



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(51) МПК

C07D 405/12 (2006.01)

C07D 405/14 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 14/72 (2006.01)

A61K 31/55 (2006.01)

A61K 31/4245 (2006.01)

A61K 31/4184 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C07D 405/12 (2020.02); C07D 405/14 (2020.02); G01N 33/68 (2020.02); C07K 14/72 (2020.02); A61K 31/55 (2020.02); A61K 31/4245 (2020.02); A61K 31/4184 (2020.02); A61K 39/395 (2020.02); A61P 25/00 (2020.02); A61P 25/28 (2020.02); A61P 35/00 (2020.02)

(21)(22) Заявка: 2017129335, 12.02.2016

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
12.02.2016

Дата регистрации:
10.07.2020

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
12.02.2015 US 62/115,356

(43) Дата публикации заявки: 12.03.2019 Бюл. № 8

(45) Опубликовано: 10.07.2020 Бюл. № 19

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 12.09.2017

(86) Заявка РСТ:
US 2016/017717 (12.02.2016)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2016/130901 (18.08.2016)

Адрес для переписки:
191036, Санкт-Петербург, а/я 24,
"НЕВИНПАТ"

(72) Автор(ы):

ЛОНГО Вальтер Д. (US),
БАЛАСУБРАМАНИАН Прия (US),
НИАМАТИ Нури (US),
ВЭЙ Мин (US)

(73) Патентообладатель(и):

Юниверсити оф Саутерн Калифорния (US)

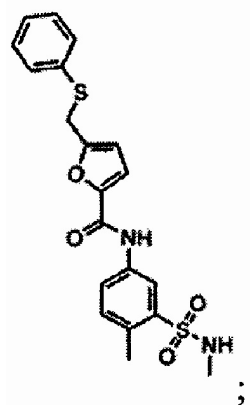
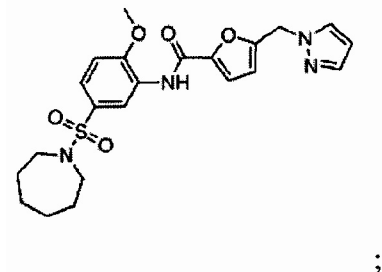
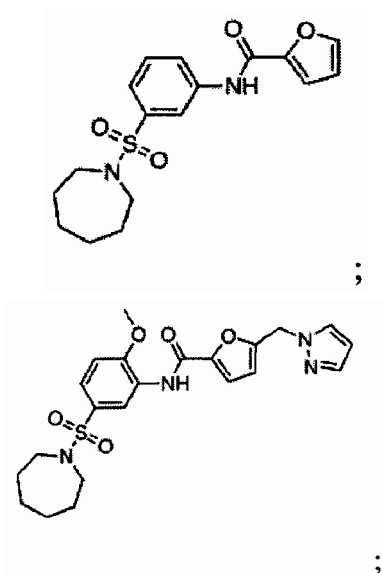
(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: WO 2013192165 A2, 27.12.2013. WO
2009049180 A2, 16.04.2009. WO 2006001770 A1,
05.01.2006. US 20040204368 A1, 14.10.2004. RU
2415134 C9, 27.05.2011.

(54) Блокаторы рецептора гормона роста при предупреждении заболеваний и лечении

(57) Реферат:

Изобретение относится к способу ингибирования GH, GHR, STAT5, SOCS и c-fos, который включает идентификацию субъекта, имеющего заболевание или состояние с изменениями экспрессии или активности генов/белков, относящихся к GH, GHR, STAT5 и SOCS человека, или на которого изменения экспрессии или активности генов/белков, относящихся к GH, GHR, STAT5 и SOCS человека, могут оказывать

благоприятный эффект; и введение терапевтически эффективного количества соединения, выбранного из группы, состоящей из:



и их фармацевтически приемлемых солей. Технический результат - выявлена новая активность известных соединений и разработан способ ингибирования на их основе, который может найти применение в медицине для лечения рака, диабета, иммуносупрессии, болезни Альцгеймера и заболеваний и состояний, в отношении которых клеточная и тканевая регенерация оказывает благоприятный эффект. 16 з.п. ф-лы, 23 ил.

RU 2 7 2 6 2 5 4 C 2

RU 2 7 2 6 2 5 4 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

C07D 405/12 (2006.01)*A61P 35/00* (2006.01)*C07D 405/14* (2006.01)*G01N 33/68* (2006.01)*C07K 14/72* (2006.01)*A61K 31/55* (2006.01)*A61K 31/4245* (2006.01)*A61K 31/4184* (2006.01)*A61K 39/395* (2006.01)*A61P 25/00* (2006.01)*A61P 25/28* (2006.01)**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C07D 405/12 (2020.02); *C07D 405/14* (2020.02); *G01N 33/68* (2020.02); *C07K 14/72* (2020.02); *A61K 31/55* (2020.02); *A61K 31/4245* (2020.02); *A61K 31/4184* (2020.02); *A61K 39/395* (2020.02); *A61P 25/00* (2020.02); *A61P 25/28* (2020.02); *A61P 35/00* (2020.02)

(21)(22) Application: **2017129335, 12.02.2016**(24) Effective date for property rights:
12.02.2016Registration date:
10.07.2020

Priority:

(30) Convention priority:
12.02.2015 US 62/115,356(43) Application published: **12.03.2019 Bull. № 8**(45) Date of publication: **10.07.2020 Bull. № 19**(85) Commencement of national phase: **12.09.2017**(86) PCT application:
US 2016/017717 (12.02.2016)(87) PCT publication:
WO 2016/130901 (18.08.2016)Mail address:
191036, Sankt-Peterburg, a/ya 24, "NEVINPAT"

(72) Inventor(s):

**LONGO Valter D. (US),
BALASUBRAMANIAN Priya (US),
NEAMATI Nouri (US),
WEI Min (US)**

(73) Proprietor(s):

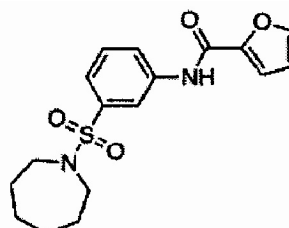
**UNIVERSITY OF SOUTHERN CALIFORNIA
(US)**

(54) GROWTH HORMONE RECEPTOR BLOCKERS FOR DISEASE PREVENTION AND TREATMENT

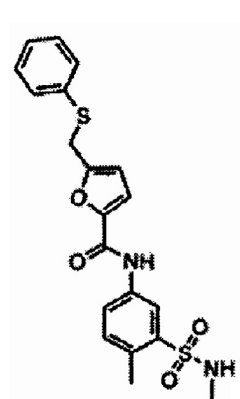
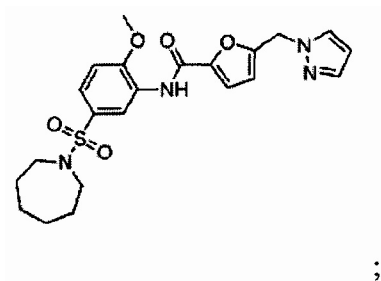
(57) Abstract:

FIELD: medicine; pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to a method of inhibiting GH, GHR, STAT5, SOCS and c-fos, which involves identification of a subject having a disease or condition with changes in expression/activity of genes/proteins related to GH, human GHR, STAT5 and SOCS, or on which changes in expression/activity of genes/proteins related to human GH, GHR, STAT5 and SOCS, can have a beneficial effect; and administering a therapeutically effective amount of a compound selected from the group consisting of:



;



and their pharmaceutically acceptable salts.

EFFECT: technical result is novel activity of existing compounds and a method of inhibiting thereof, which can be used in medicine for treating cancer, diabetes, immunosuppression, Alzheimer's diseases and diseases and conditions, in respect of which cell and tissue regeneration has a favorable effect.

17 cl, 23 dwg

R U 2 7 2 6 2 5 4 C 2

R U 2 7 2 6 2 5 4 C 2

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0001] Текстовый файл, представленный usc0138_ST25.txt, созданный 12 февраля 2016 года и имеющий размер 8 КВ, настоящим поданный, включен в данный документ посредством ссылки.

5 ПЕРЕКРЕСТНЫЕ ССЫЛКИ НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0002] Настоящая заявка заявляет приоритет на основании предварительной заявки на патент США №62/115356, поданной 12 февраля 2015 года, раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

10 ИНФОРМАЦИЯ О ФИНАНСИРОВАНИИ ИЗ ФЕДЕРАЛЬНОГО БЮДЖЕТА ИССЛЕДОВАНИЯ ИЛИ РАЗРАБОТКИ

[0003] Настоящее изобретение выполняли при поддержке правительства на основании контракта №5P01AGO34906-04, выданного Национальным институтом здравоохранения. Правительство обладает определенными правами на настоящее изобретение.

15 ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0004] По меньшей мере в одном аспекте настоящее изобретение относится к соединениям и способам лечения заболеваний или состояний путем обеспечения ингибирования активности или экспрессии GH, GHR, STAT5, IGF-1 и/или SOCS и белков, регулируемых GH, GHR, STAT5, SOCS, IGF-1 и инсулином человека.

