₀₋₂₄ (µg·hr/mL)	C _{max} (µg/mL)	T _{max} (hr)
Enzalutamid	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

Ví dụ 15: Đánh dấu mở, an toàn 1/2 giai đoạn, dược động học, và nghiên cứu khái niệm của sự thử nghiệm về ARN-509 ở bệnh nhân với ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt được tiến hành nâng cao (CRPC)

Trong nghiên cứu này, ADN được phân lập từ 29 huyết tương của mẫu bệnh nhân bệnh nhân tham gia trong nghiên cứu lâm sàng giai đoạn 1/2 điều trị ARN-509 cho ung thư tiền liệt tuyến. Các phân tích sử dụng phương pháp kỹ thuật BEAMing dựa trên PCR nhũ tương (Dressman et al. (2003) PNAS USA 100:8817-22). BEAMing được sử dụng thành công để phát hiện loạt biến thể có nguồn gốc khối u trong gen gây ung thư nguồn gốc như PIKC3a và K-ras trong ctADN có nguồn gốc từ huyết tương người (Diehl et al. (2008) *Nature Medicine* 14:985-90). Biến thể AR F876L được xác định trong 3 của 29 mẫu bệnh nhân mẫu được thử nghiệm.

Nghiên cứu lâm sàng được thực hiện ở nhiều cơ quan, đầu tiên trong nam giới, 1/2 giai đoạn, liều theo thang và nghiên cứu khái niệm của sự thử nghiệm trên 9 mức liều trong đó, bệnh nhân đủ điều kiện với CRPC tiến độ tăng dần được nhân liều uống qua đường miệng của ARN-509 trên cơ sở bệnh nhân ngoại trú để xác định an toàn, dược động học (PK) và chứng minh sơ bộ hiệu quả kháng-khối u của ARN-509.

Bệnh nhân được chỉ định mCRPC liên tục với mức độ liều trong đoàn hệ khoảng 3 đến 6 bệnh nhân trên mức độ liều sử dụng tiêu chí thang liều tiêu chuẩn 3x3.

Mục đích là để xác định liều dung nạp tối đa (MTD) và/hoặc được đề nghị giai đoạn 2 liều (RP2D) của ARN-509 dẫn đến độc tính giới hạn liều (DLT) trong tối đa khoảng 30% của bệnh nhân. A DLT thường được định nghĩa là lên con 1 mức bất kỳ hoặc cao hơn, 3-4 mức bất kỳ độc tính không phải huyết học (độc tính GI phải tiếp tục ở 3-4 mức bất kể điều trị nội khoa tối đa) và/hoặc 4 mức độc tính huyết học

khoảng hơn 5 ngày, được xác định bởi CTCAE V4,0, và được đánh giá là có liên quan đến điều trị ARN-509. Phác đồ thiết kế nghiên cứu được đề cập trong Fig.11.

Bệnh nhân đủ điều kiện người ký văn bản đồng ý thông tin ban đầu được ghi tên vào đoàn hệ thang liều nơi họ được nhận liều uống đơn qua đường miệng của ARN-509 tiếp theo là được quan sát trong một-tuần (PK Tuần). Dùng thuốc liên tục bắt đầu vào chu kỳ 1 ngày 1 giả sử không có độc tính không thể chấp nhận được quan sát thấy.

Tối thiểu 3 đối tượng ở mỗi mức liều được theo dõi cho DLT thông qua ngày 28 của chu kỳ 1. Nếu không có DLTs được quan sát trong 3 bệnh nhân đầu tiên ở mỗi mức liều, tiếp theo được nạp tiếp tục ở mức liều kế tiếp. Nếu 2 hoặc nhiều bệnh nhân được trải qua DLT ở giai đoạn mức liều nhất định hoặc duy nhất của việc lên cơn của mức bất kỳ được quan sát thấy ở mức liều nhất định, việc tăng liều được dừng lại và MTD được xác định là mức liều trước đó. Nếu không có DLTs được quan sát thấy, RP2D được dựa trên được động học và thông tin an toàn tổng thể của ARN-509 và liều sinh học tối ưu được xác định từ dữ liệu tiền lâm sàng, và không nhất thiết phải là MTD.

Liều bắt đầu là 30 mg/ngày, với thang lên đến 60 mg, 90 mg, 120 mg, 180 mg, 240 mg, 300 mg, 390 mg, và 480 mg hằng ngày. Điều này được dự đoán rằng các mức liều biên độ phạm vi liều hoạt tính được lý được dự đoán được lý và nằm trong ngưỡng an toàn được chỉ định bởi các kết quả độc tính tiền lâm sàng.

Sau khi lựa chọn khoảng 240 mg là RP2D, bệnh nhân đủ điều kiện bổ sung được ghi tên vào phần giai đoạn 2 của nghiên cứu, gồm có đồng thời 3 nhóm người ở MTD và/hoặc RP2D để thu thập thông tin an toàn bổ sung và cung cấp tín hiệu ban đầu của hoạt tính kháng khối u. Đoàn hệ ba nhóm người bao gồm:

1. Chưa điều trị CRPC không phải di căn (50 bệnh nhân CRPC không phải di căn chưa điều trị hóa học trị liệu và abirateron);
2. Chưa điều trị CRPC di căn (20 bệnh nhân với mCRPC chưa điều trị hóa học trị liệu và abirateron); và
3. Được điều trị abirateron CRPC di căn (10-20 bệnh nhân).

Điều này được dự kiến mỗi bệnh nhân với mCRPC sẽ được nhận ít nhất 3 chu kỳ (12 tuần) điều trị liên tục và mỗi bệnh nhân với CRPC không phải di căn sẽ được nhận ít nhất 4 chu kỳ (16 tuần) điều trị liên tục. Điều trị được ngưng ở bất kỳ thời

gian cho phác đồ được xác định tiến triển bệnh hoặc độc tính không thể chấp nhận. Đánh giá khối u được thực hiện mỗi 3 chu kỳ (12 tuần) cho bệnh nhân với mCRPC và mỗi 4 chu kỳ (16 tuần) cho bệnh nhân với CRPC không phải di căn. An toàn được đánh giá từ liều đầu tiên thông qua ít nhất bốn tuần sau liều cuối cùng hoặc cho đến khi phân giải độc tính liên quan đến thuốc, hoặc khi độc tính được cho là không thể thay đổi được, bất cứ cái nào dài hơn. Ảnh hưởng của thức ăn đến sự hấp thụ của ARN-509 và ảnh hưởng của ARN-509 trên sự tái phân cực ở não thất được đánh giá trong giai đoạn mở rộng giai đoạn 2 ở các vị trí được chọn lâm sàng.

Phân tích mẫu bằng kỹ thuật BEAMing trong nghiên cứu lâm sàng ARN-509 hiện nay được thực hiện bởi GMBH Inostics. Máu được thu gom trong ống được hút khí K2-EDTA và trộn đều bằng cách từ từ đảo ngược nhiều lần. Trong vòng 30 phút ống thu gom quay ở 2000 x g trong 15 phút. Huyết tương được chiết, được chuyển ống lưu trữ cryo. Trong vòng 90 phút lắng gạn, huyết tương được bảo quản ở -70°C hoặc thấp hơn cho đến khi phân tích. ADN được tinh sạch từ 300-500µL huyết tương phân ước và được chiết như được mô tả trong Diehl et al. (2008) *Nature medicine* 14:985-90. Biến thể phát hiện đã được thực hiện theo kỹ thuật BEAMing như được mô tả trong Diehl et al. Tóm lại, trong bước PCR đầu tiên, vùng đích (~100 bp) được khuếch đại sử dụng mỗi đặc hiệu gen với trình tự tag và đối tượng để nhũ tương PCR chứa mỗi được phủ các hạt chất từ tính. Sau khi phân biệt PCR nhũ tương của kiểu đại và các hạt biến thể đã được thực hiện bằng lai hóa đặc hiệu alen sau đó đếm tế bào dòng. Kết quả đếm tế bào dòng được phân tích bằng cách sử dụng biểu hiện FCS (De Novo Software, Los Angeles, CA) dẫn đến xác định rõ số lượng của tỷ lệ alen biến thể so với alen kiểu đại.

Mẫu được phân tích cho sự có mặt của AR kiểu đại hoặc 3 điểm alen biến thể duy nhất có thể dẫn đến F876L (t2988c, c2990a, và c2990g (hoặc t2626c, c2628a, và c2928g tương ứng, so với axit nucleic AR mã hóa trình tự được biểu hiện tại SEQ ID NO: 18). Biến thể được phân tích và độ nhạy kỹ thuật của phương pháp BEAMing được thể hiện trong bảng 10. Để phát hiện, tần số có thể ở trên lượng tổng của genome tương ứng được sử dụng trên thử nghiệm. Ví dụ, nếu trong mẫu, 1,000 genomic tương ứng có mặt, nhưng các phần được tính của các phân tử ADN biến thể là 0,02% (1 alen biến thể trong 5,000 alen kiểu đại), mẫu được ghi theo kiểu đại.

Bảng 10. Sự thay đổi nucleotit AR được theo dõi bằng thử nghiệm BEAMing

Vị trí Nucleotit	Thay đổi Nucleotit	Vị trí axit amin	Thay đổi Axit amin
c.2626	t > c	876	F>L
c.2628	c > a	876	F>L
c.2628	c > g	876	F>L

Các kết quả

Tập hợp của bệnh nhân qua tất cả nhóm liệu được biểu hiện PSA đáp ứng với 14/30 bệnh nhân biểu hiện 12 tuần $\geq 50\%$ giảm trong PSA so với đường chuẩn. PSA đáp ứng cho 29 bệnh nhân được sàng lọc được mô tả trong Fig.12. Tiền điều trị và trong quá trình mẫu huyết tương điều trị đã được phân tích. Thời gian phân tích BEAMing được chỉ báo bằng đầu cuối của dòng đáp ứng PSA. Mười tám trong số 29 bệnh nhân có PSA nêu trên của đường chuẩn ở thời điểm phân tích chỉ ra kháng bên trong hoặc mắc phải với ARN-509.

Ba đoạn dò được thiết kế để theo dõi sự thay đổi của 3 nucleotit có thể mã hóa cho thay thế axit amin F876L. Pha loãng trộn các thử nghiệm với trình tự biến thể và kiểu đại ADN cho thấy độ nhạy trong kỹ thuật khoảng 0,02% (khả năng để phát hiện 1 trình tự biến thể trong số 5000 kiểu đại). Trong thử nghiệm đầu tiên của mẫu huyết tương bệnh nhân được điều trị 29 ARN-509, chúng tôi sự biến thể được phát hiện trong 3 bệnh nhân (Bảng 11 và 12). Tại thời điểm phân tích BEAMing, bệnh nhân 7 và 10 có mức PSA đường chuẩn nêu trên, trong khi bệnh nhân 13 chứng tỏ PSA tăng trên điểm đáy điều trị (Fig.13). Trong tất cả 3 bệnh nhân, phát hiện c2628a thay đổi nucleotit. Theo một trong số 3 bệnh nhân (Bệnh nhân 10) biến thể t2626c cũng được phát hiện, biểu hiện của bệnh polyclonal. Sự biến thể mã hóa F876L là không được phát hiện trong bất kỳ của mẫu điều trị trước (0/29) cho thấy rằng nếu có mặt trước khi điều trị ARN-509 dưới giới hạn phát hiện hoặc phát sinh biến thể de novo trong quá trình điều trị ARN-509. Trong cả hai trường hợp, dữ liệu hỗ trợ giả thiết rằng các kết quả tự nhiên có chọn lọc của thương tổn mang biến thể alen đến mức độ đủ để phát hiện trong ctADN phụ thuộc vào tiếp xúc mạn tính với ARN-509 và được liên kết với PSA tăng. Tiếp tục thiết lập sự liên kết của F876L với bệnh tăng dần, mẫu huyết tương được phân tích thực hiện ở thời điểm bổ sung từ 3 bệnh nhân số điểm dương trong thời gian lọc đầu tiên (Bảng 12) ở bệnh nhân 10, biến thể không

được phát hiện ở thời điểm khác được phân tích (Chu kỳ 4; PSA 102% của T0). Ở bệnh nhân 13, biến thể không được phát hiện ở chu kỳ 4 (PSA 16,2 % của đường chuẩn) hoặc ở chu kỳ 12 (bệnh nhân là số điểm dương ở chu kỳ 11). Trình tự biến thể ở chu kỳ 11 ở giới hạn phát hiện và được ước lượng phát sinh thông qua khuếch đại của phân tử biến thể đơn. Thông qua PSA của bệnh nhân 13 đã từ từ tăng dần từ điểm đáy điều trị ở chu kỳ 11 và 12, ở cả thời điểm PSA vẫn còn >60% so với ban đầu nghiên cứu, và do đó, kháng chưa xuất hiện. Tương đồng hóa trình tự biến thể ở giới hạn phát hiện có thể phản ánh sự có mặt tương đối hiếm có, dòng vô tính biến thể có khả năng để được mở rộng tiếp tục dưới áp lực chọn lọc và cuối cùng kích thích bệnh tăng dần.

Với thời gian tương đối dài điều trị của bệnh nhân 7, huyết tương từ thời điểm bổ sung rõ ràng làm giảm PSA; (> 90% giảm từ đường chuẩn; chu kỳ 4, 8 và 10) và phân tích việc tăng PSA ban đầu từ điểm đáy của nó (Chu kỳ 15 và 19) (Fig.13). Do đó, sự biến thể là không được phát hiện trong 3 mẫu từ chu kỳ điều trị 4, 8 và 10 trong khi biến thể c2628a được phát hiện trong 2 mẫu được phân tích từ việc tăng PSA ban đầu (Chu kỳ 15 và 19). Các dữ liệu lâm sàng phù hợp với các dữ liệu tiền lâm sàng điều này chứng tỏ rằng sự thay đổi axit amin F876L đủ để truyền kháng vào ARN-509.

Bảng 11. Các kết quả BEAMing từ các bệnh nhân dương F876L

Bệnh nhân	Chu kỳ điều trị *	PSA [phần trăm của ngày 0]	Gọi kiểu gen	Tần số biến thể [biến thể/trọng lượng các hạt x 100]		
				c2990a	c2990g	t2988c
7	0	100	Kiểu dại	-	-	-
7	4	1,4	Kiểu dại	-	-	-
7	8	3,3	Kiểu dại	-	-	-
7	10	5,6	Kiểu dại	-	-	-
7	15	41,2	Biến thể	0,162	-	-
7	19	97,2	Biến thể	5,005	-	-
7	22	281,0	Biến thể	1,002	-	-
10	0	100	Kiểu dại	-	-	-
10	4	102	Kiểu dại	-	-	-
10	7	245	Biến thể	0,051	-	0,12
13	0	100	Kiểu dại	-	-	-
13	4	16,2	Kiểu dại	-	-	-
13	11	31,7	Biến thể	0,065	-	-
13	12	39,5	Kiểu dại	-	-	-

* Chu kỳ điều trị là 4 tuần; Chu kỳ 0 là thời điểm tiền điều trị.

Bảng 12. Gốc F876L BEAMing của các bệnh nhân ARN-509-001

Bệnh nhân	đáp ứng PSA 12 tuần	Chu kỳ điều trị phân tích BEAMing *	PSA trong thời gian phân tích BEAMing [phần trăm của đường chuẩn]	Đường chuẩn Gọi kiểu gen [#]	Trong quá trình điều trị Gọi kiểu gen
1	30,49	19	195,4	trọng lượng	trọng lượng
2	-61,8	10	337,08	trọng lượng	trọng lượng
3	22,7	4	122	trọng lượng	trọng lượng
4	12,4	5	134	trọng lượng	trọng lượng
5	-70,65	8	16	trọng lượng	trọng lượng
6	-90,02	10	84,6	trọng lượng	trọng lượng
7	-98,6	22	281	trọng lượng	Biến thể
8	-62,2	16	10,2	trọng lượng	trọng lượng
9	26,38	7	185	trọng lượng	trọng lượng
10	2,33	7	245	trọng lượng	Biến thể
11	-49,76	8	143,88	trọng lượng	trọng lượng
12	-56,65	7	99,47	trọng lượng	trọng lượng
13	-83,79	11	31,7	trọng lượng	Biến thể
14	-43,21	11	150,5	trọng lượng	trọng lượng
15	164,14	3	220	trọng lượng	trọng lượng
16	89,09	4	189	trọng lượng	trọng lượng
17	-45,86	4	54,14	trọng lượng	trọng lượng
18	-95,65	6	7,34	trọng lượng	trọng lượng
19	-71,19	11	196,86	trọng lượng	trọng lượng
20	-30,88	21	89,3	trọng lượng	trọng lượng
21	-74,43	10	46,91	trọng lượng	trọng lượng
22	-82,7	25	0,19	trọng lượng	trọng lượng
23	97,78	8	222,46	trọng lượng	trọng lượng
24	-74,86	25	4,89	trọng lượng	trọng lượng
25	-30,07	12	161	trọng lượng	trọng lượng
26	96,51	5	214,85	trọng lượng	trọng lượng
27	-0,89	13	20,69	trọng lượng	trọng lượng
28	-33,59	10	126	trọng lượng	trọng lượng
29	-58,44	13	105	trọng lượng	trọng lượng

Ví dụ 16: Phương pháp dùng để tạo ra dòng tế bào cho thuốc sàng lọc

Để xác định các hợp chất mà giữ lại hoạt tính chất đối kháng AR trong phạm vi biến thể F876L của thụ thể androgen, một số trong ống nghiệm và các thử nghiệm trong ống nghiệm như được mô tả nêu trên là được thích nghi.