20 ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0005] Акремегалия представляет собой заболевание, вызванное повышенной секрецией GH в аденомах гипофиза. Предполагаемый общемировой рынок для SOMA VERT® (пегвисомант, антагонист GHR человека) составляет более 160 миллионов долларов США. SOMA VERT® вводится пациентам, перенесшим неудачную операцию на аденоме гипофиза и устойчивым к аналогам соматостатина [1]. Главным отрицательным аспектом лечения с применением SOMA VERT® является то, что он вводится в виде инъекции один раз в день (Pfizer). Таким образом, такой блокатор GHR, представленный в данном документе, который может блокировать передачу сигнала hGHR, был бы очень востребован при лечении акремегалии.

[0006] Возраст является главным фактором риска при многих типах опухолей, что обуславливает заметное увеличение частоты возникновения рака среди пожилого населения [2-4]. Большинство видов рака (78%) диагностируют у лиц в возрасте 55 лет и старше (источник: Американское онкологическое общество). Возраст также ассоциирован с увеличением токсичности химиотерапии, что ограничивает безопасность и эффективность стандартной химиотерапии [5-7]. В клинических отчетах у пожилых пациентов наблюдалась большая миелосупрессия и был больший риск смерти, связанной с химиотерапией, чем среди более молодых пациентов при многих типах рака [6]. Это создает серьезную проблему, учитывая, что большинство видов рака встречаются у пожилых людей, которые также более чувствительны к токсичности химиотерапии.

Несмотря на то, что новые и менее токсичные лекарственные средства постепенно заменяют или добавляются к широко применяемым токсичным химиотерапевтическим лекарственным средствам, мероприятия по снижению токсичности для пожилых людей не проводятся [8]. Как недавно подчеркивали в Nature Reviews in Clinical Oncology в статье под заголовком "Снижение токсичности терапии рака: выявление потребностей, принятие мер" ("Reducing the toxicity of cancer therapy: recognizing needs, taking action"), разработка новых стратегий и лекарственных средств, направленных на селективную защиту реципиента/пациента, могли бы уменьшить побочные эффекты, ассоциированные с химиотерапевтическим лечением, а также увеличить терапевтический индекс. Так как

эти лекарственные средства защищали бы как от экзогенных, так и от эндогенных токсинов, они также имели бы потенциал для защиты от состояний и заболеваний, связанных с возрастом, включая рак, диабет и нейродегенеративные заболевания.

[0007] Подсчитано, что к 2030 году ориентировочно 20% населения Америки будет состоять из лиц в возрасте 65 и старше (источник: cdc.gov). Хронические заболевания, такие как заболевание сердца, рак, болезнь Альцгеймера и диабет, являются наиболее частыми причинами смертности среди пожилых людей. Приблизительно 95% затрат на здравоохранение среди престарелых (65 и старше) приходится на хронические заболевания, и предполагается, что эти затраты увеличатся на 25% к 2030 году (CDC.gov). Таким образом, существует необходимость уделить особое внимание предупреждению и/или отсрочке хронических состояний здоровья среди стареющего населения не только для повышения уровня жизни пожилых людей, но также и для предотвращения роста затрат на здравоохранение.

[0008] Основание для целенаправленного воздействия на рецептор гормона роста (GHR) заключается в следующем. Мутации, которые вызывают генетическое ингибирование GH/GHR/IGF-1, приводят к увеличению продолжительности жизни мышей вплоть до 50% [9-11]. Гомозиготные мутации карликовости Эймса в гене Prop-1 (df/df) предотвращают образование клеток передней доли гипофиза, которые производят гормон роста, тиреотропный гормон и пролактин. Молодые мыши df/df приблизительно в три раза меньше мышей контроля, но живут на >50% дольше [9]. Такой эффект мутаций карликовости на продолжительность жизни, по всей видимости, вызван отсутствием GH в плазме крови, который стимулирует секрецию IGF-1 из клеток печени [12]. К тому же, количество IGF-1 в плазме крови мышей df/df сильно снижается. Недостаток GH в плазме крови, по-видимому, опосредует эффекты мутаций Prop-1 (карликовость Эймса) и Pit-1 (карликовость Снелла) на продолжительность жизни, так как мыши, которые не могут секретировать GH в ответ на гормон, высвобождающий гормон роста (GHRH), также живут дольше [12]. Более того, карликовые мыши с высоким содержанием GH в плазме крови, но на 90% более низким содержанием циркулирующего в крови IGF-1 (нокаутные по гену рецептора гормона роста/белка, связывающего GH, мыши, GHRKO) живут дольше, чем мыши дикого типа из того же помета [10]. В своей совокупности эти исследования предполагают, что уменьшение содержания IGF-1 в плазме крови и, возможно, инсулина, является причиной значительной доли увеличения продолжительности жизни среди карликовых, с недостатком GH и GHR/BP-нулевых мышей. К тому же, мыши, у которых отсутствовала одна копия рецептора IGF-1 (IGF-IR^{+/-}), живут на 33% дольше, чем соответствующие им контрольные особи дикого типа [11]. Наблюдаемые у долгоживущих низших эукариот активности антиоксидантных ферментов супероксиддисмутаза и каталазы снижены в гепатоцитах мышей, подверженных воздействию GH или IGF-1, и у трансгенных мышей со сверхэкспрессией GH [13, 14]. Исследования *in vitro* с использованием фибробластов мутантных мышей с недостатком по оси GH/IGF-1 показывают увеличенную устойчивость против различных типов стресса, включая UV, H₂O₂, паракват, алкилирующее средство, тепло и кадмий [15]. У крыс IGF-1 ослабляет клеточный ответ на стресс и экспрессию белков ответа на стресс HSP72 и гемоксигеназы [16]. Исследования Longo и коллег в области первичных нейронов предполагают, что IGF-1 повышает чувствительность клеток к окислительному стрессу с помощью Ras/Erk-зависимых механизмов [17]. Лаборатория Longo и другие описали, как мутации, которые снижают активность пути Tor/Sch9 (гомологичного АКТ и S6K млекопитающих) или пути аденилатциклаза/cAMP/ПКА, увеличивают продолжительность жизни и стрессоустойчивость у дрожжей [18-20].

Увеличение устойчивости к оксидантам и теплу, например, могут достигать 1000-кратного размера у дрожжей с мутациями в обоих путях [21].

[0009] В последнее время было также показано, что сокращение аденилатциклазной активности путем удаления гена аденилатциклазы 5 (AC5) увеличивает

5 продолжительность жизни и увеличивает устойчивость к окислительному стрессу у мышей [22] в том случае, если пути, включая гомологи Akt, киназы S6 и cAMP/РКА, могут играть частично сохраняющуюся роль в регуляции старения и стрессоустойчивости у различных организмов от дрожжей до мышей (фигура 2) [23]. Аналогично активации Sch9 и Ras у дрожжей посредством глюкозы рецептор IGF-1 млекопитающих активирует

10 как Akt/mTOR/S6K, так и Ras и регулирует метаболизм глюкозы и клеточную пролиферацию [24]. Накапливающиеся доказательства показали, что увеличение передачи сигнала IGF-1 или IGF-1 является фактором риска при различных видах рака [25], что свидетельствует о том, что такой промитотический путь может способствовать старению, а также нарушениям и мутациям, необходимым для образования опухолей.

15 [0010] Относительно недавно в результате исследования с участием 99 живущих и 53 скончавшихся граждан Эквадора с генетическим ингибированием GHR (недостаток рецептора гормона роста, GHRD) было показано, что отсутствие передачи сигнала GH/IGF-1 защищает от двух главных связанных с возрастом заболеваний, таких как рак и диабет [26]. Люди GHRD, у которых уровни IGF-1 очень низкие, по-видимому, имеют

20 нормальную продолжительность жизни, что схоже с соответствующими им не-GHRD [26] лицами. Таким образом, ингибирование передачи сигнала GH/IGF-1 посредством вмешательства с применением лекарственного средства имеет потенциал для применения с целью снижения частоты возникновения рака и диабета, особенно в семьях с высоким риском возникновения этих заболеваний. Как обсуждалось ранее, ингибирование

25 передачи сигнала GH/IGF-1 может иметь множество различных применений: постоянное лечение акромегалии (избыточной выработки GH) [27], дифференциальная защита против хемотоксичности [28] и окислительного стресса, связанных с нарушениями, индуцированными ишемией/реперфузией [29].

[0011] Также в последнее время было показано, что ингибирование передачи сигнала

30 GHR-IGF-1 способствует восстановлению кроветворения (Cheng et al., Cell Stem Cell 2014) и регенерации множества систем, основанной на стволовых клетках (заявка на патент США №20140227373). Более того, генетическое ингибирование GHR защищает мышей от иммуносупрессии, индуцированной химиотерапией (фигура 3А), и повреждения ДНК в костном мозге и мононуклеарных клетках периферической крови, отчасти

35 являясь причиной регенерации кроветворения, зависящей от стволовых клеток (фигура 3 В) (Cheng et al., Cell Stem Cell 2014). Также было продемонстрировано, что генетическое ингибирование GHR снижает рост опухолей и способствует выживанию в ксенотрансплантантной модели опухолей у мышей (фигура 4). В заключение, Parrella et al. в последнее время показали, что ингибирование передачи сигнала GH-IGF-1

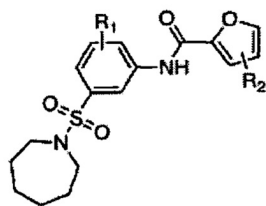
40 защищает от расстройства когнитивных функций, связанного с возрастом, и патологии в модели болезни Альцгеймера на мышах (Parrella et al., Aging Cell. 2013 Apr; 12(2):257-68).