Theo thiết lập trong ống nghiệm, việc chuyển nạp thoát qua các thử nghiệm phiên mã tương tự như được mô tả trong ví dụ 8 được sử dụng để xác định các hợp chất là không có hoạt tính chất chủ vận và đối kháng hoàn toàn cả kiểu đại cũng như hoạt tính phiên mã Biến thể AR F876L. Các tế bào HEPG2 hoặc tế bào nhận điện hình bất kỳ trong đó, hoạt tính phiên mã AR có thể được theo dõi là được sử dụng cho thử nghiệm này.

Đối với việc thay thế vào chuyển nạp thoát qua, chỉ thị phiên mã và F876L AR được phức hợp ổn định trong một số dòng tế bào và được sử dụng để sàng lọc các hợp chất. Việc tích hợp ổn định của F876L AR biến thể vào androgen nhạy với dòng tế bào ung thư tiền liệt tuyến như LNCaP, LaPC4 hoặc VCaP thông qua việc sử dụng plasmid (nghĩa là, pCADN3,1) hoặc sự tích hợp dựa vào virus cho phép sàng lọc và đánh giá các hợp chất trong phiên mã, thiết lập sự tăng sinh và ghép ngoại lai. Tóm lại, F876L AR được tách dòng thành vector biểu hiện retrovirus như pQCXIP (Clontech, Mountain View, CA). Dẫn đến plasmid sau đó được sử dụng để tạo ra độ chuẩn cao nguồn virus để dùng trong tạo ra dòng tế bào được biến đổi ổn định theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Kết quả dòng tế bào được sử dụng đối với các thử nghiệm chuyển nạp thoát qua phiên mã là được mô tả trong ví dụ 4, thử nghiệm phiên mã gen nội sinh là được mô tả trong ví dụ 5, thử nghiệm tăng sinh là được mô tả trong ví dụ 3 hoặc các nghiên cứu ghép ngoại lai là được mô tả trong ví dụ 1.

Ngoài ra, các tế bào còn được biến đổi bởi sự kết hợp ổn định của chỉ thị đáp ứng AR như chỉ thị Cignal Lenti AR (Qiagen, Valencia, CA) cho phép chỉ thị dựa trên sàng lọc hợp chất mà không cần cho chuyển nạp thoát qua.

Các ví dụ và các phương án được mô tả ở đây chỉ với mục đích minh họa và biến đổi khác nhau hoặc được đề xuất thay đổi bởi những có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này để bao gồm trong nội dung và phạm vi của đơn này và của yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phương pháp sàng lọc hợp chất đối kháng AR bị biến đổi, phương pháp bao gồm các bước:
 - (a) biểu hiện AR bị biến đổi trong tế bào, trong đó AR bị biến đổi mà bị biến đổi ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí axit amin 876 của trình tự axit amin được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1;
 - (b) cho tế bào tiếp xúc với hợp chất thử nghiệm; và
 - (c) phát hiện mức độ của hoạt tính AR trong tế bào, trong đó giảm hoạt tính cho thấy rằng hợp chất đối kháng thụ thể AR bị biến đổi.
2. Phương pháp theo điểm 1, trong đó hợp chất thử nghiệm thể hiện toàn bộ hoạt tính chất đối kháng theo hướng thụ thể AR bị biến đổi.
3. Phương pháp theo điểm 1 hoặc 2, trong đó hợp chất thử nghiệm không thể hiện hoạt tính chủ vận theo hướng thụ thể AR bị biến đổi.
4. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó sự biến đổi là thay thế hoặc loại bỏ axit amin ở vị trí 876 của polypeptit AR.
5. Phương pháp theo điểm 2, trong đó sự biến đổi là thay thế phenylalanin vào axit amin được chọn trong số leuxin, isoleuxin, valin, alanin, glyxin, methionin, serin, threonin, xystein, tryptophan, lyxin, arginin, histidin, prolin, tyroxin, asparagin, glutamin, axit aspartic và axit glutamic ở vị trí axit amin 876 của polypeptit AR, tùy ý trong đó sự biến đổi là thay thế phenylalanin vào axit amin được chọn trong số glyxin, alanin, valin, leuxin, và isoleuxin ở vị trí axit amin 876 của polypeptit AR, tùy ý trong đó sự biến đổi là thay thế phenylalanin vào leuxin ở vị trí axit amin 876 của polypeptit AR.
6. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó tế bào là thiếu hụt để biểu hiện của AR kiểu dại, biểu hiện mức độ thấp của AR kiểu dại, hoặc biểu hiện thụ thể AR bị biến đổi.
7. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó tế bào được chọn trong số HeLa, CV1, COS7, HepG2, HEK-83, DU124, PC3, TSY-PR1, LNCaP, CWR, VCaP và LAPC4.
8. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó tế bào bao gồm gen chỉ thị có thể thực hiện liên kết với vùng khởi đầu đáp ứng androgen, tùy ý trong đó hoạt tính được xác định bằng cách phân tích biểu hiện của gen chỉ thị.

9. Phương pháp theo điểm 8, trong đó vùng khởi đầu bao gồm yếu tố đáp ứng androgen, tùy ý trong đó yếu tố đáp ứng androgen là 4xARE hoặc yếu tố probasin.
10. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó vùng khởi đầu là probasin, kháng thể đặc hiệu tiền liệt tuyến, vùng khởi đầu MMTV LTR, FASN, STEAP4, TMPRSS2, ORM1, hoặc NKX3,1.
11. Phương pháp theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 10, trong đó gen chỉ thị mã hóa protein được chọn trong số luciferaza, protein huỳnh quang, protein phát quang sinh học, hoặc enzym.
12. Polypeptit AR được phân lập hoặc biến thể của chúng có hoạt tính AR bao gồm sự biến đổi ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí axit amin 876 của trình tự axit amin được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1, trong đó sự biến đổi đối kháng với chất đối kháng AR trên polypeptit AR bị biến đổi hoặc biến thể.
13. Polypeptit AR được phân lập theo điểm 12, trong đó sự biến đổi bao gồm sự thay thế axit amin ở vị trí 876 so với AR kiểu đại được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1, tùy ý trong đó sự thay thế là F876L.
14. Polypeptit AR được phân lập theo điểm 13 có trình tự axit amin được biểu hiện tại SEQ ID NO: 5.
15. Polypeptit AR được phân lập theo điểm 12, trong đó sự biến đổi bao gồm sự loại bỏ của vị trí axit amin 876.
16. Polypeptit AR được phân lập theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 15, trong đó polypeptit bao gồm sự thay thế axit amin ở vị trí 876 so với AR kiểu đại được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1 và một hoặc nhiều sự thay thế axit amin bổ sung, tùy ý trong đó sự thay thế axit amin ở vị trí 876 là F876L.
17. Polypeptit AR được phân lập theo điểm 16, trong đó một hoặc nhiều sự thay thế axit amin bổ sung được chọn trong số một hoặc nhiều sự thay thế axit amin liên quan đến ung thư tiền liệt tuyến kháng cắt, tùy ý trong đó một hoặc nhiều sự thay thế axit amin bổ sung được chọn trong số T877A, W741C, W741L, W741R, L701H và H874Y.
18. Polypeptit AR được phân lập theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 17, trong đó polypeptit bao gồm trình tự axit amin được biểu hiện tại SEQ ID NO: 5 hoặc biến thể mà có ít nhất hoặc ít nhất khoảng 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều trình tự tương đồng với polypeptit có trình

tự được biểu hiện tại SEQ ID NO: 5, trong đó axit amin ở vị trí 876 không là phenylalanin.

19. Polypeptit AR được phân lập theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 18, trong đó polypeptit này là protein tái tổ hợp.

20. Phân tử axit nucleic được phân lập mã hóa polypeptit AR bị biến đổi theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 19.

21. Phân tử axit nucleic được phân lập theo điểm 20, trong đó axit nucleic là phân tử ADN hoặc ARN.

22. Phân tử axit nucleic được phân lập theo điểm 20, trong đó axit nucleic là phân tử cADN.

23. Phân tử axit nucleic được phân lập theo điểm 20 hoặc điểm 21, trong đó axit nucleic bao gồm trình tự axit nucleic được biểu hiện tại SEQ ID NO: 19 hoặc biến thể mà có ít nhất hoặc ít nhất khoảng 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc nhiều trình tự tương đồng với trình tự axit nucleic được biểu hiện tại SEQ ID NO: 19, trong đó bộ ba axit nucleic mã hóa axit amin ở vị trí 876 không mã hóa phenylalanin, tùy ý trong đó phân tử axit nucleic mã hóa leuxin ở vị trí 876 của polypeptit AR.

24. Vector bao gồm phân tử axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 20 đến 23, tùy ý trong đó vector là vector virus hoặc plasmit.

25. Vector theo điểm 24, trong đó axit nucleic có thể thực hiện liên kết với vùng khởi đầu, tùy ý trong đó vùng khởi đầu là vùng khởi đầu cấu trúc hoặc cảm ứng.

26. Tế bào chủ bao gồm vector theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 24 đến 25.

27. Tế bào chủ theo điểm 26, trong đó tế bào là tế bào nhân sơ hoặc tế bào nhân chuẩn, tùy ý trong đó tế bào là tế bào động vật có vú, tế bào vi khuẩn, tế bào nấm men, tế bào côn trùng, tế bào thực vật, hoặc tế bào lưỡng cư.

28. Polypeptit AR đột biến biểu hiện bởi tế bào chủ theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 26 đến 27.

29. Vi mạch bao gồm polypeptit AR bị biến đổi theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 14 đến 19 hoặc phân tử axit nucleic theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 20 đến 23.

30. Vi mạch theo điểm 29, trong đó polypeptit AR bị biến đổi bao gồm sự thay thế axit amin mà là F876L hoặc axit nucleic mã hóa polypeptit AR bị biến đổi có sự thay thế axit amin là F876L.

31. Kit bao gồm một hoặc nhiều thuốc thử để phát hiện axit nucleic mã hóa polypeptit AR bị biến đổi bao gồm sự biến đổi ở vị trí axit amin 876 hoặc polypeptit AR bị biến đổi bao gồm sự biến đổi ở vị trí axit amin 876, tùy ý trong đó polypeptit AR bị biến đổi bao gồm sự thay thế axit amin là F876L, còn bao gồm mỗi oligonucleotit mà

(a) liên kết với axit nucleic mã hóa AR bị biến đổi mà bị biến đổi ở vị trí axit amin 876; và

(b) không liên kết với axit nucleic mã hóa AR kiểu đại có phenylalanin ở vị trí axit amin 876.

32. Kit theo điểm 31, trong đó kit này chứa vi mạch bao gồm

(a) polypeptit AR bị biến đổi có sự biến đổi mà là F876S, hoặc phần của chúng bao gồm sự biến đổi mà là F876S; hoặc

(b) phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit AR đột biến có sự biến đổi mà là F876S, hoặc phần của chúng bao gồm sự biến đổi mà là F876S.

33. Hệ thống phát hiện AR bị biến đổi kháng lại sự ức chế chất đối kháng AR thể hệ thứ nhất hoặc thứ hai ở đối tượng, hệ thống này bao gồm:

(a) mẫu chứa phân tử axit nucleic mã hóa polypeptit AR từ đối tượng; và

(b)(i) chip bao gồm axit nucleic mã hóa polypeptit AR đột biến hoặc phần của chúng mà bị biến đổi ở vị trí axit amin tương ứng với vị trí axit amin 876 của trình tự axit amin được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1, tùy ý trong đó chip được chứa trên vi mạch, hoặc

(b)(ii) đoạn dò axit nucleic đặc hiệu trình tự, trong đó đoạn dò axit nucleic đặc hiệu trình tự:

(i) liên kết với axit nucleic mã hóa AR bị biến đổi mà bị biến đổi ở vị trí axit amin 876; và

(ii) không liên kết với axit nucleic mã hóa AR kiểu đại có phenylalanin ở vị trí axit amin 876, hoặc

(b)(iii) cặp mỗi oligonucleotit mà tạo sườn vùng axit nucleic mã hóa axit amin 876 của polypeptit AR.

34. Kháng thể được phân lập liên kết với polypeptit AR bị biến đổi theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 12 đến 19, trong đó kháng thể không liên kết với hoặc liên kết với ái lực thấp với polypeptit AR kiểu dại có trình tự axit amin được biểu hiện tại SEQ ID NO: 1.

35. Kháng thể theo điểm 34, trong đó polypeptit AR bị biến đổi bao gồm sự thay thế axit amin mà là F876L.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Aragon Pharmaceuticals, Inc.
 Joseph, James David
 Hager, Jeffrey H.
 Sensintaffar, John Lee
 Lu, Nhin
 Qian, Jing
 Smith, Nicholas D.

<120> PHƯƠNG PHÁP SÀNG LỌC HỢP CHẤT ĐỐI KHÁNG THỤ THỂ ANDROGEN
 (AR), POLYPEPTIT AR VÀ KIT CHỨA POLYPEPTIT AR

<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> Người thông tuệ

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ile Tyr Phe His Thr Gln
915

<210> 2
<211> 920

<212> PRT

<213> Người thông tuệ

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Leu Leu Gln Gln Gln Gln 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
Lys Ala Val Ser Val Ser Met Gly Leu Gly Val Glu Ala Leu Glu His				
		245		250
Leu Ser Pro Gly Glu Gln Leu Arg Gly Asp Cys Met Tyr Ala Pro Leu				
		260		265
Leu Gly Val Pro Pro Ala Val Arg Pro Thr Pro Cys Ala Pro Leu Ala				
		275		285
Glu Cys Lys Gly Ser Leu Leu Asp Asp Ser Ala Gly Lys Ser Thr Glu				
		290		295
Asp Thr Ala Glu Tyr Ser Pro Phe Lys Gly Gly Tyr Thr Lys Gly Leu				
305		310		315
Glu Gly Glu Ser Leu Gly Cys Ser Gly Ser Ala Ala Ala Gly Ser Ser				
		325		330
Gly Thr Leu Glu Leu Pro Ser Thr Leu Ser Leu Tyr Lys Ser Gly Ala				
		340		345
Leu Asp Glu Ala Ala Ala Tyr Gln Ser Arg Asp Tyr Tyr Asn Phe Pro				
		355		360
Leu Ala Leu Ala Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Pro His				
		370		375
Ala Arg Ile Lys Leu Glu Asn Pro Leu Asp Tyr Gly Ser Ala Trp Ala				
385		390		395
Ala Ala Ala Ala Gln Cys Arg Tyr Gly Asp Leu Ala Ser Leu His Gly				
		405		410
				415

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Lys Pro Ile Tyr Phe His Thr Gln
 915 920

<210> 3
 <211> 369
 <212> PRT
 <213> Người thông tuệ

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

His	Ile	Glu	Gly	Tyr	Glu	Cys	Gln	Pro	Ile	Phe	Leu	Asn	Val	Leu	Glu	115	120	125
Ala	Ile	Glu	Pro	Gly	Val	Val	Cys	Ala	Gly	His	Asp	Asn	Asn	Gln	Pro	130	135	140
Asp	Ser	Phe	Ala	Ala	Leu	Leu	Ser	Ser	Leu	Asn	Glu	Leu	Gly	Glu	Arg	145	150	155
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> Người thông tuệ

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Tyr Phe His Thr Gln
225 230

<210> 5
<211> 919
<212> PRT
<213> Người thông tuệ

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Ile Tyr Phe His Thr Gln
915

<210> 6
<211> 902

<212> PRT

<213> Chuột nâu

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

195	200	205
Glu Ala Thr Gly Ala Pro Ser Ser Ser Lys Asp Ser Tyr Leu Gly Gly		
210	215	220
Asn Ser Thr Ile Ser Asp Ser Ala Lys Glu Leu Cys Lys Ala Val Ser		
225	230	235
Val Ser Met Gly Leu Gly Val Glu Ala Leu Glu His Leu Ser Pro Gly		
	245	250
		255
Glu Gln Leu Arg Gly Asp Cys Met Tyr Ala Ser Leu Leu Gly Gly Pro		
	260	265
		270
Pro Ala Val Arg Pro Thr Pro Cys Ala Pro Leu Ala Glu Cys Lys Gly		
	275	280
		285
Leu Ser Leu Asp Glu Gly Pro Gly Lys Gly Thr Glu Glu Thr Ala Glu		
	290	295
		300
Tyr Ser Ser Phe Lys Gly Gly Tyr Ala Lys Gly Leu Glu Gly Glu Ser		
305	310	315
		320
Leu Gly Cys Ser Gly Ser Ser Glu Ala Gly Ser Ser Gly Thr Leu Glu		
	325	330
		335
Ile Pro Ser Ser Leu Ser Leu Tyr Lys Ser Gly Ala Val Asp Glu Ala		
	340	345
		350
Ala Ala Tyr Gln Asn Arg Asp Tyr Tyr Asn Phe Pro Leu Ala Leu Ser		
	355	360
		365
Gly Pro Pro His Pro Pro Pro Pro Thr His Pro His Ala Arg Ile Lys		
	370	375
		380
Leu Glu Asn Pro Ser Asp Tyr Gly Ser Ala Trp Ala Ala Ala Ala Ala		
385	390	395
		400
Gln Cys Arg Tyr Gly Asp Leu Ala Ser Leu His Gly Gly Ser Val Ala		
	405	410
		415

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ile Tyr Phe His Thr Gln
900

<210> 7

<211> 899

<212> PRT

<213> Chuột nhắt nhà

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro	Ala	Pro	Pro	Asp	Gln	Asp	Asp	Ser	Ala	Ala	Pro	Ser	Thr	Leu	Ser	130	135	140
Leu	Leu	Gly	Pro	Thr	Phe	Pro	Gly	Leu	Ser	Ser	Cys	Ser	Ala	Asp	Ile	145	150	155
Lys	Asp	Ile	Leu	Asn	Glu	Ala	Gly	Thr	Met	Gln	Leu	Leu	Gln	Gln	Gln	165	170	175
Gln	Gln	Gln	Gln	Gln	His	Gln	Gln	Gln	His	Gln	Gln	His	Gln	Gln	Gln	180	185	190
Gln	Glu	Val	Ile	Ser	Glu	Gly	Ser	Ser	Ala	Arg	Ala	Arg	Glu	Ala	Thr	195	200	205
Gly	Ala	Pro	Ser	Ser	Ser	Lys	Asp	Ser	Tyr	Leu	Gly	Gly	Asn	Ser	Thr	210	215	220
Ile	Ser	Asp	Ser	Ala	Lys	Glu	Leu	Cys	Lys	Ala	Val	Ser	Val	Ser	Met	225	230	235
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
Ser	Gly	Ser	Ser	Glu	Ala	Gly	Ser	Ser	Gly	Thr	Leu	Glu	Ile	Pro	Ser	325	330	335

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Trp Met Gly Leu Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg Ser Phe Thr Asn
725 730 735

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

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

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

Leu Cys Met Lys Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile Ile Pro Val Asp Gly
785 790 795 800

Leu Lys Asn Gln Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met Asn Tyr Ile Lys
805 810 815

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

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

Ile Ala Arg Glu Leu His Gln Phe Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys Ser
850 855 860

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

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

His Thr Gln

<210> 8
<211> 907
<212> PRT
<213> Chó nhà

<400> 8

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

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

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

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

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

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

Glu Glu Gln Gln Pro Ser Gln Gln Arg Ser Ala Ser Lys Gly His Pro
 100 105 110

Glu Ser Ala Cys Val Pro Glu Pro Gly Val Thr Ser Ala Thr Gly Lys
 115 120 125

Gly Leu Gln Gln Gln Gln Pro Ala Pro Pro Asp Glu Asn Asp Ser Ala
 130 135 140

Ala Pro Ser Thr Leu Ser Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro Gly Leu Ser
 145 150 155 160

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

Gln Leu Leu Gln Gln Gln Arg Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
 180 185 190

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

Ser Ser Ser Gly Arg Ala Arg Glu Ala Ala Gly Ala Ser Thr Ser Ser
 210 215 220

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

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

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

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

Glu Gly Asp Phe Pro Pro Pro Asp Val Trp Tyr Pro Gly Gly Val Val
 485 490 495

Ser Arg Val Pro Phe Pro Ser Pro Ser Cys Val Lys Ser Glu Met Gly
 500 505 510

Ser Trp Met Glu Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Gly Asp Met Arg Leu Glu
 515 520 525

Thr Ala Arg Asp His Val Leu Pro Ile Asp Tyr Tyr Phe Pro Pro Gln
 530 535 540

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

Ala Leu Thr Cys Gly Ser Cys Lys Val Phe Phe Lys Arg Ala Ala Glu
 565 570 575

Gly Lys Gln Lys Tyr Leu Cys Ala Ser Arg Asn Asp Cys Thr Ile Asp
 580 585 590

Lys Phe Arg Arg Lys Asn Cys Pro Ser Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr
 595 600 605

Glu Ala Gly Met Thr Leu Gly Ala Arg Lys Leu Lys Lys Leu Gly Asn
 610 615 620

Leu Lys Leu Gln Glu Glu Gly Glu Ala Ser Asn Val Thr Ser Pro Thr
 625 630 635 640

Glu Glu Pro Thr Gln Lys Leu Thr Val Ser His Ile Glu Gly Tyr Glu
 645 650 655

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

Val Cys Ala Gly His Asp Asn Asn Gln Pro Asp Ser Phe Ala Ala Leu
 675 680 685

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

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

<210> 9
 <211> 912
 <212> PRT
 <213> Linh cầu đốm

<400> 9

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

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

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

Pro Pro Gly Ala Arg Leu Gln Gln Gln His Gln His Gln Gln Gln His
 50 55 60

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

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

Asp Glu Glu Gln Gln Pro Ser Gln His Gln Ser Ala Lys Gly His Pro
 100 105 110

Glu Ser Gly Cys Val Pro Glu Pro Val Ala Met Ser Arg Thr Gly Lys
 115 120 125

Gly Leu Glu Gln Gln Gln Pro Ala Pro Pro Asp Glu Asp Asp Ser Ala
 130 135 140

Ala Pro Ser Thr Leu Ser Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro Gly Leu Ser
 145 150 155 160

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

Gln Leu Leu Gln Arg Gln Arg Gln Arg Gln Gln Gln Arg Gln Gln Gln
 180 185 190

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Glu
 195 200 205

Val Val Ser Glu Gly Gly Ser Ser Gly Arg Ala Arg Glu Ala Ala Gly
 210 215 220

Ala Pro Thr Ser Ser Lys Asp Ser Tyr Leu Gly Gly Ser Ser Thr Ile
 225 230 235 240

Ser Asp Ser Ala Lys Glu Leu Cys Lys Ala Val Ser Val Ser Met Gly
 245 250 255

Leu Gly Val Glu Ala Leu Glu His Leu Ser Pro Gly Glu Gln Leu Arg
 260 265 270

Gly Asp Cys Met Tyr Ala Pro Leu Leu Gly Gly Pro Pro Pro Val Cys
 275 280 285

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

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

Gly Tyr Ala Lys Gly Leu Asp Gly Asp Ser Leu Gly Cys Ser Gly Ser
 325 330 335

Ser Gln Ala Gly Gly Ser Gly Thr Leu Glu Ile Pro Ser Thr Leu Ser
 340 345 350

Leu Tyr Lys Ser Gly Thr Leu Asp Glu Ala Ala Ala Tyr Gln Ser Arg
 355 360 365

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

Pro Ser Pro His Pro His Ala Arg Ile Lys Leu Glu Asn Pro Leu Asp
 385 390 395 400

Tyr Gly Ser Ala Trp Ala Ala Ala Ala Ala Gln Cys Arg Tyr Gly Asp
 405 410 415

Leu Ala Ser Leu His Gly Gly Gly Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Ser
 420 425 430

Pro Ser Ala Thr Ala Ser Ser Ser Trp His Thr Leu Phe Thr Ala Glu
 435 440 445

Glu Gly Gln Leu Tyr Gly Pro Cys Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Thr
 450 455 460

Gly Glu Ser Val Ser Val Thr Pro Tyr Gly Tyr Thr Arg Pro Gln Gln
 465 470 475 480

Gly Leu Thr Gly Gln Glu Gly Asp Phe Pro Pro Pro Asp Val Trp Tyr
 485 490 495

Pro Gly Gly Val Val Ser Arg Met Pro Tyr Pro Ser Ala Ser Cys Val
 500 505 510

Lys Ser Glu Met Gly Pro Trp Met Glu Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Gly
 515 520 525

Asp Met Arg Leu Glu Thr Thr Arg Asp His Val Leu Pro Ile Asp Tyr
 530 535 540

Tyr Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys Leu Ile Cys Gly Asp Glu Ala Ser
 545 550 555 560

Gly Cys His Tyr Gly Ala Leu Thr Cys Gly Ser Cys Lys Val Phe Phe
 565 570 575

Lys Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln Lys Tyr Leu Cys Ala Ser Arg Asn
 580 585 590

Asp Cys Thr Ile Asp Lys Phe Arg Arg Lys Asn Cys Pro Pro Cys Arg
 595 600 605

Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Ala Gly Met Thr Leu Gly Ala Arg Arg Leu
 610 615 620

Lys Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu Gln Glu Glu Gly Glu Ala Ser Ser
625 630 635 640

Thr Thr Ser Pro Thr Glu Glu Thr Thr Gln Lys Leu Thr Val Ser His
645 650 655

Ile Glu Gly Tyr Glu Cys Gln Pro Ile Phe Leu Asn Val Leu Glu Ala
660 665 670

Ile Glu Pro Gly Val Val Cys Ala Gly His Asp Asn Asn Gln Pro Asp
675 680 685

Ser Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn Glu Leu Gly Glu Arg Gln
690 695 700

Leu Val His Val Val Lys Trp Ala Lys Ala Leu Pro Gly Phe Arg Asn
705 710 715 720

Leu His Val Asp Asp Gln Met Ala Val Ile Gln Tyr Ser Trp Met Gly
725 730 735

Leu Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg Ser Phe Thr Asn Val Asn Ser
740 745 750

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

His Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys Val Arg Met Arg His Leu Ser
770 775 780

Gln Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr Pro Gln Glu Phe Leu Cys Met
785 790 795 800

Lys Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile Ile Pro Val Asp Gly Leu Lys Asn
805 810 815

Gln Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met Asn Tyr Ile Lys Asp Leu Asp
820 825 830

Arg Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn Pro Thr Ser Cys Ser Arg Arg
835 840 845

Phe Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Ser Val Gln Pro Ile Ala Arg
850 855 860

Glu Leu His Gln Phe Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys Ser His Met Val
865 870 875 880

Ser Val Asp Phe Pro Glu Met Met Ala Glu Ile Ile Ser Val Gln Val
885 890 895

Pro Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val Lys Pro Ile Tyr Phe His Thr Gln
900 905 910

<210> 10

<211> 884

<212> PRT

<213> Vuon cao nau

<400> 10

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

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

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

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

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly Glu Asp Gly Ser Pro Gln Ala Gln Ser
65 70 75 80

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

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

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

Pro Ala Pro Ser Asp Glu Asp Asp Ser Ala Val Pro Ser Thr Leu Ser
 130 135 140

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

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

Gln Gln Glu Ala Val Ser Glu Gly Ser Ser Ser Gly Arg Ala Arg Glu
 180 185 190

Ala Ala Gly Ala Pro Thr Ser Ser Lys Asp Ser Tyr Leu Gly Gly Thr
 195 200 205

Ser Thr Ile Ser Asp Ser Ala Lys Glu Leu Cys Lys Ala Val Ser Val
 210 215 220

Ser Met Gly Leu Gly Val Glu Thr Leu Glu His Leu Ser Pro Gly Glu
 225 230 235 240

Gln Leu Arg Gly Asp Cys Met Tyr Ala Pro Leu Leu Gly Gly Pro Pro
 245 250 255

Ala Val Arg Pro Thr Pro Cys Ala Pro Leu Ala Glu Cys Lys Gly Ser
 260 265 270

Leu Leu Asp Asp Ser Ala Asp Lys Gly Thr Glu Glu Pro Ala Glu Tyr
 275 280 285

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

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

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

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

Lys Val Phe Phe Lys Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln Lys Tyr Leu Cys
 545 550 555 560

Ala Ser Arg Asn Asp Cys Thr Ile Asp Lys Phe Arg Arg Lys Asn Cys
 565 570 575

Pro Ser Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Ala Gly Met Thr Leu Gly
 580 585 590

Ala Arg Lys Leu Lys Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu Gln Glu Glu Gly
 595 600 605

Glu Ala Ser Ser Ala Thr Ser Pro Thr Glu Glu Ser Ser Gln Lys Leu
 610 615 620

Thr Val Ser His Ile Glu Gly Tyr Glu Cys Gln Pro Ile Phe Leu Asn
 625 630 635 640

Val Leu Glu Ala Ile Glu Pro Gly Val Val Cys Ala Gly His Asp Asn
 645 650 655

Asn Gln Pro Asp Ser Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn Glu Leu
 660 665 670

Gly Glu Arg Gln Leu Val His Val Val Lys Trp Ala Lys Ala Leu Pro
 675 680 685

Gly Phe Arg Asn Leu His Val Asp Asp Gln Met Ala Val Ile Gln Tyr
 690 695 700

Ser Trp Met Gly Leu Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg Ser Phe Thr
 705 710 715 720

Asn Val Asn Ser Arg Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp Leu Val Phe Asn
 725 730 735

Glu Tyr Arg Met His Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys Val Arg Met
 740 745 750

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

755 760 765
 Phe Leu Cys Met Lys Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile Ile Pro Val Asp
 770 775 780
 Gly Leu Lys Asn Gln Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met Asn Tyr Ile
 785 790 795 800
 Lys Glu Leu Asp Arg Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn Pro Thr Ser
 805 810 815
 Cys Ser Arg Arg Phe Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Ser Val Gln
 820 825 830
 Pro Ile Ala Arg Glu Leu His Gln Phe Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys
 835 840 845
 Ser His Met Val Ser Val Asp Phe Pro Glu Met Met Ala Glu Ile Ile
 850 855 860
 Ser Val Gln Val Pro Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val Lys Pro Ile Tyr
 865 870 875 880
 Phe His Thr Gln
 <210> 11
 <211> 777
 <212> PRT
 <213> Éch ương beo
 <400> 11
 Met Glu Val His Ile Gly Leu Gly Gly Val Tyr Lys Gln Pro Pro Gly
 1 5 10 15
 Lys Met Ile Arg Gly Ala Phe Glu Asn Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu
 20 25 30
 Ala Leu Gln Gly Glu Arg Arg Ser Ala Ala Ser Leu Asp Thr Ser Ser
 35 40 45

Pro Ile Ser Ala Cys Val His Pro His Pro Thr Trp Asn Glu Pro Ser
 50 55 60

Thr Trp Thr Glu Val Arg Gly Thr Pro Trp Arg Glu Pro Gln Gly Ala
 65 70 75 80

Gln Pro Asp Pro Pro Pro Cys Ser Pro Arg Ser Gln Ala Pro Gln Phe
 85 90 95

Thr Leu Ser Ser Cys Thr Thr Glu Leu Lys Glu Ile Leu Gly Glu Gln
 100 105 110

Gly Gly Met Pro Glu Glu Gly Asn Ser Glu Ser Ala Ser Lys Glu Gly
 115 120 125

Tyr Pro Glu Ser Ile Ser Asp Ser Ala Lys Glu Ile Cys Lys Ala Val
 130 135 140

Ser Val Ser Leu Gly Leu Ser Met Glu Ala Leu Glu His Leu Ser Ala
 145 150 155 160

Ala Gly Glu Trp Gln Arg Gly Asp Cys Met Phe Ala Gly Pro Pro His
 165 170 175

His Thr Met Gly Ala Gln Thr Cys Gln Val Ala Glu Glu Asp Lys Ser
 180 185 190

Asp Thr Ser Phe Ser Gln Tyr Arg Glu Gly Ala Phe Arg Arg Ala Gly
 195 200 205

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

Pro Thr Glu Asp Lys Glu Gln Pro Cys Thr Asp Met Ala Leu Ser Glu
 225 230 235 240

Pro Gly Ser Leu Arg Ser Arg Gly Met Glu Val Met Pro Ser Leu Thr
 245 250 255

Leu Tyr Lys Pro Thr Ala Phe Met Glu Asp Ala Ser Ala Tyr Pro Gly
 260 265 270

Arg Asp Tyr Tyr Ser Phe Gln Met Ala Leu Ala Pro His Gly Arg Ile
 275 280 285

Lys Val Glu Ser Pro Ile Glu Phe Ala Gly Ser Ala Trp Gly Gly Pro
 290 295 300

Ser Arg Tyr Ser Glu Phe Pro Gly Phe Ser His Cys Gly Pro Ser Ala
 305 310 315 320

Asn Trp His Ser Leu Phe Glu Glu Gly Gln Ala Thr Ala Ser Tyr Thr
 325 330 335

Asp Ser Ser Leu Tyr Ser Tyr Pro Arg Ser His Val Pro Ala Gly Pro
 340 345 350

Asp Gly Glu Phe Ser Ala Glu Ala Trp Tyr Pro Ala Thr Ala Met Leu
 355 360 365

Gly Arg Val His Met Ala Val Pro Met Arg Pro Arg Met Thr His Gly
 370 375 380

Trp Thr Ala Thr Leu Gly Ile Arg Arg Arg Leu Gly Trp Thr Gly Val
 385 390 395 400

Glu Ser Thr Phe Tyr Pro Ile Asp Tyr Tyr Phe Pro Pro Gln Lys Pro
 405 410 415

Cys Leu Ser Cys Glu Asp Glu Ala Ser Gly Cys His Tyr Glu Ala Leu
 420 425 430

Thr Cys Gly Ser Cys Lys Val Phe Phe Lys Arg Ala Ala Glu Gly Asn
 435 440 445

Gln Lys Tyr Leu Cys Ala Ser Arg Asn Asp Cys Thr Ile Asp Lys Phe
 450 455 460

Arg Arg Lys Asn Cys Pro Ser Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Ala
 465 470 475 480

Gly Met Thr Leu Gly Ala Arg Lys Leu Lys Lys Leu Gly Asn Leu Lys
 485 490 495

Ala Gln Glu Glu Leu Glu Gly Ser Pro Gly Gln Ser Glu Gly Arg Glu
 500 505 510

Met Pro Pro Asn Met Ser Ile Pro Gln Leu Glu Gly Tyr Ser Cys Gln
 515 520 525

Pro Ile Phe Leu Asn Val Leu Glu Ala Ile Glu Pro Met Val Val Cys
 530 535 540

Ser Gly His Asp Asn Asn Gln Pro Asp Ser Phe Ala Leu Leu Leu Ser
 545 550 555 560

Ser Leu Asn Glu Leu Gly Glu Arg Gln Leu Val His Val Val Lys Trp
 565 570 575

Ala Lys Ala Leu Pro Gly Phe Arg Asn Leu His Val Asn Asp Gln Met
 580 585 590

Thr Val Ile Gln Tyr Ser Trp Met Gly Leu Met Ile Phe Ala Met Gly
 595 600 605

Trp Arg Ser Phe Lys Asn Val Asn Ser Arg Met Leu Tyr Phe Ala Pro
 610 615 620

Asp Leu Val Phe Asn Glu Tyr Arg Met His Lys Ser Arg Met Tyr Ser
 625 630 635 640

Gln Cys Val Arg Met Arg His Leu Ser Gln Glu Phe Gly Trp Leu Gln
 645 650 655

Val Thr Pro Glu Glu Phe Leu Cys Asp Glu Gly Pro Ser Ala Leu Ser
 660 665 670

Ile Ile Pro Val Glu Gly Leu Lys Asp Gln Lys Cys Phe Asp Glu Leu
 675 680 685

Arg Met Asn Tyr Ile Lys Glu Leu Asp Arg Val Ile Ser Cys Lys Arg
 690 695 700

Asn Asn Pro Ala Ser Ser Ser Pro Arg Phe Phe Asn Leu Pro Lys Leu
705 710 715 720

Leu Gly Ser Val Gln Pro Ile Asp Val Asn Leu Val Gln Phe Thr Phe
725 730 735

Gly Leu Phe Gly Lys Ala Gln Met Val Ser Val Asp Phe Pro Glu Met
740 745 750

Met Ser Glu Ile Ile Ser Val Gln Val Pro Lys Ile Leu Ser Gly Arg
755 760 765

Val Lys Pro Leu Tyr Phe His Ser Ser
770 775

<210> 12
<211> 895
<212> PRT
<213> Khi đuôi dài

<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 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