[0012] Соответственно, существует потребность в разработке новых протоколов лечения заболеваний, основанных на ингибировании передачи сигнала GHR-IGF-1.

45 КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0013] Посредством настоящего изобретения решается одна или несколько проблем предшествующего уровня техники, поскольку по меньшей мере в одном варианте осуществления представлено соединение для лечения заболеваний или состояний путем

обеспечения ингибирования активности или экспрессии GH, GHR, STAT5, IGF-1 и/или SOCS и белков, регулируемых GH, GHR, STAT5, SOCS, IGF-1 и инсулином человека. Соединение данного варианта осуществления характеризуется формулой I:



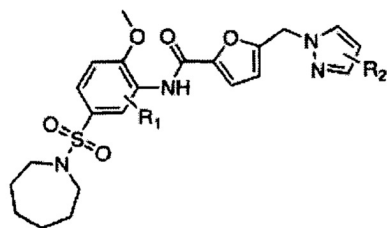
I,

где

R₁ представляет собой водород, NO₂, SO₃H, NH₃, C₁₋₈алкил или галоген и

R₂ представляет собой водород, NO₂, SO₃H, NH₃, C₁₋₈алкил или галоген.

[0014] В другом варианте осуществления представлено соединение, которое применимо для лечения заболеваний или состояний путем обеспечения ингибирования активности или экспрессии GH, GHR, STAT5, IGF-1 и/или SOCS и белков, регулируемых GH, GHR, STAT5, SOCS, IGF-1 и инсулином человека. Соединение данного варианта осуществления характеризуется формулой II:



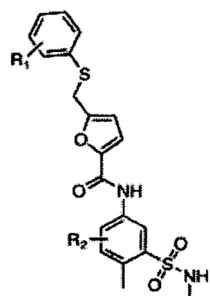
II,

где

R₁ представляет собой водород, NO₂, SO₃H, NH₃, C₁₋₈алкил или галоген и

R₂ представляет собой водород, NO₂, SO₃H, NH₃, C₁₋₈алкил или галоген.

[0015] В другом варианте осуществления представлено соединение, которое применимо для лечения заболеваний или состояний путем обеспечения ингибирования активности или экспрессии GH, GHR, STAT5, IGF-1 и/или SOCS и белков, регулируемых GH, GHR, STAT5, SOCS, IGF-1 и инсулином человека. Соединение согласно данному варианту осуществления характеризуется формулой III:



III,

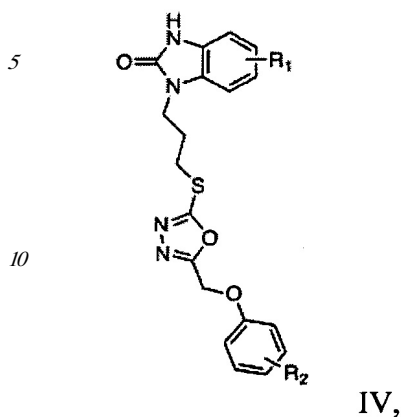
где

R₁ представляет собой водород, NO₂, SO₃H, NH₃, C₁₋₈алкил или галоген и

R₂ представляет собой водород, NO₂, SO₃H, NH₃, C₁₋₈алкил или галоген.

[0016] В другом варианте осуществления представлено соединение, которое применимо для лечения заболеваний или состояний путем обеспечения ингибирования

активности или экспрессии GH, GHR, STAT5, IGF-1 и/или SOCS и белков, регулируемых GH, GHR, STAT5, SOCS, IGF-1 и инсулином человека. Соединение, согласно данному варианту осуществления, характеризуется формулой IV:



15 где

R_1 представляет собой водород, NO_2 , SO_3H , NH_3 , C_{1-8} алкил или галоген и

R_2 представляет собой водород, NO_2 , SO_3H , NH_3 , C_{1-8} алкил или галоген.

[0017] Предпочтительно соединения, представленные выше в формулах I-IV, применимы для лечения заболеваний или состояний, выбранных из группы, состоящей из акромегалии, рака, диабета, болезни Альцгеймера и старения. Соединения и ингибирование путей с помощью соединений также применимы для защиты от токсичности химиотерапии и способствования мультисистемной регенерации, основанной на стволовых клетках, и для лечения состояний и заболеваний, в отношении которых регенерация, основанная на стволовых клетках, оказывает благоприятный эффект (C.W. Cheng et al. Cell Stem Cell, 2014; 14 (6): 810 DOI: 10.1016/j.stem.2014.04.014)

[0018] В другом варианте осуществления представлен способ лечения заболеваний, относящихся к активности гормона роста. В данном варианте осуществления используют ингибирующие моноклональные антитела к рецептору гормона роста (GHR) для снижения действия гормона роста (GH) и, вследствие этого, активности инсулинового фактора роста 1 (IGF-1) *in vivo*. По причине способствующего росту действия GH и IGF-1 на некоторые клетки опухолей и поскольку передача сигнала GH/IGF-1 играет важную роль в процессе старения млекопитающих, настоящее изобретение имеет большой потенциал для обеспечения лекарственного средства на основе антител для того, чтобы а) ослабить/задержать рост GH- и/или IGF-1-зависимых клеток опухолей; б) индуцировать защиту на уровне организма против острого стресса, например, токсичности по отношению к нормальной ткани, ассоциированной с химиотерапией, клеточной токсичности, вызванной радиацией, или других токсичных лекарственных средств и соединений; в) усилить терапевтический индекс существующей химиотерапии; г) модулировать факторы риска, связанные возрастными заболеваниями; е) снизить/задержать изменения в биомаркерах, ассоциированные со старением; ф) способствовать мультисистемной регенерации, основанной на стволовых клетках; г) снизить или задержать частоту возникновения диабета и болезни Альцгеймера и замедлить их развитие.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0019] Фигура 1. На столбчатой диаграмме показаны причины смерти среди пожилых людей (по данным CDC, Национального центра медицинской статистики, Национальной системы учета актов гражданского состояния, 2007).

[0020] Фигура 2. Схожие пути регулируют продолжительность жизни и устойчивость

к стрессу у дрожжей и мышей (по материалам Longo, 2003).

[0021] Фигура 3А. Генетическое ингибирование GHR защищает костный мозг (BM) и мононуклеарные клетки периферической крови (PB) от хемотоксичности у мышей. Общее число белых кровяных клеток (WBC) и лимфоцитов периферической крови GHRD-мышей и мышей дикого типа из того же помета (WT); каждая точка представляет собой среднее значение \pm s.e.m. (стандартная ошибка среднего арифметического); вертикальными пунктирными линиями показана обработка циклофосфамидом (CP); горизонтальными пунктирными линиями показаны исходные уровни; * $p < 0,05$, ANOVA для фаз выздоровления.

[0022] Фигура 3В. GHR-нокаутные (GHRKO) мыши и мыши дикого типа того же возраста и из того же помета (WT) подвергались шести циклам лечения циклофосфамидом (CP) (200 мг/кг, i.p.). Повреждение ДНК (момент хвоста по Оливе) измеряли с применением гель-электрофореза одиночных клеток в костном мозге (BM) и мононуклеарных клетках периферической крови (PB) после 6 циклов обработки CP.

[0023] Фигура 4А. Генетическое ингибирование GHR снижает рост опухолей и улучшает выживание в случае наличия опухолей в ксенотрансплантантной модели опухоли у мышей. Мышам GHRKO и мышам дикого типа того же возраста и из того же помета (WT) инокулировали меланому B16Flu подкожно и подвергали обработке циклофосфамидом (CP) (i.p. 200 мг/кг массы тела, отмечено вертикальными пунктирными линиями). Рост опухолей в течение 3 циклов обработки CP.

[0024] Фигура 4В. Выживание в случае наличия опухолей у мышей GHRKO и WT. Генетическое ингибирование GHR снижает рост опухолей и улучшает выживание в случае наличия опухолей в ксенотрансплантантной модели опухоли у мышей. Мышам GHRKO и мышам дикого типа того же возраста и из того же помета (WT) инокулировали меланому B16Flu подкожно и подвергали обработке циклофосфамидом (CP) (i.p. 200 мг/кг массы тела, отмечено вертикальными пунктирными линиями).

[0025] Фигура 5А. Ведущие соединения (№№34, 37, 38), идентифицированные посредством анализов репортерного гена люциферазы. L-клетки мыши, экспрессирующие GHR человека, трансфицировали с помощью плазмид, несущих репортерные гены люциферазы c-fos или SOCS2. Клетки подвергали сывороточному голоданию, инкубировали с исследуемыми соединениями (№№34, 37, 38), а затем обрабатывали GH. Данные нормированы по отношению к совместно трансфицированной люциферазе Renilla под контролем промотора CMV и выражены в относительных световых единицах (RLU). (А) Активность репортерного гена люциферазы c-fos.

[0026] Фигура 5В. Ведущие соединения (№№34, 37, 38), идентифицированные посредством анализов репортерного гена люциферазы. L-клетки мыши, экспрессирующие GHR человека, трансфицировали с помощью плазмид, несущих репортерные гены люциферазы c-fos или SOCS2. Клетки подвергали сывороточному голоданию, затем инкубировали с исследуемыми соединениями (№№34, 37, 38) перед обработкой GH. Данные нормировали по отношению к совместно трансфицированной люциферазе Renilla под контролем промотора CMV и выражали в относительных световых единицах (RLU). (В) Активность репортерного гена люциферазы SOCS2.