[illegible]

Thr Leu Glu Leu Pro Ser Thr Leu Ser Leu Tyr Lys Ser Gly Ala Leu
 325 330 335

Asp Glu Ala Ala Ala Tyr Gln Ser Arg Asp Tyr Tyr Asn Phe Pro Leu
 340 345 350

Ala Leu Ala Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Pro His Ala
 355 360 365

Arg Ile Lys Leu Glu Asn Pro Leu Asp Tyr Gly Ser Ala Trp Ala Ala
 370 375 380

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

Gly Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Ser Pro Ser Ala Ala Ala Ser Ser
 405 410 415

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

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

Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys Val Arg Met Arg His Leu Ser Gln
755 760 765

Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr Pro Gln Glu Phe Leu Cys Met Lys
770 775 780

Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile Ile Pro Val Asp Gly Leu Lys Asn Gln
785 790 795 800

Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met Asn Tyr Ile Lys Glu Leu Asp Arg
805 810 815

Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn Pro Thr Ser Cys Ser Arg Arg Phe
820 825 830

Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Ser Val Gln Pro Ile Ala Arg Glu
835 840 845

Leu His Gln Phe Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys Ser His Met Val Ser
850 855 860

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

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

<210> 13

<211> 895

<212> PRT

<213> Khi nâu

<400> 13

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

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

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

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

Ser Pro Arg Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly Glu Asp Gly Ser Pro
 65 70 75 80

Gln Ala His Arg Arg Gly Pro Thr Gly Tyr Leu Val Leu Asp Glu Glu
 85 90 95

Gln Gln Pro Ser Gln Pro Gln Ser Ala Pro Glu Cys His Pro Glu Arg
 100 105 110

Gly Cys Val Pro Glu Pro Gly Ala Ala Val Ala Ala Gly Lys Gly Leu
 115 120 125

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

Ser Thr Leu Ser Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro Gly Leu Ser Ser Cys
 145 150 155 160

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

Leu Gln Gln Gln Gln Gln Glu Ala Val Ser Glu Gly Ser Ser Ser Gly
 180 185 190

Arg Ala Arg Glu Ala Ser Gly Ala Pro Thr Ser Ser Lys Asp Asn Tyr
 195 200 205

Leu Glu Gly Thr Ser Thr Ile Ser Asp Ser Ala Lys Glu Leu Cys Lys
 210 215 220

Ala Val Ser Val Ser Met Gly Leu Gly Val Glu Ala Leu Glu His Leu
 225 230 235 240

Ser Pro Gly Glu Gln Leu Arg Gly Asp Cys Met Tyr Ala Pro Val Leu
 245 250 255

Gly Val Pro Pro Ala Val Arg Pro Thr Pro Cys Ala Pro Leu Ala Glu
260 265 270

Cys Lys Gly Ser Leu Leu Asp Asp Ser Ala Gly Lys Ser Thr Glu Asp
275 280 285

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

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

Thr Leu Glu Leu Pro Ser Thr Leu Ser Leu Tyr Lys Ser Gly Ala Leu
325 330 335

Asp Glu Ala Ala Ala Tyr Gln Ser Arg Asp Tyr Tyr Asn Phe Pro Leu
340 345 350

Ala Leu Ala Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Pro His Ala
355 360 365

Arg Ile Lys Leu Glu Asn Pro Leu Asp Tyr Gly Ser Ala Trp Ala Ala
370 375 380

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

Gly Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Ser Pro Ser Ala Ala Ala Ser Ser
405 410 415

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

Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly
435 440 445

Glu Ala Gly Ala Val Ala Pro Tyr Gly Tyr Thr Arg Pro Pro Gln Gly
450 455 460

Leu Ala Gly Gln Glu Gly Asp Phe Thr Ala Pro Asp Val Trp Tyr Pro
465 470 475 480

Gly Gly Met Val Ser Arg Val Pro Tyr Pro Ser Pro Thr Cys Val Lys
 485 490 495

Ser Glu Met Gly Pro Trp Met Asp Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Gly Asp
 500 505 510

Met Arg Leu Glu Thr Ala Arg Asp His Val Leu Pro Ile Asp Tyr Tyr
 515 520 525

Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys Leu Ile Cys Gly Asp Glu Ala Ser Gly
 530 535 540

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

Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln Lys Tyr Leu Cys Ala Ser Arg Asn Asp
 565 570 575

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

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

Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu Gln Glu Glu Gly Glu Ala Ser Ser Thr
 610 615 620

Thr Ser Pro Thr Glu Glu Thr Ala Gln Lys Leu Thr Val Ser His Ile
 625 630 635 640

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

Glu Pro Gly Val Val Cys Ala Gly His Asp Asn Asn Gln Pro Asp Ser
 660 665 670

Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn Glu Leu Gly Glu Arg Gln Leu
 675 680 685

Val His Val Val Lys Trp Ala Lys Ala Leu Pro Gly Phe Arg Asn Leu
690 695 700

His Val Asp Asp Gln Met Ala Val Ile Gln Tyr Ser Trp Met Gly Leu
705 710 715 720

Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg Ser Phe Thr Asn Val Asn Ser Arg
725 730 735

Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp Leu Val Phe Asn Glu Tyr Arg Met His
740 745 750

Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys Val Arg Met Arg His Leu Ser Gln
755 760 765

Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr Pro Gln Glu Phe Leu Cys Met Lys
770 775 780

Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile Ile Pro Val Asp Gly Leu Lys Asn Gln
785 790 795 800

Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met Asn Tyr Ile Lys Glu Leu Asp Arg
805 810 815

Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn Pro Thr Ser Cys Ser Arg Arg Phe
820 825 830

Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Ser Val Gln Pro Ile Ala Arg Glu
835 840 845

Leu His Gln Phe Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys Ser His Met Val Ser
850 855 860

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

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

<210> 14
<211> 911

<212> PRT

<213> Hắc tinh tinh

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

195	200	205
Arg Glu Ala Ser Gly Ala Pro Thr Ser Ser Lys Asp Asn Tyr Leu Gly		
210	215	220
Gly Thr Ser Thr Ile Ser Asp Ser Ala Lys Glu Leu Cys Lys Ala Val		
225	230	235 240
Ser Val Ser Met Gly Leu Gly Val Glu Ala Leu Glu His Leu Ser Pro		
	245	250 255
Gly Glu Gln Leu Arg Gly Asp Cys Met Tyr Ala Pro Leu Leu Gly Val		
	260	265 270
Pro Pro Ala Val Arg Pro Thr Pro Cys Ala Pro Leu Ala Glu Cys Lys		
	275	280 285
Gly Ser Leu Leu Asp Asp Ser Ala Gly Lys Ser Thr Glu Asp Thr Ala		
290	295	300
Glu Tyr Ser Pro Phe Lys Gly Gly Tyr Thr Lys Gly Leu Glu Gly Glu		
305	310	315 320
Ser Leu Gly Cys Ser Gly Ser Ala Ala Ala Gly Ser Ser Gly Thr Leu		
	325	330 335
Glu Leu Pro Ser Thr Leu Ser Leu Tyr Lys Ser Gly Ala Leu Asp Glu		
	340	345 350
Ala Ala Ala Tyr Gln Ser Arg Asp Tyr Tyr Asn Phe Pro Leu Ala Leu		
	355	360 365
Ala Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Pro His Ala Arg Ile		
370	375	380
Lys Leu Glu Asn Pro Leu Asp Tyr Gly Ser Ala Trp Ala Ala Ala Ala		
385	390	395 400
Ala Gln Cys Arg Tyr Gly Asp Leu Ala Ser Leu His Gly Ala Gly Ala		
	405	410 415

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

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

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

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> Khi đầu chó Hamadryas

<400> 15

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

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

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

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

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

Gln Ala His Arg Arg Gly Pro Thr Gly Tyr Leu Val Leu Asp Glu Glu
85 90 95

Gln Gln Pro Ser Gln Pro Gln Ser Ala Pro Glu Cys His Pro Glu Arg
100 105 110

Gly Cys Val Pro Glu Pro Gly Ala Ala Val Ala Ala Gly Lys Gly Leu
115 120 125

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

Ser Thr Leu Ser Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro Gly Leu Ser Ser Cys
 145 150 155 160

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

Leu Gln Gln Gln Gln Gln Glu Ala Val Ser Glu Gly Ser Ser Ser Gly
 180 185 190

Arg Ala Arg Glu Ala Ser Gly Ala Pro Thr Ser Ser Lys Asp Asn Tyr
 195 200 205

Leu Gly Gly Thr Ser Thr Ile Ser Asp Ser Ala Lys Glu Leu Cys Lys
 210 215 220

Ala Val Ser Val Ser Met Gly Leu Gly Val Glu Ala Leu Glu His Leu
 225 230 235 240

Ser Pro Gly Glu Gln Leu Arg Gly Asp Cys Met Tyr Ala Pro Val Leu
 245 250 255

Gly Val Pro Pro Ala Val Arg Pro Thr Pro Cys Ala Pro Leu Ala Glu
 260 265 270

Cys Lys Gly Ser Leu Leu Asp Asp Ser Ala Gly Lys Ser Thr Glu Asp
 275 280 285

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

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

Thr Leu Glu Leu Pro Ser Thr Leu Ser Leu Tyr Lys Ser Gly Ala Leu
 325 330 335

Asp Glu Ala Ala Ala Tyr Gln Ser Arg Asp Tyr Tyr Asn Phe Pro Leu
 340 345 350

Ala Leu Ala Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Pro His Ala
 355 360 365

Arg Ile Lys Leu Glu Asn Pro Leu Asp Tyr Gly Ser Ala Trp Ala Ala
 370 375 380

Ala Ala Ala Gln Cys Arg Tyr Gly Glu Leu Ala Ser Leu His Gly Ala
 385 390 395 400

Gly Ala Ala Gly Pro Gly Ser Gly Ser Pro Ser Ala Ala Ala Ser Ser
 405 410 415

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

Cys Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Gly
 435 440 445

Glu Ala Gly Ala Val Ala Pro Tyr Gly Tyr Thr Arg Pro Pro Gln Gly
 450 455 460

Leu Ala Gly Gln Glu Gly Asp Phe Thr Ala Pro Asp Val Trp Tyr Pro
 465 470 475 480

Gly Gly Met Val Ser Arg Val Pro Tyr Pro Ser Pro Thr Cys Val Lys
 485 490 495

Ser Glu Met Gly Pro Trp Met Asp Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Gly Asp
 500 505 510

Met Arg Leu Glu Thr Ala Arg Asp His Val Leu Pro Ile Asp Tyr Tyr
 515 520 525

Phe Pro Pro Gln Lys Thr Cys Leu Ile Cys Gly Asp Glu Ala Ser Gly
 530 535 540

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

Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln Lys Tyr Leu Cys Ala Ser Arg Asn Asp
 565 570 575

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

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

Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu Gln Glu Glu Gly Glu Ala Ser Ser Thr
 610 615 620

Thr Ser Pro Thr Glu Glu Thr Ala Gln Lys Leu Thr Val Ser His Ile
 625 630 635 640

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

Glu Pro Gly Val Val Cys Ala Gly His Asp Asn Asn Gln Pro Asp Ser
 660 665 670

Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn Glu Leu Gly Glu Arg Gln Leu
 675 680 685

Val His Val Val Lys Trp Ala Lys Ala Leu Pro Gly Phe Arg Asn Leu
 690 695 700

His Val Asp Asp Gln Met Ala Val Ile Gln Tyr Ser Trp Met Gly Leu
 705 710 715 720

Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg Ser Phe Thr Asn Val Asn Ser Arg
 725 730 735

Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp Leu Val Phe Asn Glu Tyr Arg Met His
 740 745 750

Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys Val Arg Met Arg His Leu Ser Gln
 755 760 765

Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr Pro Gln Glu Phe Leu Cys Met Lys
 770 775 780

Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile Ile Pro Val Asp Gly Leu Lys Asn Gln
 785 790 795 800

Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met Asn Tyr Ile Lys Glu Leu Asp Arg
 805 810 815

Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn Pro Thr Ser Cys Ser Arg Arg Phe
 820 825 830

Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Ser Val Gln Pro Ile Ala Arg Glu
 835 840 845

Leu His Gln Phe Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys Ser His Met Val Ser
 850 855 860

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

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

<210> 16
 <211> 896
 <212> PRT
 <213> Lợn nhà

<400> 16

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

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

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

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

Ser Pro Arg Arg Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Pro Ser Glu Asp Gly
 65 70 75 80

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

Glu Lys Gln Gln Pro Ser Gln Gln Gln Ser Ala Pro Glu Cys His Pro
 100 105 110

Glu Ser Gly Cys Thr Pro Glu Pro Gly Ala Ala Ser Ala Ala Ser Lys
 115 120 125

Gly Leu Gln Gln Gln Pro Pro Ala Pro Pro Asp Glu Asp Asp Ser Ala
 130 135 140

Ala Pro Ser Thr Leu Ser Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro Gly Leu Ser
 145 150 155 160

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

Gln Leu Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Glu Ala Val
 180 185 190

Ser Glu Gly Asn Ser Ser Gly Arg Ala Arg Glu Ala Thr Gly Ala Pro
 195 200 205

Ile Ser Ser Lys Asp Ser Tyr Leu Gly Gly Ser Ser Thr Ile Ser Asp
 210 215 220

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

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

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

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

275					280					285					
Pro	Gly	Lys	Ser	Asn	Glu	Glu	Thr	Ala	Glu	Tyr	Ser	Pro	Phe	Lys	Ala
	290					295					300				
Gly	Tyr	Thr	Lys	Gly	Leu	Asp	Ser	Glu	Ser	Leu	Gly	Cys	Ser	Ser	Gly
305					310					315					320
Gly	Glu	Ala	Gly	Gly	Ser	Gly	Thr	Leu	Glu	Leu	Pro	Ser	Ala	Leu	Ser
				325					330					335	
Leu	Tyr	Lys	Ser	Gly	Ala	Leu	Asp	Asp	Val	Ala	Ala	Tyr	Pro	Ser	Arg
			340					345					350		
Asp	Tyr	Tyr	Asn	Phe	Pro	Leu	Ala	Leu	Ala	Gly	Pro	Pro	Pro	Pro	Pro
		355					360					365			
Pro	Pro	Pro	His	Pro	His	Ala	Arg	Ile	Lys	Leu	Glu	Asn	Pro	Leu	Asp
	370					375					380				
Tyr	Gly	Ser	Ala	Trp	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Gln	Cys	Arg	Tyr	Gly	Asp
385					390					395					400
Leu	Ala	Ser	Leu	His	Gly	Gly	Gly	Ala	Pro	Gly	Pro	Gly	Ser	Gly	Ser
				405					410					415	
Pro	Ser	Ala	Thr	Ser	Ser	Ser	Ser	Trp	His	Thr	Leu	Phe	Thr	Ala	Glu
			420					425					430		
Glu	Ser	Gln	Leu	Tyr	Gly	Pro	Cys	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala
		435					440					445			
Gly	Glu	Ala	Gly	Ala	Val	Ala	Pro	Tyr	Gly	Tyr	Thr	Arg	Pro	Pro	Gln
	450					455					460				
Gly	Leu	Ala	Gly	Gln	Glu	Gly	Asp	Leu	Ala	Ile	Pro	Asp	Ile	Trp	Tyr
465					470					475					480
Pro	Gly	Gly	Val	Val	Ser	Arg	Val	Pro	Tyr	Pro	Ser	Pro	Ser	Cys	Val
				485					490					495	

Lys Ser Glu Met Gly Pro Trp Met Glu Ser Tyr Ser Gly Pro Tyr Gly
 500 505 510

Asp Met Arg Leu Glu Pro Thr Arg Asp His Val Leu Pro Ile Asp Tyr
 515 520 525

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

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

Lys Arg Ala Ala Glu Gly Lys Gln Lys Tyr Leu Cys Ala Ser Arg Asn
 565 570 575

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

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

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

Ala Thr Ser Pro Thr Glu Glu Pro Ala Gln Lys Leu Thr Val Ser His
 625 630 635 640

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

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

Ser Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn Glu Leu Gly Glu Arg Gln
 675 680 685

Leu Val His Val Val Lys Trp Ala Lys Ala Leu Pro Gly Phe Arg Asn
 690 695 700

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

```

705                               710                               715                               720

Leu Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg Ser Phe Thr Asn Val Asn Ser
              725                               730                               735

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

His Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys Val Arg Met Arg His Leu Ser
              755                               760                               765

Gln Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr Pro Gln Glu Phe Leu Cys Met
              770                               775                               780

Lys Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile Ile Pro Val Asp Gly Leu Lys Asn
              785                               790                               795                               800

Gln Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met Asn Tyr Ile Lys Glu Leu Asp
              805                               810                               815

Arg Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn Pro Thr Ser Cys Ser Arg Arg
              820                               825                               830

Phe Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Ser Val Gln Pro Ile Ala Arg
              835                               840                               845

Glu Leu His Gln Phe Thr Phe Asp Leu Leu Ile Lys Ser His Met Val
              850                               855                               860

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

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

<210> 17
<211> 709
<212> PRT
<213> Tho

<400> 17