[0027] Фигура 6. Ведущие соединения ингибируют фосфорилирование STAT5. (А) L-клетки мыши инкубировали в 0,5% сыворотке в течение 24 часов. Клетки обрабатывали соединениями 34, 37 или 38 в течение 30 мин. перед обработкой 5 нМ hGH. Антагонист гормона роста (GHA) применяли в качестве положительного контроля.

[0028] Фигура 7. Скрининг-платформа с высокой пропускной способностью (HTS) для идентификации ингибиторов GHR. L-клетки мыши, экспрессирующие GHR человека,

трансфицировали с помощью плазмид, несущих репортерный ген люциферазы SOCS2. Клетки подвергали сывороточному голоданию, проводили предварительную обработку исследуемыми соединениями (пронумерованными, как показано), а затем GH. Данные нормированы по отношению к люциферазе Renilla под контролем промотора CMV и
5 выражены в относительных световых единицах (RLU).

[0029] Фигура 8А. Последовательность белка рецептора гормона роста мыши. SEQ ID NO: 1: остатки 1-24 (курсив), сигнальный пептид; остатки 25-264 (подчеркнуто), GH-связывающий белок; остатки 274-297 (жирный), трансмембранный домен.

[0030] Фигура 8В. Анализ структуры рецептора гормона роста мыши для выбора
10 эпитопа. Показатель эпитопа определяли при помощи алгоритма собственной разработки.

[0031] ФИГУРА 9А. Комплекс гормона роста (GH) человека и его растворимого связывающего белка (GHBP) (PDB-1HWG, визуализированный посредством PyMOL). А) Объемное графическое изображение 5 выбранных эпитопов (гомологичные области
15 человека).

[0032] ФИГУРА 9В. Ленточное представление 5 выбранных эпитопов. Темно-голубой: GH; зеленый, GHBP; области, закрашенные фиолетовым (C562), светло-коричневый (C570), красный (C592), белый (C576) и бирюзово-голубой (C565) показывают
20 выбранные эпитопы, на которые нацелены моноклональные антитела. Следует отметить, что поскольку доступна только кристаллическая структура человеческого комплекса GH-GHR, подсвеченные области представляют собой эквивалентные области человека для выбранных эпитопов GHR мыши.

[0033] ФИГУРА 9С. Моноклональное антитело к GHR (C592) специфически распознает связанный с мембраной GHR (показано стрелками).

[0034] ФИГУРА 9D. Обработка с применением высокой концентрации
25 моноклонального антитела к GHR (C592) приводит к скоплению GHR и эндоцитозу (показано стрелками).

[0035] Фигура 10. Моноклональные антитела и их эпитопы-мишени, использованные в экспериментах фигур 8 и 9.

[0036] Фигура 11А. Скрининг антагонистических или агонистических моноклональных
30 антител к GHR. А). L-клетки мыши культивировали до 80-90% конфлюэнтности. Затем клетки перемещали на DMEM с низким содержанием глюкозы (0,5 г/л) и низким содержанием FBS (0,5%) на 24 часа. Клетки инкубировали с моноклональными антителами (обозначенными серийными номерами) в течение 1 часа, затем обрабатывали
35 5 нМ гормона роста (GH) в течение 5 минут и проводили анализ на фосфорилирование STAT5 с помощью вестерн-блот-анализа. Уровни фосфорилирования STAT5 нормировали по отношению к общему STAT5, и данные отображены в виде процентного отношения к отсутствию обработки с применением антител.

[0037] Фигура 11В. Понижающая регуляция GH-индуцированного фосфорилирования
40 STAT5 моноклональным антителом C592.

[0038] Фигура 12А. Мыши, экспрессирующие новое антитело, ингибирующее гормон
роста, описанное в данной заявке, были защищены от химиотерапии. Самцов (М) и самок (F) мышей CD1 в возрасте 4 недель иммунизировали GH человека с бустерными дозами, введенными на неделе 10. А) Мыши демонстрировали потерю массы тела по
45 сравнению с контролем, что указывало на то, что они производили антитела к GH человека, которые были перекрестно реактивными с GH мыши и, в свою очередь, замедляли рост.

[0039] Фигура 12В. Слот-блот-анализ сыворотки, взятой у иммунизированных мышей,

показал реактивность к ГН человека у 34 из 40 мышей, подтверждая, что антитела образовывались.

[0040] Фигура 12C. ГН-иммунизированные мыши, которым проводили иммунизацию бустерной дозой ГН человека в возрасте 6 месяцев, а затем обрабатывали циклофосфамидом (СР), как показано, могли легче, чем контрольные (не иммунизированные), повторно набирать массу тела.

[0041] Фигура 12D. Полный анализ крови также показал, что ГН-иммунизированные мыши демонстрировали лучший профиль клеток крови через 7 дней после обработки циклофосфамидом (СР).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0042] Далее будет приведена ссылка на подробное описание предпочтительных на данный момент композиций, вариантов осуществления и способов по настоящему изобретению, которые представляют собой наилучшие пути осуществления настоящего изобретения, на данный момент известные изобретателям. Фигуры не обязательно соответствуют масштабу. Однако следует понимать, что раскрытые варианты осуществления являются всего лишь иллюстративными для настоящего изобретения, которое можно осуществлять в различных и альтернативных формах. Следовательно, раскрытые в данном документе конкретные детали не должны толковаться как ограничивающие, а всего лишь как иллюстративная основа для любого аспекта настоящего изобретения и/или иллюстративная основа для обучения специалиста в данной области с целью различного применения настоящего изобретения.

[0043] За исключением примеров или случаев, где точно указано иное, все числовые величины в данном описании, указывающие на количества материала или условия в ходе реакции и/или применения, следует рассматривать как модифицированные словом "приблизительно" при описании наиболее широкого объема настоящего изобретения. Практическое осуществление в пределах заданных числовых значений является, как правило, предпочтительным. Также, если однозначно не указано иное, процент, "части от", значения соотношений представлены по весу; R-группы включают Н, С₁₋₁₀алкил, С₂₋₁₀алкенил, С₆₋₁₄арил (например, фенил, галоген или С₄₋₁₄гетероарил); описание группы или класса материалов в качестве подходящих или предпочтительных для заданной цели в связи с настоящим изобретением подразумевает, что смеси любых двух или большего количества представителей группы или класса являются в равной степени подходящими или предпочтительными; при этом описание составляющих в химических терминах относится к составляющим в момент добавления к любой комбинации, указанной в описании, и не обязательно препятствует химическим взаимодействиям между составляющими смеси сразу после смешивания; при этом первое определение сокращения или другой аббревиатуры применяется ко всем последующим применениям в данном документе той же аббревиатуры и применяется с соответствующими изменениями к нормальным грамматическим вариантам первоначально определенной аббревиатуры; и, если конкретно не указано иное, измерение свойства определяют с помощью той же методики, которая указана ранее или позже для такого свойства.

[0044] Также следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено конкретными вариантами осуществления и способами, описанными ниже, поскольку конкретные компоненты и/или условия могут, безусловно, меняться. Более того, терминология, применяемая в данном документе, применяется только с целью описания определенных вариантов осуществления настоящего изобретения и не предполагает ограничения каким-либо образом.

[0045] Необходимо отметить, что в контексте описания и прилагаемой формулы

изобретения форма единственного числа включает форму множественного числа объектов, если в контексте явно не указано иное. Например, ссылка на компонент в единственном числе предполагает включение множества компонентов.

[0046] Везде в данной заявке, когда приводятся ссылки на публикации, раскрытия таких публикаций в своей полноте включены в данную заявку посредством ссылки для более полного описания уровня техники, к которому относится настоящее изобретение.

[0047] Термин "субъект" относится к человеку или животному, включая всех млекопитающих, таких как приматы (в частности, высшие приматы), овца, собака, грызуны (например, мышь или крыса), морская свинка, коза, свинья, кошка, кролик и корова.

[0048] Сокращения:

[0049] АКТ - V-Akt, вирусный онкогенный гомолог мышинной тимомы, протеинкиназа В.

[0050] B16Flu - зеленый флуоресцентный белок (GFP), экспрессируемый клетками злокачественной меланомы мышей B16.

[0051] BM - костный мозг.

[0052] cAMP - циклический аденозинмонофосфат.

[0053] CMV - промотор гена немедленного раннего ответа цитомегаловируса.

[0054] CP - циклофосфамид.

[0055] df/df - карликовость Эймса.

[0056] ДНК - дезоксирибонуклеиновая кислота.

[0057] ERK - киназы, регулируемые внеклеточными сигналами.

[0058] FBS - фетальная бычья сыворотка.

[0059] GH - гормон роста.

[0060] GHA - антагонист гормона роста.

[0061] GHR - рецептор гормона роста.

[0062] GHR/BP - рецептор гормон роста / связывающий белок гормона роста.

[0063] GHRD - недостаток рецептора гормона роста.

[0064] GHRH - гормон, высвобождающий гормон роста.

[0065] GHRKO -нокаут рецептора гормона роста.

[0066] HEK293 - эмбриональная клетка почки человека 293.

[0067] hGH - гормон роста человека.

[0068] HSP72 - белок теплового шока 72.

[0069] IGF-1 - инсулиноподобный фактор роста 1.

[0070] IGF-IR - рецептор IGF-1.

[0071] MEK - киназа митоген-активируемой протеинкиназы.