```

His His Gln Gln Gln Gln Asp Ala Ala Thr Glu Gly Ser Ser Ser Gly
 1 5 10 15
 Arg Ala Arg Arg Pro Ser Gly Ala Ser Thr Ser Ser Lys Asp Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Gly Ser Thr Ser Val Ile Ser Asp Ser Ala Lys Glu Leu Cys Lys
 35 40 45
 Ala Val Ser Val Ser Leu Gly Leu Gly Val Glu Ala Leu Glu His Leu
 50 55 60
 Ser Ser Gly Glu Gln Leu Arg Gly Asp Cys Met Tyr Ala Pro Leu Leu
 65 70 75 80
 Gly Gly Pro Pro Val Val Arg Pro Thr Pro Cys Leu Pro Leu Val Glu
 85 90 95
 Cys Lys Gly Ser Leu Leu Asp Asp Gly Pro Gly Lys Gly Thr Glu Glu
 100 105 110
 Thr Ala Glu Tyr Thr Pro Phe Lys Gly Gly Tyr Asn Lys Gly Leu Glu
 115 120 125
 Ala Glu Ser Leu Gly Cys Ser Gly Ser Gly Glu Ala Gly Ser Ser Gly
 130 135 140
 Thr Leu Glu Leu Pro Ser Thr Leu Ser Leu Tyr Lys Ser Gly Thr Leu
 145 150 155 160
 Asp Glu Ala Ala Ala Tyr Gln Thr Arg Asp Tyr Tyr Asn Phe Pro Leu
 165 170 175
 Ala Leu Ala Gly Gln Pro Pro Pro Pro His Pro Arg Arg Ile Lys Leu
 180 185 190
 Glu Asn Pro Leu Asp Tyr Gly Ser Ala Trp Ala Ala Ala Ala Gln
 195 200 205
 Cys Arg Tyr Gly Asp Leu Ala Ser Leu His Gly Gly Gly Ala Ala Gly
 210 215 220

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

Gly Glu Ser Ser Ser Ala Ser Ser Pro Thr Glu Asp Thr Thr Gln Lys
 435 440 445

Leu Thr Val Ser His Ile Glu Gly Tyr Glu Cys Gln Pro Ile Phe Leu
 450 455 460

Asn Val Leu Glu Ala Ile Glu Pro Gly Val Val Cys Ala Gly His Asp
 465 470 475 480

Asn Asn Gln Pro Asp Ser Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser Leu Asn Glu
 485 490 495

Leu Gly Glu Arg Gln Leu Val His Val Val Lys Trp Ala Lys Ala Leu
 500 505 510

Pro Gly Phe Arg Asn Leu His Val Asp Asp Gln Met Ala Val Ile Gln
 515 520 525

Tyr Ser Trp Met Gly Leu Met Val Phe Ala Met Gly Trp Arg Ser Phe
 530 535 540

Thr Asn Val Asn Ser Arg Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp Leu Val Phe
 545 550 555 560

Asn Glu Tyr Arg Met His Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln Cys Val Arg
 565 570 575

Met Arg His Leu Ser Gln Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr Pro Gln
 580 585 590

Glu Phe Leu Cys Met Lys Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile Ile Pro Val
 595 600 605

Asp Gly Leu Lys Asn Gln Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg Met Asn Tyr
 610 615 620

Ile Lys Glu Leu Asp Arg Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys Asn Pro Thr
 625 630 635 640

Ser Cys Ser Arg Arg Phe Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu Asp Ser Val
 645 650 655

Gln Pro Ile Ala Arg Glu Leu His Gln Phe Thr Phe Asp Leu Leu Ile
 660 665 670

Lys Ser His Met Val Ser Val Asp Phe Pro Glu Met Met Ala Glu Ile
 675 680 685

Ile Ser Val Gln Val Pro Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val Lys Pro Ile
 690 695 700

Tyr Phe His Thr Gln
 705

<210> 18
 <211> 2760
 <212> ADN
 <213> Người thông tuệ

<400> 18
 atggaagtgc agttagggct gggaagggtc taccctcggc cgccgtccaa gacctaccga 60
 ggagctttcc agaatctggt ccagagcgtg cgcgaagtga tccagaaccc gggccccagg 120
 caccagagg ccgcgagcgc agcacctccc ggcgccagtt tgctgctgct gcagcagcag 180
 cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcaa 240
 gagactagcc ccaggcagca gcagcagcag caggggtgagg atggttctcc ccaagcccat 300
 cgtagaggcc ccacaggcta cctggtcctg gatgaggaac agcaaccttc acagccgcag 360
 tcggccctgg agtgccaccc cgagagaggt tgcgtcccag agcctggagc cgccgtggcc 420
 gccagcaagg ggctgccgca gcagctgcca gcacctccg acgaggatga ctccagctgcc 480
 ccatccacgt tgtccctgct gggccccact ttccccggct taagcagctg ctccgctgac 540
 cttaaagaca tcctgagcga ggccagcacc atgcaactcc ttcagcaaca gcagcaggaa 600
 gcagtatccg aaggcagcag cagcgggaga gcgagggagg cctcgggggc tcccacttcc 660
 tccaaggaca attacttagg gggcacttcg accatttctg acaacgcaa ggagttgtgt 720
 aaggcagtgt cgggtgtccat gggcctgggt gtggaggcgt tggagcatct gagtccaggg 780
 gaacagcttc ggggggattg catgtacgcc ccacttttgg gagttccacc cgctgtgcgt 840
 cccactcctt gtgccccatt ggccgaatgc aaaggttctc tgotagacga cagcgcaggg 900

aagagcactg aagatactgc tgagtattcc cctttcaagg gaggttacac caaagggcta	960
gaaggcgaga gcctaggctg ctctggcagc gctgcagcag ggagctccgg gacacttgaa	1020
ctgccgtcta ccctgtctct ctacaagtcc ggagcactgg acgaggcagc tgcgtaccag	1080
agtgcgcgact actacaactt tccactggct ctggccggac cgccgcccc tccgcgcct	1140
ccccatcccc acgctcgcat caagctggag aaccgcgtgg actacggcag cgcttggcg	1200
gctgcggcgg cgcagtgccg ctatggggac ctggcgagcc tgcattggcg ggggtgcagcg	1260
ggacccggtt ctgggtcacc ctacgccgc gcttcctcat cctggcacac tctcttcaca	1320
gccgaagaag gccagttgta tggaccgtgt ggtggtggtg ggggtggtgg cggcggcggc	1380
ggcggcggcg gcggcggcgg cgcggcggcg ggcggcgcg aggcgggagc tgtagcccc	1440
tacggctaca ctcgcccc tcaggggctg gcgggccagg aaagcgactt caccgcacct	1500
gatgtgtggt accctggcgg catggtgagc agagtgcct atcccagtc cacttgtgtc	1560
aaaagcgaaa tgggcccctg gatggatagc tactccggac cttacgggga catgcgtttg	1620
gagactgcca gggacatgt tttgcccatt gactattact ttccaccca gaagacctgc	1680
ctgatctgtg gagatgaagc ttctgggtgt cactatggag ctctcacatg tggaagctgc	1740
aaggtcttct tcaaaagagc cgctgaaggg aacagaagt acctgtgcgc cagcagaaat	1800
gattgcacta ttgataaatt ccgaaggaaa aattgtccat cttgtcgtct tcggaaatgt	1860
tatgaagcag ggatgactct gggagcccgg aagctgaaga aacttggtta totgaaacta	1920
caggaggaag gagaggcttc cagcaccacc agccccactg aggagacaac ccagaagctg	1980
acagtgtcac acattgaagg ctatgaatgt cagcccatct ttctgaatgt cctggaagcc	2040
attgagccag gtgtagtgtg tgctggacac gacaacaacc agcccgactc ctttgcagcc	2100
ttgctctota gcctcaatga actgggagag agacagcttg tacacgtggt caagtgggcc	2160
aaggccttgc ctggcttccg caacttacac gtggacgacc agatggctgt cattcagtac	2220
tcctggatgg ggctcatggt gtttgccatg ggctggcgat ccttcaccaa tgtcaactcc	2280
aggatgctct acttcgcccc tgatctggtt ttcaatgagt accgcatgca caagtcccgg	2340
atgtacagcc agtgtgtccg aatgaggcac ctctctcaag agtttggtat gctccaaatc	2400
acccccagg aattcctgtg catgaaagca ctgctactct tcagcattat tccagtggat	2460
gggctgaaaa atcaaaaatt ctttgatgaa cttcgaatga actacatcaa ggaactcgat	2520

cgtatcattg catgcaaaag aaaaaatccc acatcctgct caagacgctt ctaccagctc 2580
 accaagctcc tggactccgt gcagcctatt gcgagagagc tgcatacagtt cactttttgac 2640
 ctgctaataca agtcacacat ggtgagcgtg gacttttccgg aaatgatggc agagatcatc 2700
 tctgtgcaag tgcccaagat ccttttctggg aaagtcaagc ccatctatctt ccacacccag 2760

<210> 19
 <211> 2760
 <212> ADN
 <213> Người thông tuệ

<400> 19
 atggaagtgc agttagggct gggaaggggc taccctcggc cgccgtccaa gacctaccga 60
 ggagctttcc agaattctgtt ccagagcgtg cgcgaagtga tccagaaccc gggccccagg 120
 caccagagg ccgcgagcgc agcacctccc ggcgccagtt tgctgctgct gcagcagcag 180
 cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcaa 240
 gagactagcc ccaggcagca gcagcagcag cagggtgagg atggttcttc ccaagcccat 300
 cgtagaggcc ccacaggcta cctggctcctg gatgaggaac agcaaccttc acagccgcag 360
 tcggccctgg agtgccaccc cgagagaggt tgcgtcccag agcctggagc cgccgtggcc 420
 gccagcaagg ggctgccgca gcagctgccg gcacctccgg acgaggatga ctgagctgcc 480
 ccatccacgt tgtccctgct gggccccact ttcccggct taagcagctg ctccgctgac 540
 cttaaagaca tcctgagcga ggccagcacc atgcaactcc ttcagcaaca gcagcaggaa 600
 gcagtatccg aaggcagcag cagcgggaga gcgagggagg cctcgggggc tcccacttcc 660
 tocaaggaca attacttagg gggcacttcg accatttctg acaacgcaa ggagttgtgt 720
 aaggcagtgt cgggtgtccat gggcctgggt gtggaggcgt tggagcatct gagtccaggg 780
 gaacagcttc ggggggattg catgtacgcc ccacttttgg gagttccacc cgtgtgtcgt 840
 cccactcctt gtgccccatt ggccgaatgc aaaggttctc tgctagacga cagcgcaggc 900
 aagagcactg aagatactgc tgagtattcc cctttcaagg gaggttacac caaagggcta 960
 gaaggcgaga gcctaggctg ctctggcagc gctgcagcag ggagctccgg gacacttgaa 1020
 ctgcggtcta ccctgtctct ctacaagtcc ggagcactgg acgaggcagc tgcgtaccag 1080
 agtcgcgact actacaactt tccactggct ctggccggac cgccgcccc tccgcccct 1140
 ccccatcccc acgctcgcac caagctggag aaccgctgg actacggcag cgctggggcg 1200

gctgcggcgg cgcagtgccg ctatggggac ctggcgagcc tgcattggcg gggcgcagcg	1260
ggacccgggt ctgggtcacc ctacgcccgc gcttcctcat cctggcacac tctcttcaca	1320
gccgaagaag gccagttgta tggaccgtgt ggtggtggtg ggggtggtgg cggcggcggc	1380
ggcggcggcg gcggcggcgg cggcggcggc ggccggcggc aggcgggagc ttagaccccc	1440
tacggctaca ctccgcccc tcaggggctg gcgggccagg aaagcgactt caccgcacct	1500
gatgtgtggt accctggcgg catggtgagc agagtgcctt atcccagtcc cacttgtgtc	1560
aaaagcgaat tgggcccctg gatggatagc tactccggac cttacgggga catgcgtttg	1620
gagactgcca gggaccatgt tttgccatt gactattact ttccaccca gaagacctgc	1680
ctgatctgtg gagatgaagc ttctgggtgt cactatggag ctctcacatg tggaagctgc	1740
aaggtcttct tcaaaagagc cgctgaagg aaacagaagt acctgtgcgc cagcagaaat	1800
gattgcacta ttgataaatt ccgaaggaaa aattgtccat cttgtcgtct tcggaaatgt	1860
tatgaagcag ggatgactct gggagcccgg aagctgaaga aacttggtta tctgaaacta	1920
caggaggaag gagaggcttc cagcaccacc agccccactg aggagacaac ccagaagctg	1980
acagtgtcac acattgaagg ctatgaatgt cagcccatct ttctgaatgt cctggaagcc	2040
attgagccag gtgtagtgtg tgctggacac gacaacaacc agcccgactc ctttgcagcc	2100
ttgctctcta gcctcaatga actgggagag agacagcttg tacacgtggt caagtgggcc	2160
aaggccttgc ctggcttccg caacttacac gtggacgacc agatggctgt cattcagtac	2220
tcctggatgg ggctcatggt gtttgccatg ggctggcgat ccttcaccaa tgtcaactcc	2280
aggatgctct acttggcccc tgatctgggt ttcaatgagt accgcatgca caagtcccgg	2340
atgtacagcc agtgtgtccg aatgaggcac ctctctcaag agtttggtat gctccaaatc	2400
acccccaggg aattcctgtg catgaaagca ctgctactct tcagcattat tccagtggat	2460
gggctgaaaa atcaaaaatt ctttgatgaa cttcgaatga actacatcaa ggaactcgat	2520
cgtatcattg catgcaaaag aaaaaatccc acatcctgct caagacgctt ctaccagctc	2580
accaagctcc tggactccgt gcagcctatt gcgagagagc tgcattcagct cacttttgac	2640
ctgctaatac agtcacacat ggtgagcgtg gactttccgg aaatgatggc agagatcatc	2700
tctgtgcaag tgcccaagat cttttctggg aaagtcaagc ccattctattt ccacaccag	2760