[0072] PB -периферическая кровь.

[0073] PBMC - моноклеарные клетки периферической крови.

[0074] Pit-1 - фактор транскрипции 1, содержащий POU-домен, класс 1.

[0075] PKA - протеинкиназа А.

[0076] Prop-1 - предвестник Pit 1.

[0077] RAS - саркома крыс.

[0078] RLU - относительные световые единицы.

[0079] S6K -киназа рибосомного белка S6.

[0080] Sch9 - серин/треонин протеинкиназа SCH9.

[0081] SOCS - супрессор цитокиновой передачи сигнала.

[0082] STAT5 - переносчик сигнала и активатор транскрипции 5.

[0083] Tor - мишень рапамицина.

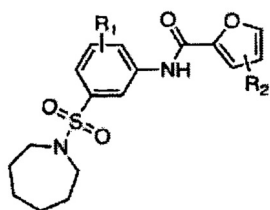
[0084] UV - ультрафиолет.

[0085] WBC - белые клетки крови.

[0086] WT - дикий тип.

[0087] В различных вариантах осуществления настоящего изобретения представлены соединения и способы облегчения симптомов различных заболеваний, состояний и виды лечения. В частности, такие соединения и способы могут применяться для лечения акромегалии, при химиотерапии или других видах терапии с вовлечением токсинов, которые повреждают нормальные клетки, для лечения рака, диабета, иммунодепрессии, иммуносупрессии, возрастной инволюции тимуса, иммунодефицита, болезни Альцгеймера, старения и заболеваний и состояний, в отношении которых клеточная и тканевая регенерация оказывает благоприятный эффект. Как правило, соединения и способы по настоящему изобретению применяются для лечения недугов, относящихся к экспрессии или вызванных экспрессией (или сверхэкспрессией) GH, GHR, STAT5, IGF-1 и/или SOCS и белков, регулируемых GH, GHR, STAT5, SOCS, IGF-1 и инсулином человека.

[0088] Посредством настоящего изобретения решается одна или несколько проблем предшествующего уровня техники, поскольку по меньшей мере в одном варианте осуществления представлено соединение для лечения заболеваний или состояний путем обеспечения ингибирования активности или экспрессии GH, GHR, STAT5, IGF-1 и/или SOCS и белков, регулируемых GH, GHR, STAT5, SOCS, IGF-1 и инсулином человека. Соединение данного варианта осуществления характеризуется формулой I:



I;

или его фармацевтически приемлемая соль;

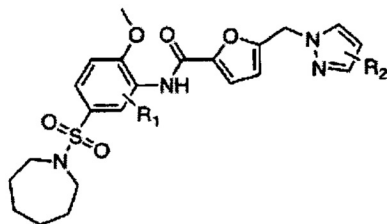
где

R₁ представляет собой водород, NO₂, SO₃H, NH₃, C₁₋₈алкил или галоген и

R₂ представляет собой водород, NO₂, SO₃H, NH₃, C₁₋₈алкил или галоген.

Предпочтительно каждый из R₁ и R₂ независимо представляет собой водород, метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, втор-бутил, изобутил, трет-бутил или фенил.

[0089] В другом варианте осуществления представлено соединение, которое применимо для лечения заболеваний или состояний путем обеспечения ингибирования активности или экспрессии GH, GHR, STAT5, IGF-1 и/или SOCS и белков, регулируемых GH, GHR, STAT5, SOCS, IGF-1 и инсулином человека. Соединение данного варианта осуществления характеризуется формулой II:



II;

или его фармацевтически приемлемая соль;

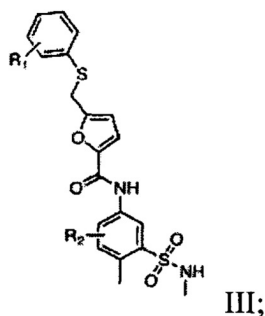
где

R_1 представляет собой водород, NO_2 , SO_3H , NH_3 , C_{1-8} алкил или галоген и

R_2 представляет собой водород, NO_2 , SO_3H , NH_3 , C_{1-8} алкил или галоген.

Предпочтительно каждый из R_1 и R_2 независимо представляет собой водород, метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, втор-бутил, изобутил, трет-бутил или фенил.

[0090] В другом варианте осуществления представлено соединение, которое применимо для лечения заболеваний или состояний путем обеспечения ингибирования активности или экспрессии GH, GHR, STAT5, IGF-1 и/или SOCS и белков, регулируемых GH, GHR, STAT5, SOCS, IGF-1 и инсулином человека. Соединение согласно данному варианту осуществления характеризуется формулой III:



или его фармацевтически приемлемая соль;

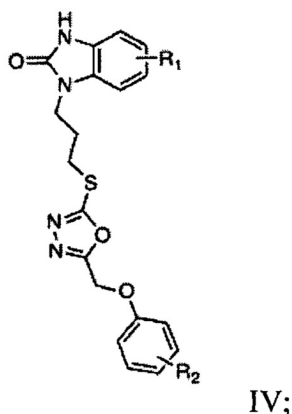
где

R_1 представляет собой водород, NO_2 , SO_3H , NH_3 , C_{1-8} алкил или галоген и

R_2 представляет собой водород, NO_2 , SO_3H , NH_3 , C_{1-8} алкил или галоген.

Предпочтительно каждый из R_1 и R_2 независимо представляет собой водород, метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, втор-бутил, изобутил, трет-бутил или фенил.

[0091] В другом варианте осуществления представлено соединение, которое применимо для лечения заболеваний или состояний путем обеспечения ингибирования активности или экспрессии GH, GHR, STAT5, IGF-1 и/или SOCS и/или белков, регулируемых человеческими GH, GHR, STAT5, SOCS, IGF-1 и инсулином. Соединение, согласно данному варианту осуществления, характеризуется формулой IV:



или его фармацевтически приемлемая соль;

где

R_1 представляет собой водород, NO_2 , SO_3H , NH_3 , C_{1-8} алкил или галоген и

R_2 представляет собой водород, NO_2 , SO_3H , NH_3 , C_{1-8} алкил или галоген.

Предпочтительно каждый из R_1 и R_2 независимо представляет собой водород, метил,

этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, втор-бутил, изобутил, трет-бутил или фенил.

[0092] В еще одном варианте осуществления соединения, представленные выше в формулах I-IV, применяются для лечения заболеваний или состояний, выбранных из группы, состоящей из акромегалии, рака, диабета, болезни Альцгеймера и старения.

5 Соединения и ингибирование путей посредством соединений также применимы для защиты от токсичности химиотерапии и способствования мультисистемной регенерации, основанной на стволовых клетках (C.W. Cheng et al. Cell Stem Cell, 2014; 14 (6): 810 DOI: 10.1016/j.stem.2014.04.014). В этом отношении представлен способ лечения заболеваний или состояний с изменениями в сигнальных генах, относящихся к GH, GHR, STAT5 и
10 SOCS человека. В этом контексте термин "относящийся к" означает, что сигнальные гены представляют собой часть пути или путь передачи сигнала, который приводит к экспрессии GH, GHR, STAT5 и SOCS. Это включает стадию идентификации субъекта, имеющего заболевание или состояние, при котором сигнальные гены или белки, которые они кодируют, относятся к GH, GHR, STAT5 и SOCS человека или обуславливают
15 заболевание или состояние. Терапевтически эффективное количество соединения, выбранного из группы, состоящей из соединений, характеризующихся формулами I-IV, и их комбинаций, вводят субъекту.

[0093] Представленные выше соединения вводят субъекту в терапевтически эффективном количестве, так что симптомы акромегалии, рака, диабета, болезни
20 Альцгеймера или старения смягчаются. Предпочтительно такие количества обычно будут представлять собой от приблизительно 0,1 до приблизительно 300 мг на 1 кг массы тела субъекта, в зависимости от конкретного используемого соединения и от его эффектов на активность или экспрессию GH, GHR, STAT5, SOCS, IGF-1 и инсулина. Типовые дозы представляют собой от приблизительно 1 до приблизительно 5000 мг в
25 день для взрослого субъекта с нормальной массой.

[0094] Соединения по настоящему изобретению могут образовывать фармацевтически приемлемые соли как с органическими, так и с неорганическими кислотами или основаниями. Например, кислотно-аддитивные соли основных соединений получают путем растворения свободного основания в водном или водно-спиртовом растворе
30 или других подходящих растворителях, содержащих подходящую кислоту, и выделения соли посредством выпаривания раствора. Примеры фармацевтически приемлемой соли представляют собой гидрохлориды, гидробромиды, гидросульфаты и т.д., а также натриевые, калиевые и магниевые и т.п. соли. Соединения, характеризующиеся формулами I-IV, могут содержать один или несколько асимметричных атомов углерода.
35 Настоящее изобретение включает отдельные диастереомеры или энантиомеры и их смеси. Отдельные диастереомеры или энантиомеры могут быть получены или выделены с применением способов, уже хорошо известных из уровня техники.

[0095] Фармацевтические композиции включают соединения, представленные выше, или их соль и фармацевтический носитель. Как правило, фармацевтические композиции
40 разделяют на единицы дозирования. Примеры форм единиц дозирования включают без ограничения пилюли, порошки, таблетки, капсулы, водные и неводные растворы и суспензии для перорального введения и растворы для парентерального введения.