<210> 20
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự mỗi

<400> 20
 agagactcag aggcgaccat 20

<210> 21
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự mỗi

<400> 21
 atcagcaaac acagcagctc 20

<210> 22
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự mỗi

<400> 22
 agagctgttg gatgaggacc agaa 24

<210> 23
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự mỗi

<400> 23
 aggctccaaa ggcacttgac tact 24

<210> 24
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự mỗi

<400> 24

gaccaagcgg gttgttattg a

21

<210> 25

<211> 23

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự mỗi

<400> 25

tgcccttgctg gtcataatttt tca

23

<210> 26

<211> 20

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự mỗi

<400> 26

cggagaacca aacggaaagg

20

<210> 27

<211> 19

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự mỗi

<400> 27

cttcgcccac agtgaatgc

19

<210> 28

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự mỗi

<400> 28

acagcagccg gtttattgtg cttc

24

<210> 29
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự mỗi

<400> 29
 tggcattcag tctcacacca ctgt

24

<210> 30
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự mỗi

<400> 30
 accactcacc atcatctcaa ggca

24

<210> 31
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự mỗi

<400> 31
 tgctcttctt tgccagatcc tcgt

24

<210> 32
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự mỗi

<400> 32
 gccttaccct tgcagcttac

20

<210> 33
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự mỗi

<400> 33
gagcatgctg tccactctgt 20

<210> 34
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự mỗi

<400> 34
cttgcgcatc cccaagtcag atgt 24

<210> 35
<211> 24
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự mỗi

<400> 35
tttctctctcc ttctcgtgct gctt 24

<210> 36
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự mỗi

<400> 36
gagcctgcta cagatgggtca 20

<210> 37
<211> 20
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự mỗi

<400> 37
tgtctaccag caggacgaag 20

<210> 38
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự mới

<400> 38
 cctcctgaag aatcgattcc 20

<210> 39
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự mới

<400> 39
 gaggtccaca cactgaagtt 20

<210> 40
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự mới

<400> 40
 tttctgggct ggccaaacat aagc 24

<210> 41
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự mới

<400> 41
 acacaaggta atgtgtgggt ccga 24

<210> 42
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự mỗi

<400> 42

cggcaggtgt ttgtgtgtgg aaat

24

<210> 43

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự mỗi

<400> 43

agaagacaca cagcacagca gaca

24

<210> 44

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự mỗi

<400> 44

tagtgaaacc agtgtgtctg ccca

24

<210> 45

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự mỗi

<400> 45

agcgttcagc acttctgagg tctt

24

<210> 46

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự mỗi

<400> 46

cgctctgggt catctgctct g

21

<210> 47
 <211> 22
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự mỗi

<400> 47
 tcatcaaagg tgctctcgtc tg

22

<210> 48
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự mỗi

<400> 48
 tggagaggaa gttcagccat caga

24

<210> 49
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự mỗi

<400> 49
 aggagagctg ctttcgctta gtct

24

<210> 50
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự mỗi

<400> 50
 acctgctcag cctttgtctc tgat

24

<210> 51
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự mỗi

<400> 51

agatccaggc ttgcttactg tcct

24

<210> 52

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự mỗi

<400> 52

attctgggtt gggagtgcaa ggaa

24

<210> 53

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự mỗi

<400> 53

aggagacatg cccaggatga aaca

24

<210> 54

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự mỗi

<400> 54

actaggcagg acattgacat ccca

24

<210> 55

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự mỗi

<400> 55

acagtaaacc tctccacaca tggc

24

<210> 56
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự mỗi

<400> 56
 tatgacaccc agggcttttcg ttca

24

<210> 57
 <211> 24
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự mỗi

<400> 57
 taacgttccc tgcgcgttta caga

24

<210> 58
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự mỗi

<400> 58
 tcccaaattcc tgacccca

18

<210> 59
 <211> 20
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự mỗi

<400> 59
 accacacagc ccctaggaga

20

<210> 60
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự mỗi

<400> 60

acaggggtggc ccaaataagaa c

21

<210> 61

<211> 21

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự mỗi

<400> 61

cctgtcttgg acaagcggag a

21

<210> 62

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự mỗi

<400> 62

gggtcatttc caccacctca aaca

24

<210> 63

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự mỗi

<400> 63

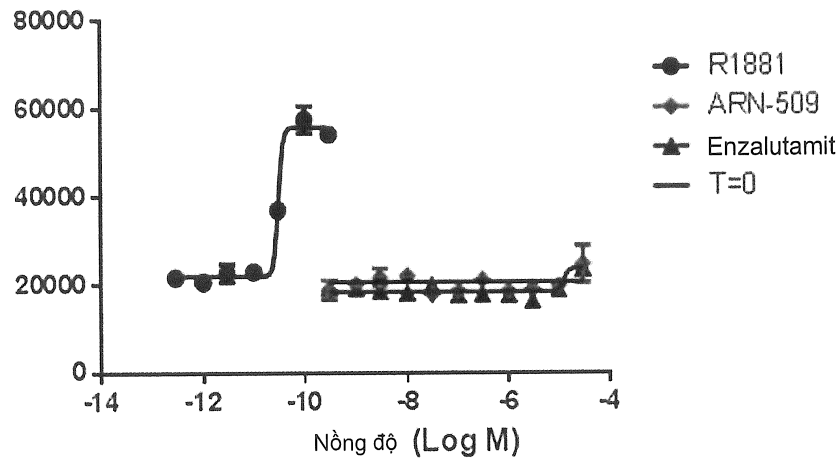
ggagaaaggc cttacagtag tctc

24

FIG. 1A

LNCaP

Hoạt tính luciferraza tương đối

**LNCaP ARN-509r1**

Hoạt tính Luciferraza tương đối

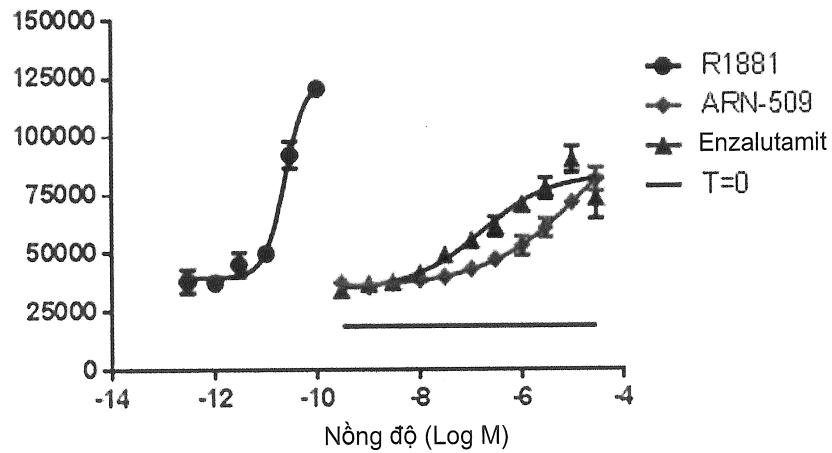


FIG. 1B

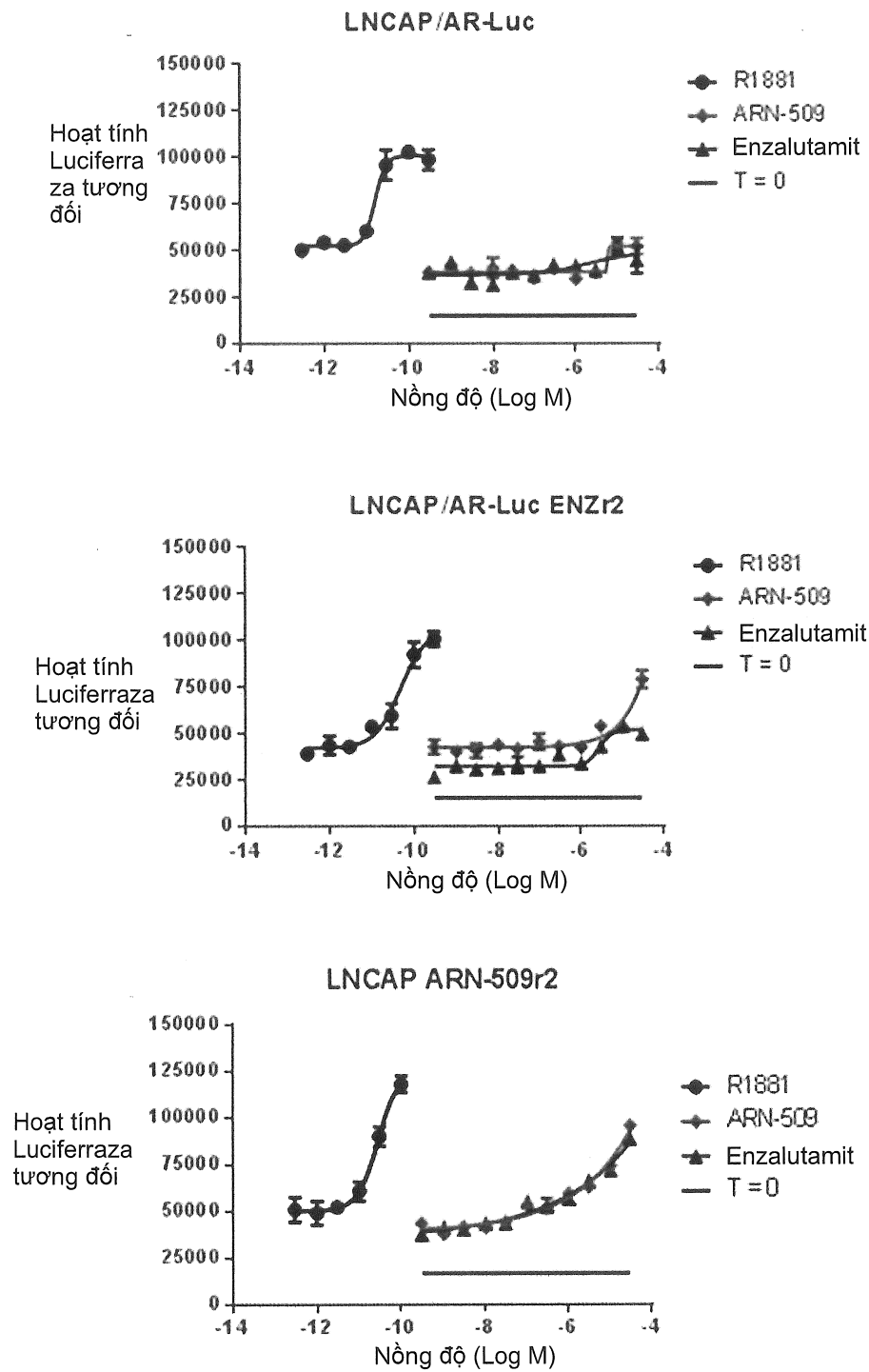


FIG. 1C

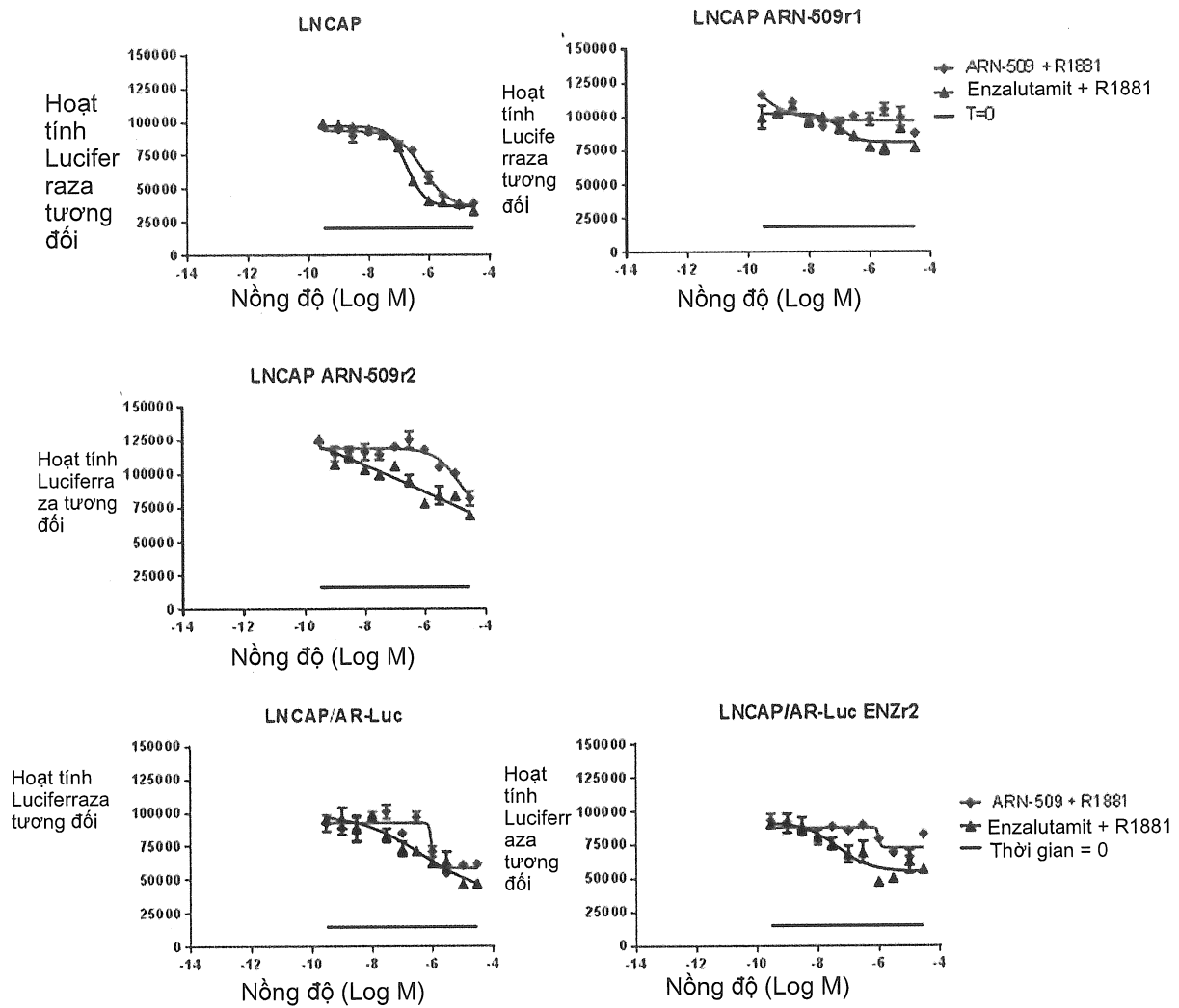


FIG. 1D

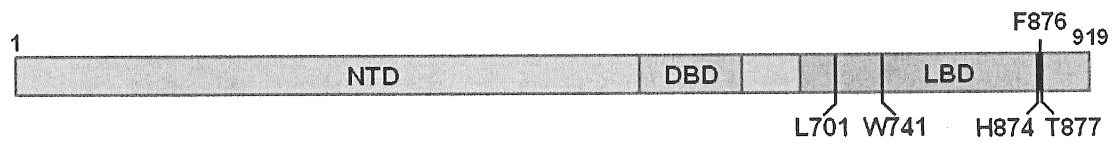


FIG. 2

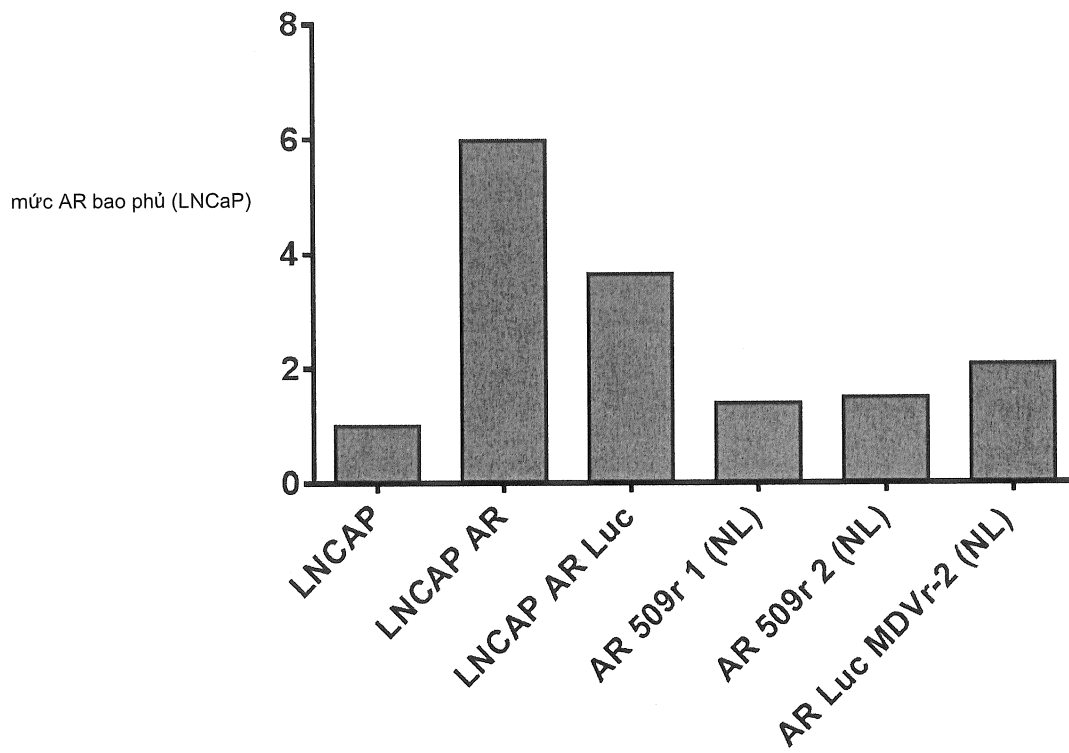


FIG. 3A

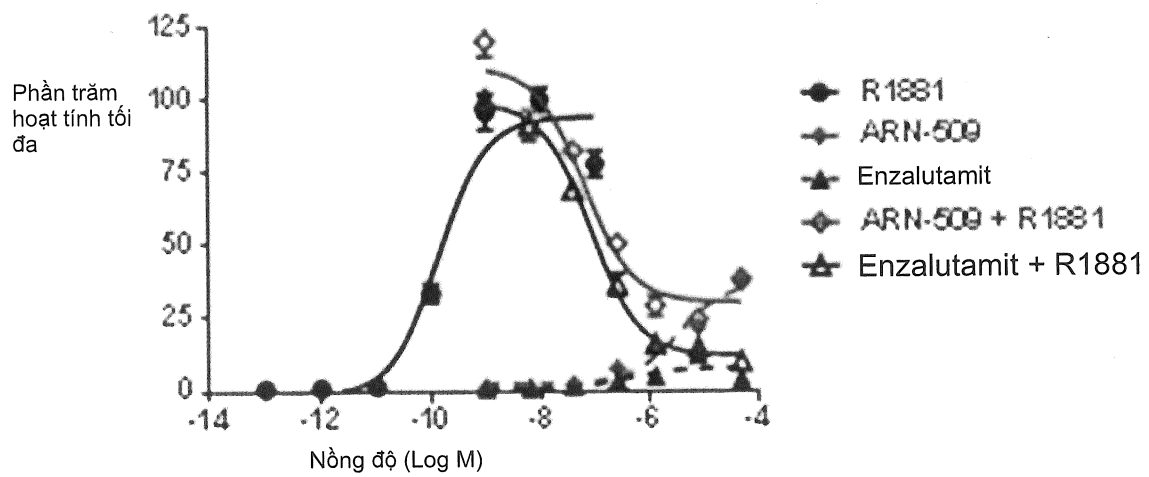
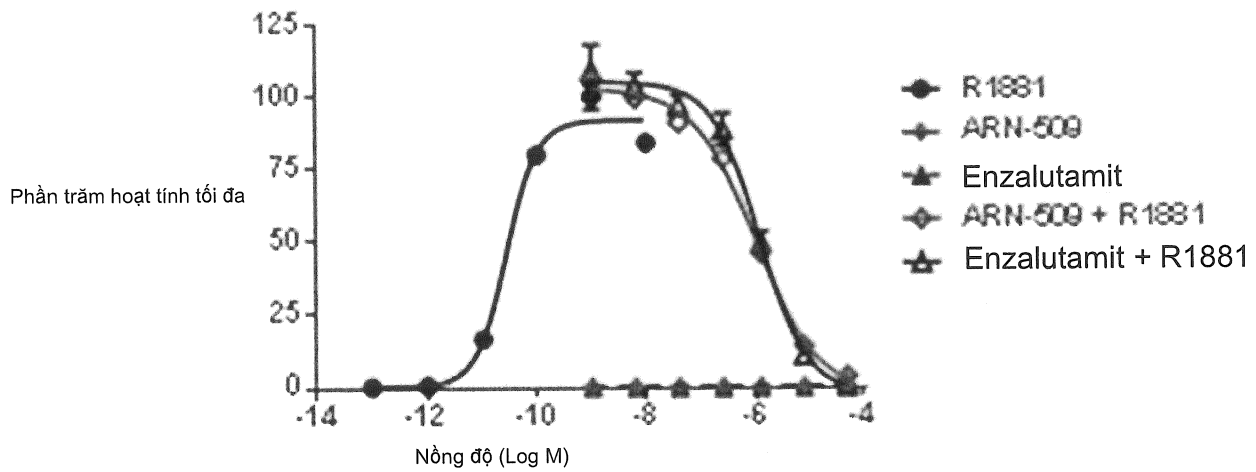


FIG. 3B

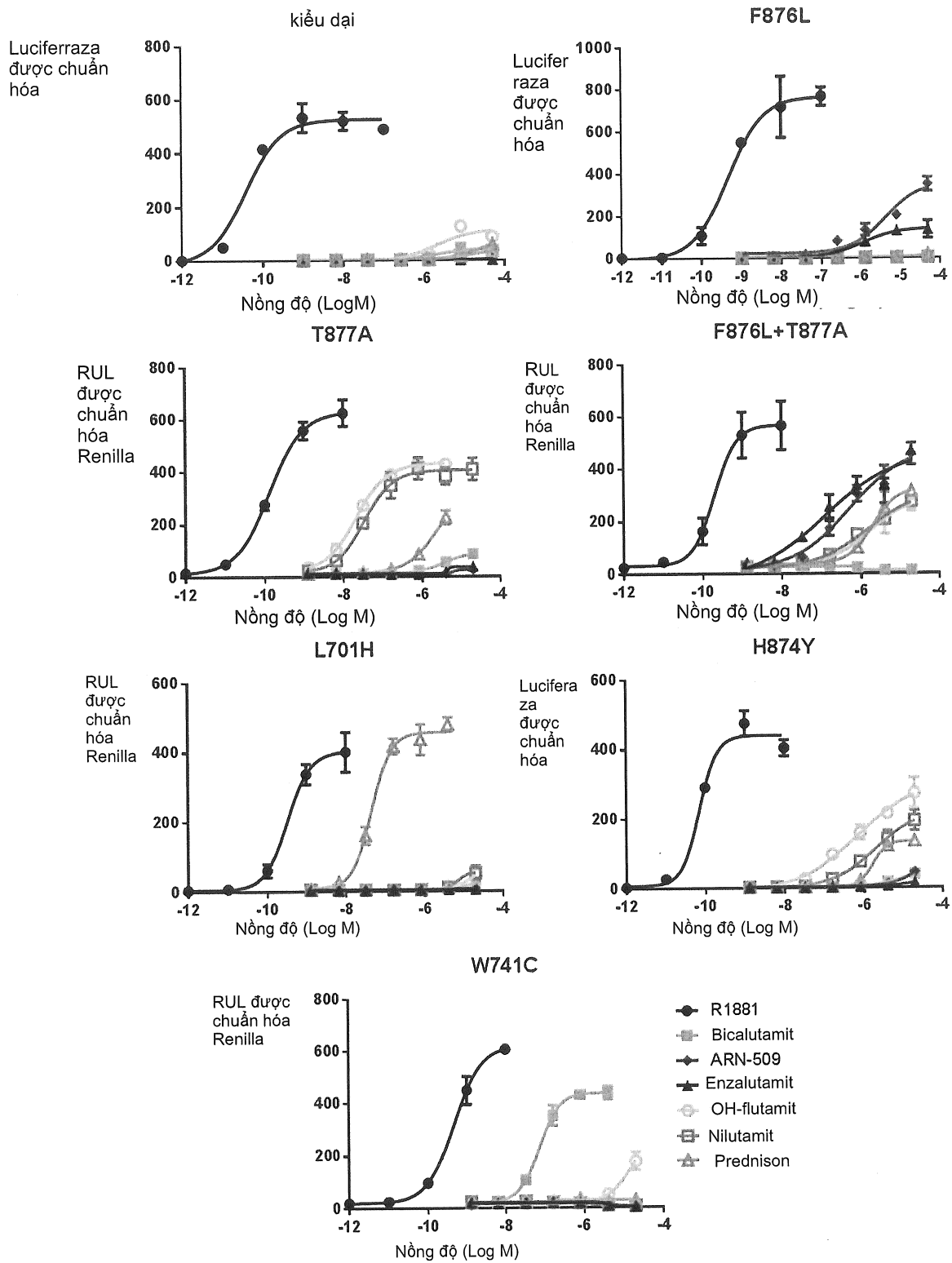


FIG. 4

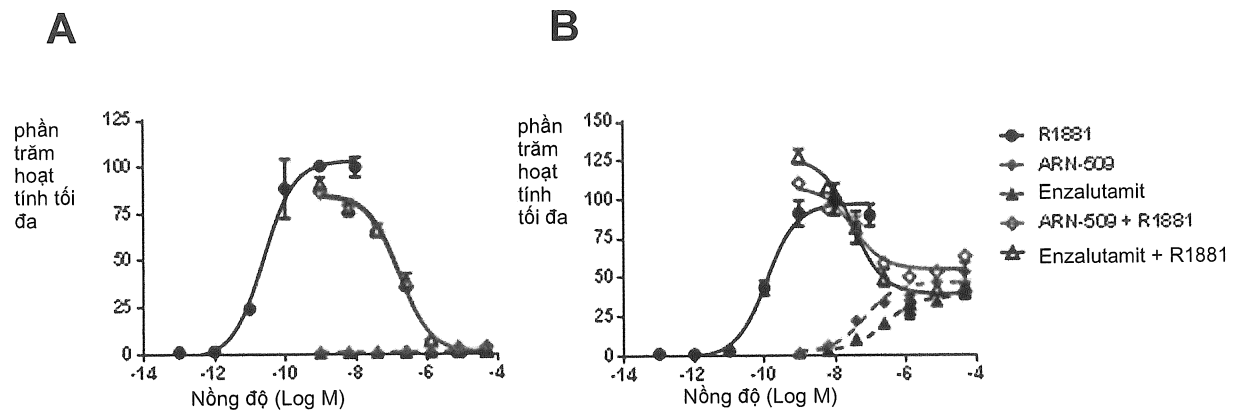


FIG. 5

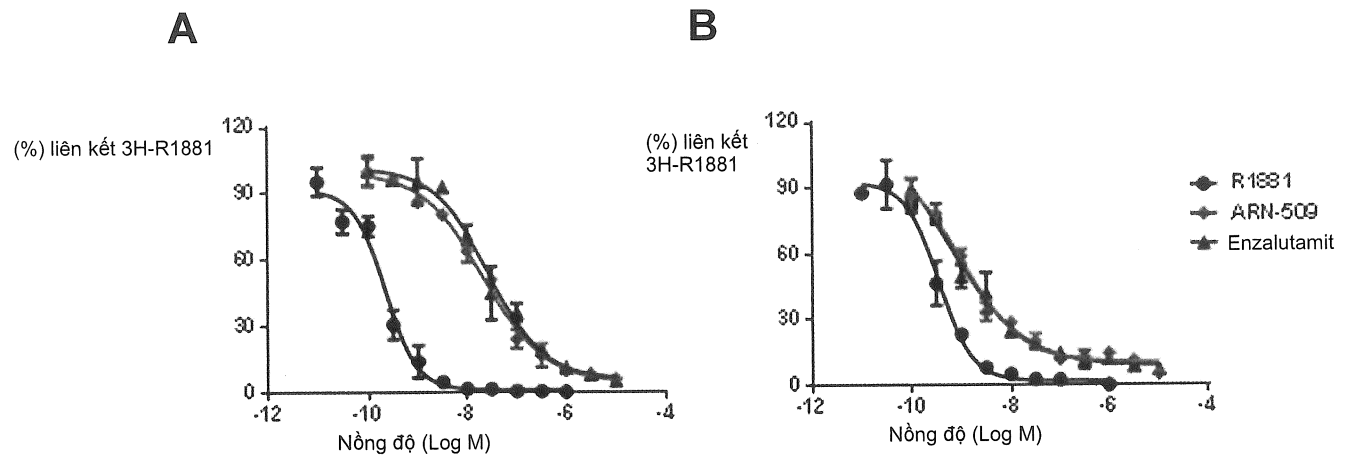


FIG. 6

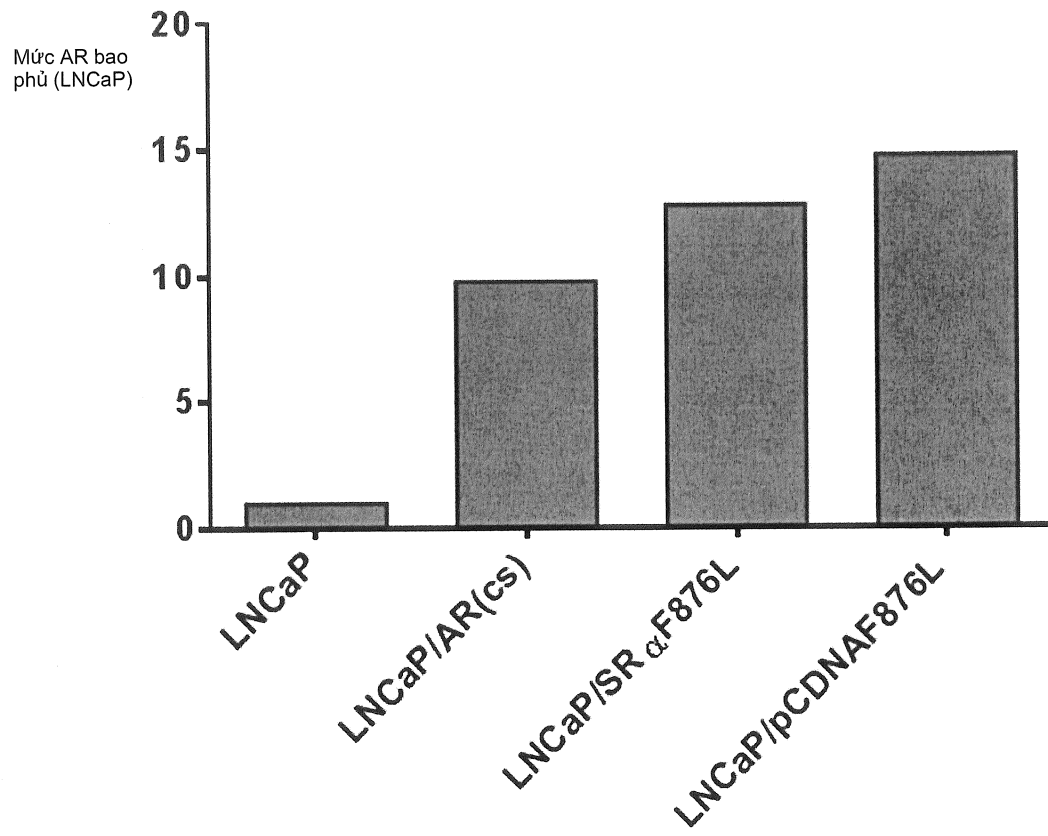
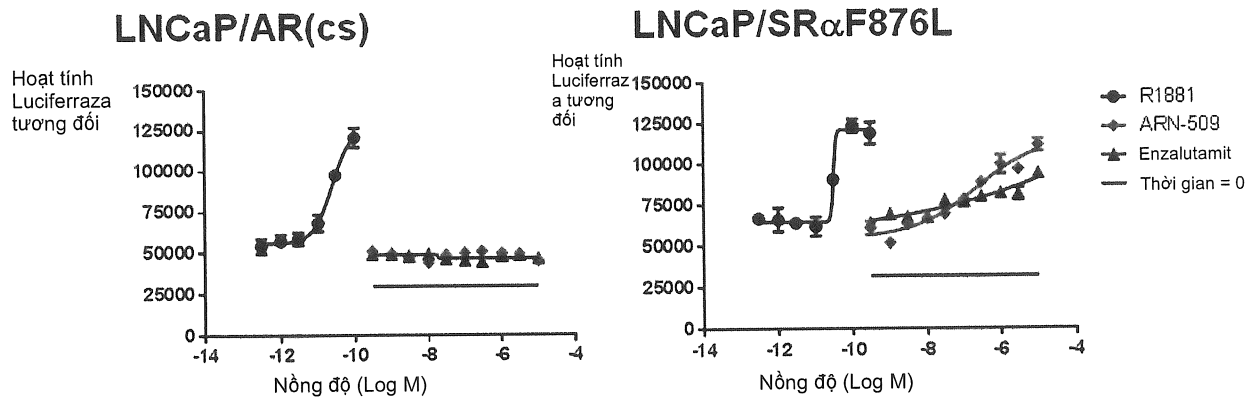