[0096] Примеры подходящих фармацевтических носителей включают без ограничения воду, сахара (например, лактозу и сахарозу), крахмалы (например, кукурузный крахмал
45 и картофельный крахмал), производные целлюлозы (например, карбоксиметилцеллюлозу натрия и метилцеллюлозу), желатин, тальк, стеариновую кислоту, стеарат магния, растительные масла (например, арахисовое масло, хлопковое масло, кунжутное масло, оливковое масло и т.д.), пропиленгликоль, глицерин, сорбит, полиэтиленгликоль, воду,

агар, альгиновую кислоту, солевой раствор и другие фармацевтически приемлемые материалы.

[0097] Процентное отношение активных ингредиентов фармацевтических композиций может варьировать в широких пределах. В одном предпочтительном варианте осуществления применяется концентрация по меньшей мере 10% в случае композиции в виде твердого вещества и по меньшей мере 2% в случае первичной жидкой композиции. Наиболее приемлемые композиции имеют более высокое процентное отношение активного вещества, что означает, что доля активного ингредиента в них намного больше.

[0098] Пути введения испытуемого соединения или его соли представляют собой пероральное введение или парентеральное введение. Например, приемлемая внутривенная доза составляет от 1 до 50 мг, и приемлемая дозировка при пероральном введении составляет от 5 до 800 мг.

[0099] В еще одном варианте осуществления представлен способ лечения заболеваний, имеющих отношение к гормону роста или вызванных посредством активности гормона роста. Идентифицируют субъекта, имеющего заболевание или состояние, вызванное активностью гормона роста или генов, регулируемых им, включая GHR, IGF-1 и ген инсулина. Субъекту вводят терапевтически эффективное количество антител, которые нацеливаются на рецептор гормона роста и/или гормон роста. В данном варианте осуществления используют ингибирующие моноклональные антитела к гормону роста (антитело к GH) или рецептору гормона роста (антитело к GHR) для снижения действия гормона роста (GH) и, вследствие этого, активности инсулинового фактора роста 1 (IGF-1) и инсулина. По причине способствующего росту действия GH и IGF-1 на некоторые клетки опухолей и поскольку передача сигнала GH/IGF-1 играет важную роль в процессе старения млекопитающих, настоящее изобретение имеет большой потенциал для обеспечения лекарственного средства на основе антител для того, чтобы а) ослабить/задержать рост GH- и/или IGF-1-зависимых клеток опухолей; б) индуцировать защиту на уровне организма против острого стресса, например, токсичности по отношению к нормальной ткани, связанной с химиотерапией или терапией рака, клеточной токсичности, вызванной радиацией, или других токсичных лекарственных средств и соединений; в) увеличить терапевтический индекс существующей химиотерапии или других видов терапии рака; г) модулировать факторы риска, связанные с возрастными заболеваниями; е) снизить/задержать изменения в биомаркерах, связанные со старением; ф) способствовать мультисистемной регенерации, основанной на стволовых клетках; г) снизить или задержать частоту возникновения болезни Альцгеймера и замедлить ее развитие.

[00100] Следующие примеры иллюстрируют различные варианты осуществления настоящего изобретения. Специалистам в данной области будут очевидны многочисленные варианты, которые находятся в пределах сущности настоящего изобретения и объема формулы изобретения.

[00101] Методики анализа. Следующие анализы применялись для скрининга активности: 1. Анализ фосфорилирования STAT5 и 2. Анализ репортерного гена люциферазы.

[00102] Сигнальный путь JAK/STAT является основным сигнальным механизмом для множества факторов роста и цитокинов. В сигнальном пути гормона роста димеризация GHR в ответ на связывание GH приводит к активации JAK путем трансфосфорилирования. Активированный JAK фосфорилирует STAT5, который может затем войти в ядро и активировать транскрипцию целевых генов. Ингибирование

фосфорилирования STAT5 будут применять для анализа свойств антагониста GHR исследуемых соединений.

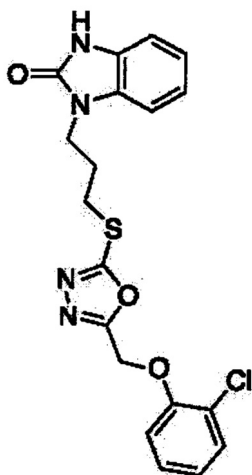
[00103] L-фибробласты мышцы, созданные для экспрессии GHR мышцы, получали от Dr. John Korchick. L-клетки, подвергавшиеся сывороточному голоданию (0,5% FBS в течение 24 часов), предварительно обрабатывали в течение 30 минут с помощью 10 мкМ каждого соединения, идентифицированного как совпадающее, из анализов люциферазы. После чего клетки обрабатывали 5 или 10 нМ hGH в течение 10 минут. Клетки собирали и обрабатывали для вестерн-блоттинга с использованием антител к фосфо-STAT5 и суммарных антител к STAT5 (клеточная передача сигнала). Антагонист GHR G120K применяли в качестве положительного контроля. Интенсивность полосы анализировали с применением данных ImageJ и фосфорилирования STAT5, нормированных по отношению к суммарным уровням STAT5. Соединения, которые ингибировали фосфорилирование STAT5, отбирали для дальнейшей оптимизации лекарственного средства.

[00104] С целью проведения скрининга с высокой пропускной способностью (HTS) для ингибиторов GHR создавали необратимо трансфицированные линии клеток HEK293 с репортерным геном люциферазы, управляемым промотором c-fos или SOCS2 (фигура 7).

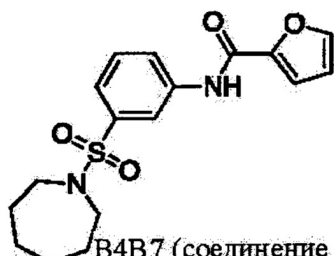
[00105] Белки SOCS (супрессор цитокиновой передачи сигнала) индуцированы GH и действуют в качестве отрицательных регуляторов путей цитокиновой передачи сигнала [30, 31]. Экспрессия протоонкогенного c-fos также индуцирована GH посредством пути Ras/MEK/ERK [32]. Конструкции репортерного гена люциферазы, где ген люциферазы находится под контролем промоторов либо SOCS2, либо c-fos, стабильно трансфицировали в эмбриональные клетки печени человека HEK293. Клетки подвергали сывороточному голоданию (0,5% FBS) в течение 24 часов, чтобы предотвратить вмешательство других факторов роста, а затем обрабатывали 5 или 10 нМ hGH (установленным во время исследования дозозависимого эффекта) и 10 мкМ каждого исследуемого соединения в течение 24 часов. После этого следовал лизис и анализ активности люциферазы с применением анализа репортерного гена люциферазы (Promega). Каждое соединение исследовали в тройной повторности в формате 96-луночного планшета.

[00106] С применением основного процесса скрининга авторов настоящего изобретения были идентифицированы три потенциальных ведущих соединения, которые ингибируют передачу сигнала GH-GHR (DSR 34, 37 и 38) (фигура 5А и В). На фигуре 5 показаны анализы репортерного гена люциферазы для трех соединений, DSR 34, 37 и 38. Все три соединения ингибировали GH-индуцированное увеличение репортерной активности c-fos и SOCS2 (фигура 5А и В). Дополнительно соединения могли ингибировать репортерную активность до более низкого уровня, чем в случае необработанного контроля, при этом репортерная активность c-fos составляла 57%, 27% и 46,5% относительно необработанного контроля, тогда как репортерная активность SOCS2 составляла 76%, 61% и 57% относительно необработанного контроля для соединений 34, 37 и 38 соответственно. Эти соединения также исследовали на предмет способности ингибировать GH-индуцированное фосфорилирование STAT5 в L-клетках мышцы, экспрессирующих GHR человека (фигура 6). Все три соединения способны ингибировать фосфорилирование STAT5 (фигура 6). Эти соединения далее оптимизировали и создавали дополнительное ведущее соединение (соединение 22), как показано ниже (фигура 7).

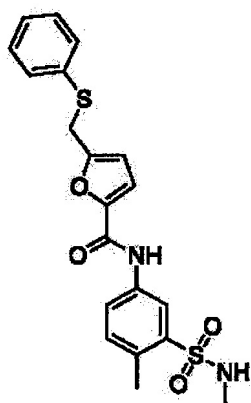
[00107] Структура соединений 22, 34, 37 и 38 представляет собой следующее:



Молекулярная масса: 416,88
B63H1 (соединение 22)



B4B7 (соединение 34)
Молекулярная масса: 348,42



B4G1 (соединение 37)
Молекулярная масса: 416,51



B5E8 (соединение 38)
Молекулярная масса: 458,53

;

или их фармацевтически приемлемые соли.

[00108] Чтобы определить, будет ли снижение передачи сигнала GH/IGF-1 путем ингибирования GH с применением антител к GH также защищать мышей от токсичности

химиотерапии, создавали антитела к гормону роста мыши. Самцов и самок мышей CD1 в возрасте четырех (4) недель иммунизировали ГН человека с помощью бустерных доз, введенной на неделе 10. Мыши демонстрировали потерю массы тела по сравнению с контролем, что указывало на то, что они производили антитела к ГН человека, которые были перекрестно реактивными с ГН мыши и, в свою очередь, замедляли рост (фигура 12А). Слот-блот-анализ сыворотки, взятой у иммунизированных мышей, показал реактивность к hGH у 34/40 мышей, подтверждая, что антитела образовывались (фигура 12В). Мыши, которым давали бустерную дозу hGH в возрасте 6 месяцев, а затем обрабатывали циклофосфамидом (CP), как показано, могли легче, чем контрольные, повторно набирать массу тела (фигура 12С). Общий анализ крови также показал, что эти мыши были более устойчивы к токсичности CP (фигура 12D). STI обозначает краткосрочную иммунизацию.