FIG. 7

A



B

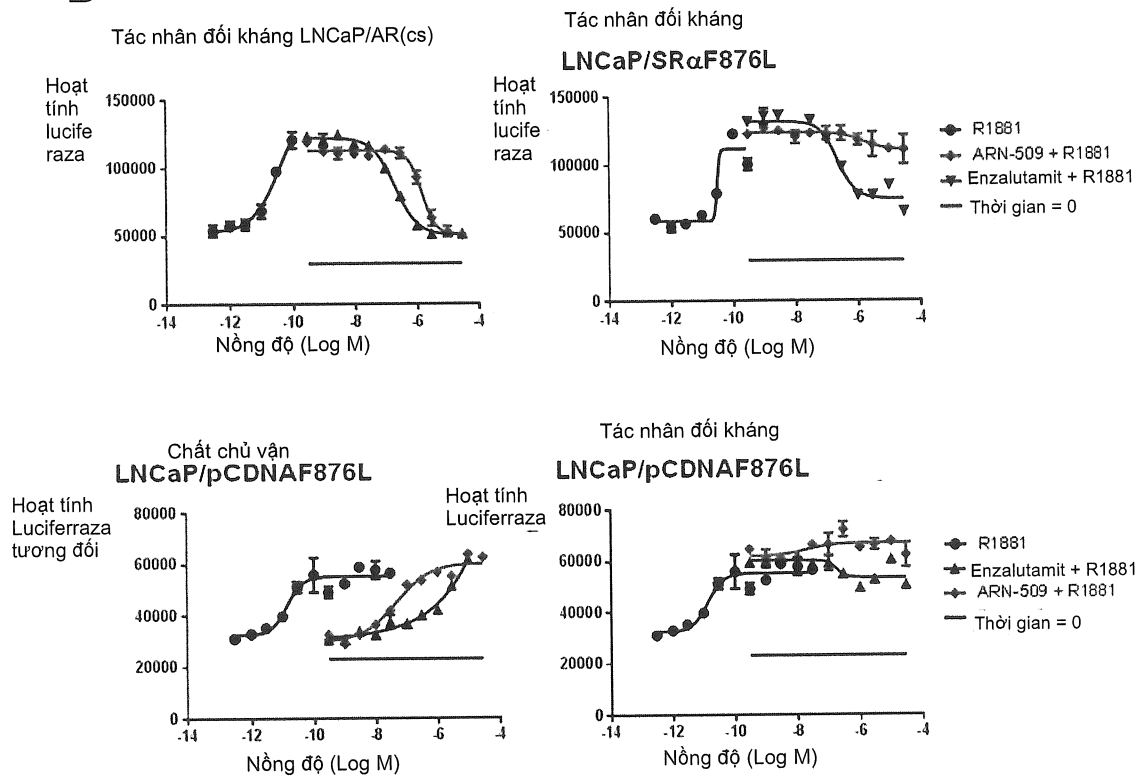


FIG. 8

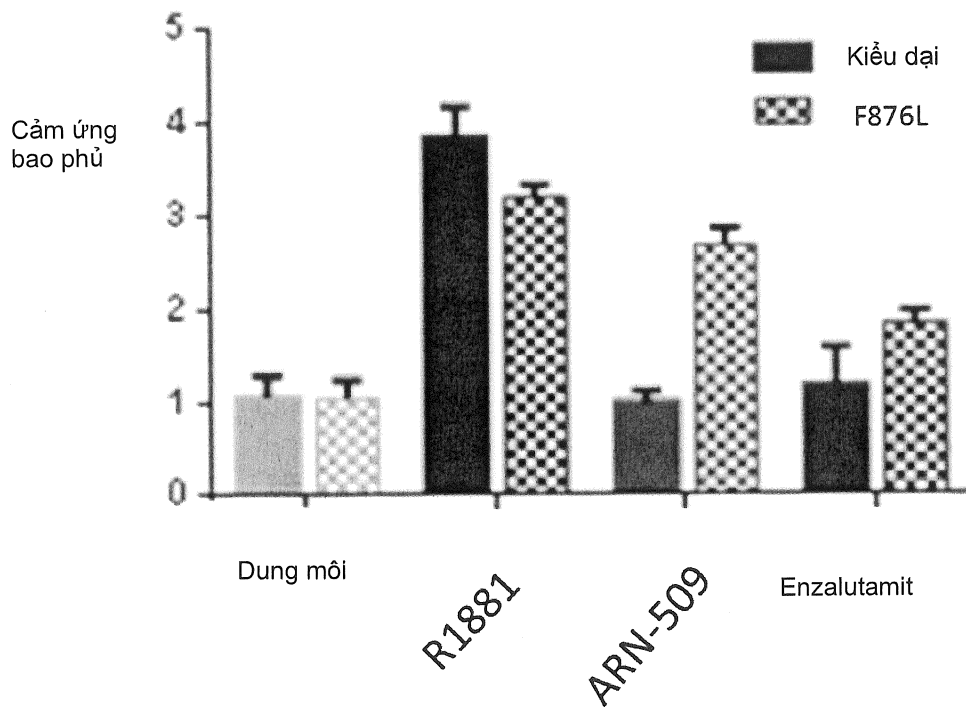


FIG. 9

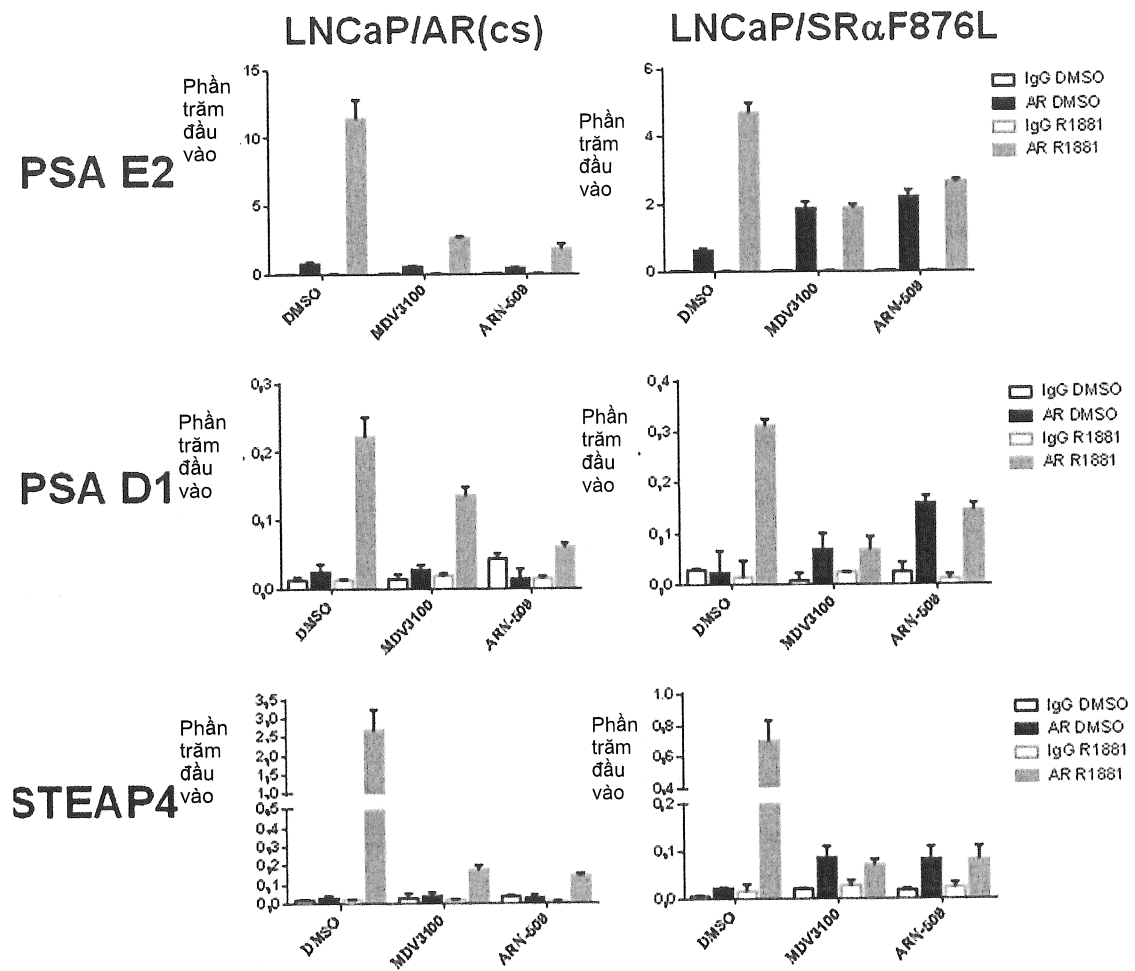


FIG. 9 (Cont'd)

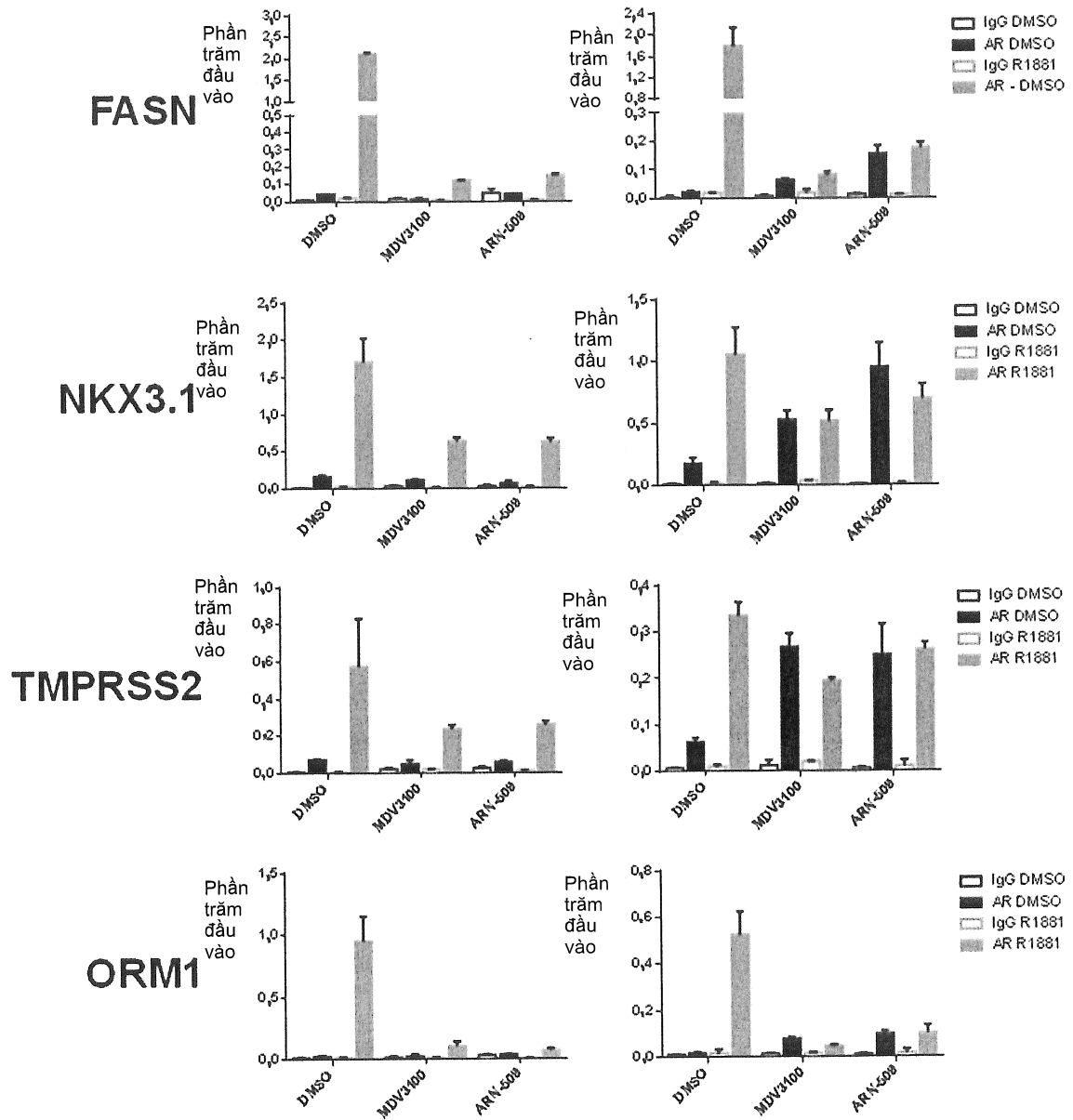


FIG. 10

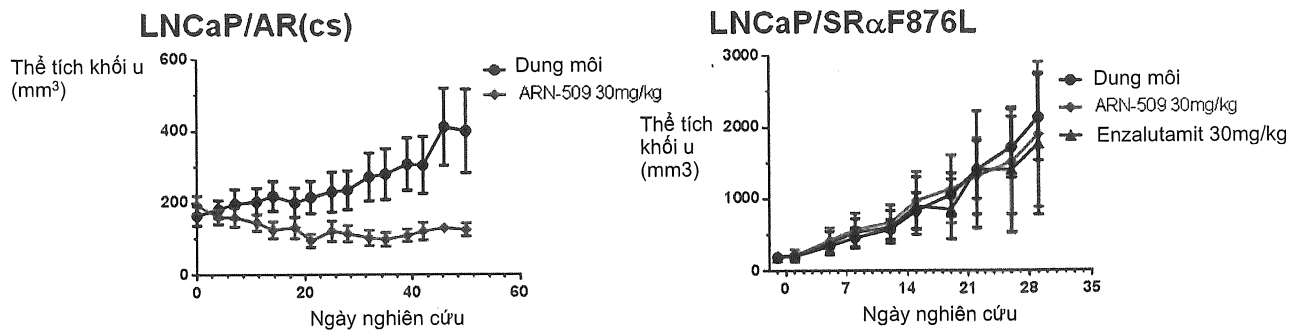


FIG. 11

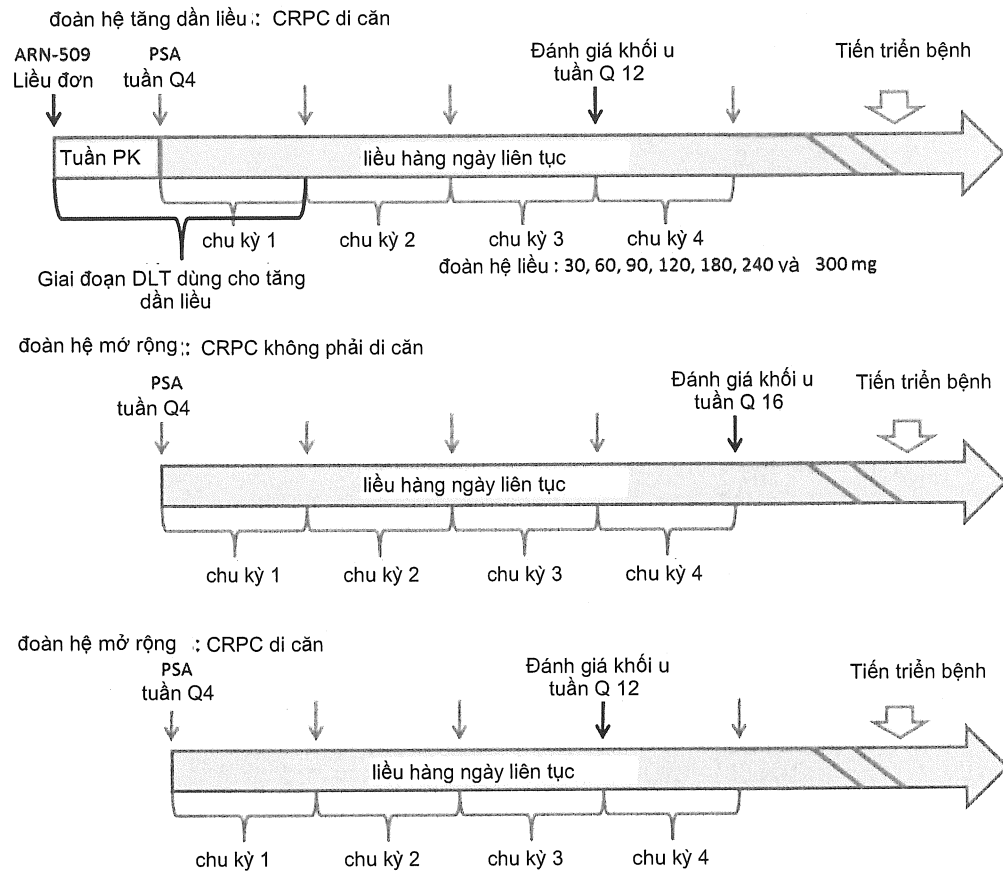


FIG. 12

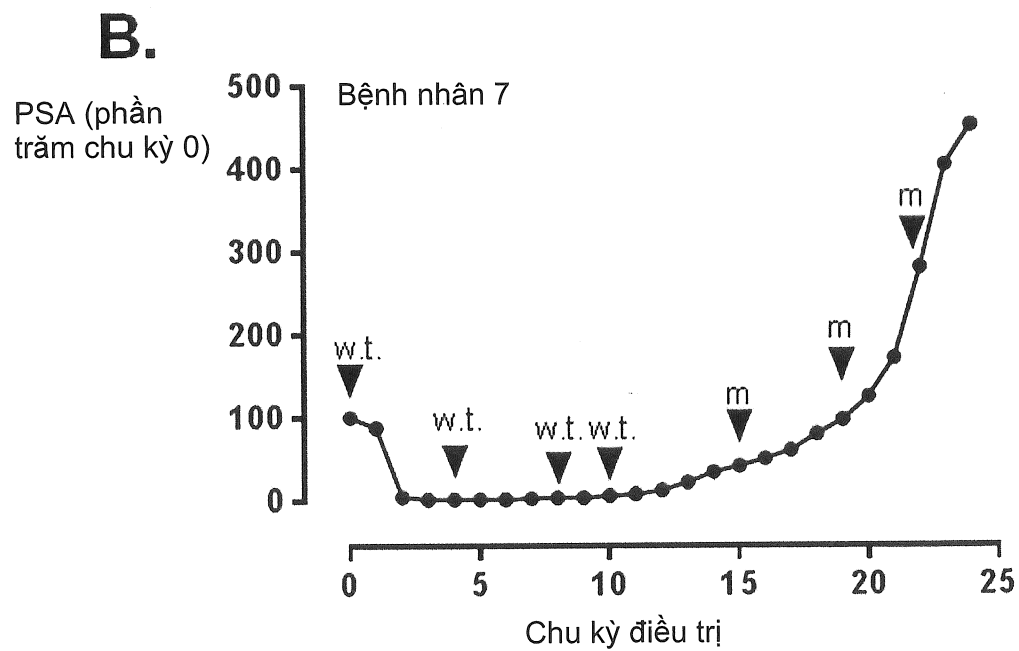
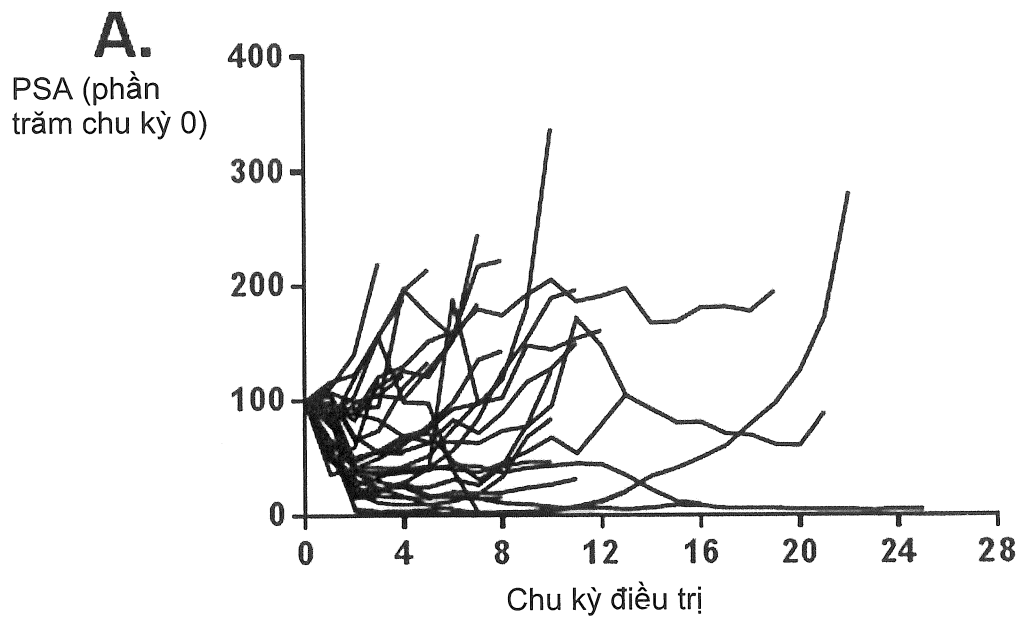
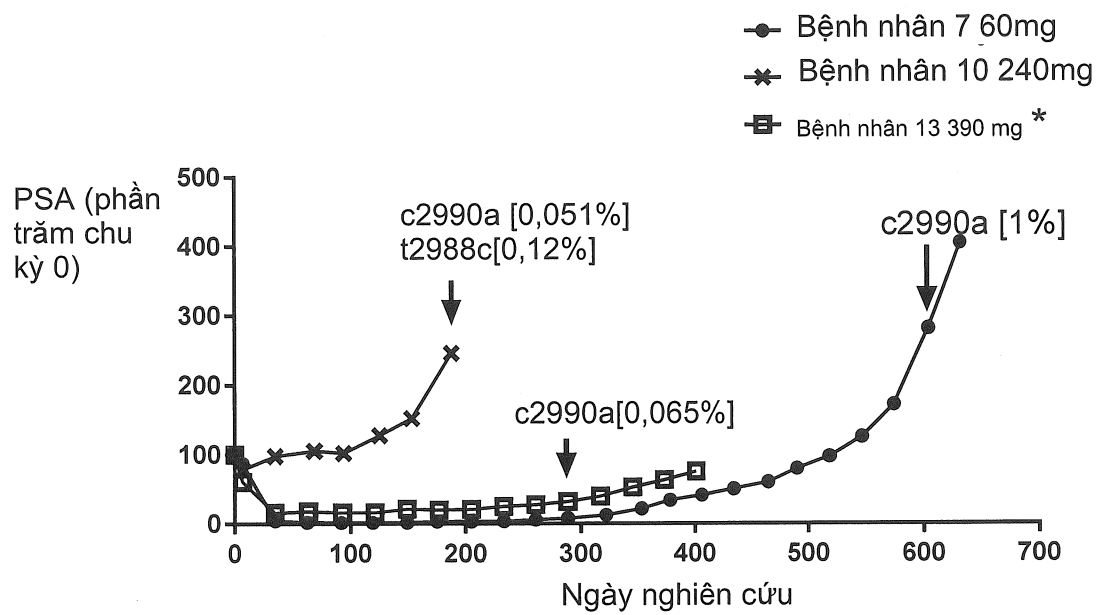


FIG. 13



* Được chuyển mạch đến 240mg sau 2 chu kỳ