[00109] Разрабатывали моноклональные антитела к различным областям внеклеточного домена GHR мыши. Гормон роста асимметрично связывается с гомодимером рецептора гормона роста, что приводит к вращению субъединиц GHR относительно друг друга. Исходя из сегодняшнего понимания связывания ГН-GHR, можно предположить, что изменение конформации данного димера рецептора распространяется через трансмембранный домен и приводит к трансдукции сигнала в нисходящем направлении на тирозинкиназу. В зависимости от расположения эпитопа и связывающей способности связывание с моноклональными антителами может привести к изменению конформации рецептора, агрегации и изменению белок-белкового взаимодействия, которое может привести как к стимулирующим, так и ингибирующим эффектам в отношении GHR (см. фигуру 11). Например, моноклональное антитело C562 нацеливается на N-терминальную область GHR (фигуры 9 и 10, белок-мишень- SEQ ID NO 2: TEGDNPDLKTPG, закрашенный бледно-лиловым цветом), которая приближена к сайту связывания ГН и, таким образом, препятствует лиганд-рецепторному взаимодействию; моноклональное антитело C565 связывает GHR в области (фигуры 9 и 10, белок-мишень- SEQ ID NO: ESKWKVMGPIWL, закрашенный цветом морской волны), которая может препятствовать как димеризации субъединиц GHR, так и переориентации субъединиц после связывания ГН; моноклональное антитело C592 нацелено на область GHR (фигуры 9 и 10, белок-мишень- SEQ ID NO 6: TVDEIVQDPPI, красный оттенок), расположенную в "шарнирной" области внеклеточного домена GHR. Связывание C592 может препятствовать связыванию ГН и способствовать скоплению GHR, эндоцитозу и деградации (фигура 9С и D). Такие антагонистические и агонистические моноклональные антитела и их производные (например, препараты Fab, F(ab')₂) могли бы быть сильнодействующими терапевтическими средствами, модулирующим действие ГН-GHR in vivo. По этой причине были описаны новые и эффективные антитела, связывающие GHR для воздействия на его активность.

[00110] Хотя иллюстративные варианты осуществления описаны выше, это не означает, что данные варианты осуществления описывают все возможные формы настоящего изобретения. Точнее, слова, используемые в описании, являются описательными, а не ограничивающими словами, и следует понимать, что различные изменения могут быть произведены без отступления от сути и объема настоящего изобретения. Кроме того, признаки различных реализуемых вариантов осуществления могут быть объединены с получением дополнительных вариантов осуществления настоящего изобретения.

Ссылки

1. Kopchick, J.J., et al., Growth hormone receptor antagonists: discovery, development, and use in patients with acromegaly. *Endocr Rev*, 2002. 23(5): p. 623-46.

2. DePinho, R.A., The age of cancer. *Nature*, 2000. 408(6809): p. 248-54.

3. Jemal, A., et al., Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*, 2008. 58(2): p. 71-96.

5 4. Wedding, U., L. Pientka, and K. Hoffken, Quality-of-life in elderly patients with cancer: a short review. *Eur J Cancer*, 2007. 43(15): p. 2203-10.

5. Balducci, L. and M. Extermann, Management of cancer in the older person: a practical approach. *Oncologist*, 2000. 5(3): p. 224-37.

6. Minami, H., et al., Comparison of pharmacokinetics and pharmacodynamics of docetaxel and Cisplatin in elderly and non-elderly patients: why is toxicity increased in elderly patients? *J Clin Oncol*, 2004. 22(14): p. 2901-8.

7. Wedding, U., et al., Tolerance to chemotherapy in elderly patients with cancer. *Cancer Control*, 2007. 14(1): p. 44-56.

8. Repetto, L., Greater risks of chemotherapy toxicity in elderly patients with cancer. *J Support Oncol*, 2003. 1(4 Suppl 2): p. 18-24.

9. Brown-Borg, H.M., et al., Dwarf mice and the ageing process. *Nature*, 1996. 384(6604): p. 33.

10. Coschigano, K.T., et al., Assessment of growth parameters and life span of GHR/BP gene-disrupted mice. *Endocrinology*, 2000. 141(7): p. 2608-13.

11. Holzenberger, M., et al., IGF-1 receptor regulates lifespan and resistance to oxidative stress in mice. *Nature*, 2003. 421(6919): p. 182-7.

12. Flurkey, K., et al., Lifespan extension and delayed immune and collagen aging in mutant mice with defects in growth hormone production. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001. 98(12): p. 6736-41.

13. Brown-Borg, H.M. and S.G. Rakoczy, Catalase expression in delayed and premature aging mouse models. *Exp Gerontol*, 2000. 35(2): p. 199-212.

14. Brown-Borg, H.M., et al., Effects of growth hormone and insulin-like growth factor-1 on hepatocyte antioxidative enzymes. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2002. 227(2): p. 94-104.

15. Murakami, S., Stress resistance in long-lived mouse models. *Exp Gerontol*, 2006. 41(10): p. 1014-9.

16. Sharma, H.S., et al., Neurotrophic factors influence upregulation of constitutive isoform of heme oxygenase and cellular stress response in the spinal cord following trauma. An experimental study using immunohistochemistry in the rat. *Amino Acids*, 2000. 19(1): p. 351-61.

17. Li, Y., et al., SirT1 inhibition reduces IGF-I/IRS-2/Ras/ERK1/2 signaling and protects neurons. *Cell Metab*, 2008. 8(1): p. 38-48.

18. Fabrizio, P., et al., SOD2 functions downstream of Sch9 to extend longevity in yeast. *Genetics*, 2003. 163(1): p. 35-46.

19. Fabrizio, P., et al., Regulation of longevity and stress resistance by Sch9 in yeast. *Science*, 2001. 292(5515): p. 288-90.

20. Longo, V.D., et al., Human Bcl-2 reverses survival defects in yeast lacking superoxide dismutase and delays death of wild-type yeast. *J Cell Biol*, 1997. 137(7): p. 1581-8.

21. Wei, M., et al., Life span extension by calorie restriction depends on Rim15 and transcription factors downstream of Ras/PKA, Tor, and Sch9. *PLoS Genet*, 2008. 4(1): p. e13.

22. Yan, L., et al., Type 5 adenylyl cyclase disruption increases longevity and protects against stress. *Cell*, 2007. 130(2): p. 247-58.

23. Longo, V.D. and C.E. Finch, Evolutionary medicine: from dwarf model systems to healthy centenarians? *Science*, 2003. 299(5611): p. 1342-6.

24. Kandel, E.S. and N. Hay, The regulation and activities of the multifunctional serine/threonine

kinase Akt/PKB. *Exp Cell Res*, 1999. 253(1): p. 210-29.

25. Pollak, M.N., E.S. Schernhammer, and S.E. Hankinson, Insulin-like growth factors and neoplasia. *Nat Rev Cancer*, 2004. 4(7): p. 505-18.

26. Guevara-Aguirre, J., et al., Growth hormone receptor deficiency is associated with a major reduction in pro-aging signaling, cancer, and diabetes in humans. *Sci Transl Med*, 2011. 3(70): p. 70ra13.

27. Kopchick, J.J., Discovery and development of a new class of drugs: GH antagonists. *J Endocrinol Invest*, 2003. 26(10 Suppl): p. 16-26.

28. Raffaghello, L., et al., Starvation-dependent differential stress resistance protects normal but not cancer cells against high-dose chemotherapy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008. 105(24): p. 8215-20.

29. Maxwell, S.R. and G.Y. Lip, Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *Int J Cardiol*, 1997. 58(2): p. 95-117.

30. Flores-Morales, A., et al., Negative regulation of growth hormone receptor signaling. *Mol Endocrinol*, 2006. 20(2): p. 241-53.

31. Wormald, S. and D.J. Hilton, Inhibitors of cytokine signal transduction. *J Biol Chem*, 2004. 279(2): p. 821-4.

32. Hodge, C., et al., Growth hormone stimulates phosphorylation and activation of elk-1 and expression of c-fos, egr-1, and jun B through activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *J Biol Chem*, 1998. 273(47): p. 31327-36.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

<110> University of Southern California

<120> БЛОКАТОРЫ РЕЦЕПТОРА ГОРМОНА РОСТА ПРИ ПРЕДУПРЕЖДЕНИИ ЗАБОЛЕВАНИЙ И ЛЕЧЕНИИ

<130> USC 0138 PUSP

<160> 9

<170> PatentIn версия 3.5

<210> 1

<211> 650

<212> БЕЛОК

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Asp Leu Cys Gln Val Phe Leu Thr Leu Ala Leu Ala Val Thr Ser
1 5 10 15

Ser Thr Phe Ser Gly Ser Glu Ala Thr Pro Ala Thr Leu Gly Lys Ala
20 25 30

Ser Pro Val Leu Gln Arg Ile Asn Pro Ser Leu Gly Thr Ser Ser Ser
35 40 45

Gly Lys Pro Arg Phe Thr Lys Cys Arg Ser Pro Glu Leu Glu Thr Phe
50 55 60

Ser Cys Tyr Trp Thr Glu Gly Asp Asn Pro Asp Leu Lys Thr Pro Gly
65 70 75 80

Ser Ile Gln Leu Tyr Tyr Ala Lys Arg Glu Ser Gln Arg Gln Ala Ala
85 90 95

Arg Ile Ala His Glu Trp Thr Gln Glu Trp Lys Glu Cys Pro Asp Tyr
100 105 110

Val Ser Ala Gly Lys Asn Ser Cys Tyr Phe Asn Ser Ser Tyr Thr Ser
115 120 125

Ile Trp Ile Pro Tyr Cys Ile Lys Leu Thr Thr Asn Gly Asp Leu Leu

RU 2726 254 C2

	130		135		140											
	Asp	Gln	Lys	Cys	Phe	Thr	Val	Asp	Glu	Ile	Val	Gln	Pro	Asp	Pro	Pro
	145						150					155				160
	Ile	Gly	Leu	Asn	Trp	Thr	Leu	Leu	Asn	Ile	Ser	Leu	Thr	Gly	Ile	Arg
5					165					170					175	
	Gly	Asp	Ile	Gln	Val	Ser	Trp	Gln	Pro	Pro	Pro	Asn	Ala	Asp	Val	Leu
				180					185				190			
	Lys	Gly	Trp	Ile	Ile	Leu	Glu	Tyr	Glu	Ile	Gln	Tyr	Lys	Glu	Val	Asn
			195					200				205				
10	Glu	Ser	Lys	Trp	Lys	Val	Met	Gly	Pro	Ile	Trp	Leu	Thr	Tyr	Cys	Pro
	210						215				220					
	Val	Tyr	Ser	Leu	Arg	Met	Asp	Lys	Glu	His	Glu	Val	Arg	Val	Arg	Ser
	225				230				235							240
	Arg	Gln	Arg	Ser	Phe	Glu	Lys	Tyr	Ser	Glu	Phe	Ser	Glu	Val	Leu	Arg
15				245					250				255			
	Val	Ile	Phe	Pro	Gln	Thr	Asn	Ile	Leu	Glu	Ala	Cys	Glu	Glu	Asp	Ile
				260					265				270			
	Gln	Phe	Pro	Trp	Phe	Leu	Ile	Ile	Ile	Phe	Gly	Ile	Phe	Gly	Val	Ala
		275					280				285					
20	Val	Met	Leu	Phe	Val	Val	Ile	Phe	Ser	Lys	Gln	Gln	Arg	Ile	Lys	Met
	290						295				300					
	Leu	Ile	Leu	Pro	Pro	Val	Pro	Val	Pro	Lys	Ile	Lys	Gly	Ile	Asp	Pro
	305				310				315							320
	Asp	Leu	Leu	Lys	Glu	Gly	Lys	Leu	Glu	Glu	Val	Asn	Thr	Ile	Leu	Gly
25				325					330				335			
	Ile	His	Asp	Asn	Tyr	Lys	Pro	Asp	Phe	Tyr	Asn	Asp	Asp	Ser	Trp	Val
			340					345				350				
	Glu	Phe	Ile	Glu	Leu	Asp	Ile	Asp	Glu	Ala	Asp	Val	Asp	Glu	Lys	Thr
		355					360				365					
30	Glu	Gly	Ser	Asp	Thr	Asp	Arg	Leu	Leu	Ser	Asn	Asp	His	Glu	Lys	Ser
	370						375				380					
	Ala	Gly	Ile	Leu	Gly	Ala	Lys	Asp	Asp	Asp	Ser	Gly	Arg	Thr	Ser	Cys
	385				390				395							400
	Tyr	Asp	Pro	Asp	Ile	Leu	Asp	Thr	Asp	Phe	His	Thr	Ser	Asp	Met	Cys
35				405					410				415			
	Asp	Gly	Thr	Leu	Lys	Phe	Arg	Gln	Ser	Gln	Lys	Leu	Asn	Met	Glu	Ala
			420					425				430				
	Asp	Leu	Leu	Cys	Leu	Asp	Gln	Lys	Asn	Leu	Lys	Asn	Leu	Pro	Tyr	Asp
		435					440				445					
40	Ala	Ser	Leu	Gly	Ser	Leu	His	Pro	Ser	Ile	Thr	Gln	Thr	Val	Glu	Glu
	450						455				460					
	Asn	Lys	Pro	Gln	Pro	Leu	Leu	Ser	Ser	Glu	Thr	Glu	Ala	Thr	His	Gln
	465				470				475							480
	Leu	Ala	Ser	Thr	Pro	Met	Ser	Asn	Pro	Thr	Ser	Leu	Ala	Asn	Ile	Asp
45				485					490				495			
	Phe	Tyr	Ala	Gln	Val	Ser	Asp	Ile	Thr	Pro	Ala	Gly	Gly	Asp	Val	Leu
			500				505				510					
	Ser	Pro	Gly	Gln	Lys	Ile	Lys	Ala	Gly	Ile	Ala	Gln	Gly	Asn	Thr	Gln

RU 2 726 254 C2

	515		520		525												
	Arg	Glu	Val	Ala	Thr	Pro	Cys	Gln	Glu	Asn	Tyr	Ser	Met	Asn	Ser	Ala	
	530						535					540					
	Tyr	Phe	Cys	Glu	Ser	Asp	Ala	Lys	Lys	Cys	Ile	Ala	Val	Ala	Arg	Arg	
5	545					550					555					560	
	Met	Glu	Ala	Thr	Ser	Cys	Ile	Lys	Pro	Ser	Phe	Asn	Gln	Glu	Asp	Ile	
					565					570					575		
	Tyr	Ile	Thr	Thr	Glu	Ser	Leu	Thr	Thr	Thr	Ala	Gln	Met	Ser	Glu	Thr	
				580					585					590			
10	Ala	Asp	Ile	Ala	Pro	Asp	Ala	Glu	Met	Ser	Val	Pro	Asp	Tyr	Thr	Thr	
		595					600					605					
	Val	His	Thr	Val	Gln	Ser	Pro	Arg	Gly	Leu	Ile	Leu	Asn	Ala	Thr	Ala	
		610					615					620					
	Leu	Pro	Leu	Pro	Asp	Lys	Lys	Asn	Phe	Pro	Ser	Ser	Cys	Gly	Tyr	Val	
15	625					630					635					640	
	Ser	Thr	Asp	Gln	Leu	Asn	Lys	Ile	Met	Gln							
					645					650							
	<210>	2															
	<211>	12															
20	<212>	BEJOK															
	<213>	Homo sapiens															
	<400>	2															
	Thr	Glu	Gly	Asp	Asn	Pro	Asp	Leu	Lys	Thr	Pro	Gly					
	1				5					10							
25	<210>	3															
	<211>	12															
	<212>	BEJOK															
	<213>	Homo sapiens															
	<400>	3															
30	Glu	Ser	Lys	Trp	Lys	Val	Met	Gly	Pro	Ile	Trp	Leu					
	1				5					10							
	<210>	4															
	<211>	12															
	<212>	BEJOK															
35	<213>	Homo sapiens															
	<400>	4															
	Lys	Leu	Thr	Thr	Asn	Gly	Asp	Leu	Leu	Asp	Gln	Lys					
	1				5					10							
	<210>	5															
40	<211>	12															
	<212>	BEJOK															
	<213>	Homo sapiens															
	<400>	5															
	Arg	Ser	Phe	Glu	Lys	Tyr	Ser	Glu	Phe	Ser	Glu	Val					
45	1				5					10							
	<210>	6															
	<211>	12															
	<212>	BEJOK															

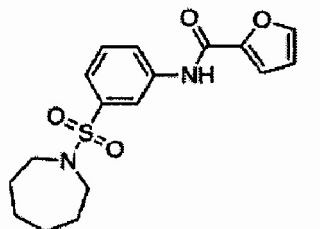
<213> Homo sapiens
 <400> 6
 Thr Val Asp Glu Ile Val Gln Pro Asp Pro Pro Ile
 1 5 10
 5 <210> 7
 <211> 12
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 7
 10 Thr Leu Leu Asn Ile Ser Leu Thr Gly Ile Arg Gly
 1 5 10
 <210> 8
 <211> 12
 <212> БЕЛОК
 15 <213> Homo sapiens
 <400> 8
 Glu Tyr Glu Ile Gln Tyr Lys Glu Val Asn Glu Ser
 1 5 10
 <210> 9
 20 <211> 12
 <212> БЕЛОК
 <213> Homo sapiens
 <400> 9
 Pro Val Tyr Ser Leu Arg Met Asp Lys Glu His Glu
 25 1 5 10

(57) Формула изобретения

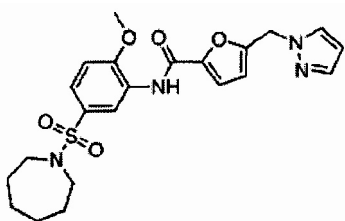
1. Способ ингибирования GH, GHR, STAT5, SOCS и c-fos, включающий:

идентификацию субъекта, имеющего заболевание или состояние с изменениями
 30 экспрессии или активности генов/белков, относящихся к GH, GHR, STAT5 и SOCS
 человека, или на которого изменения экспрессии или активности генов/белков,
 относящихся к GH, GHR, STAT5 и SOCS человека, могут оказывать благоприятный
 эффект; и

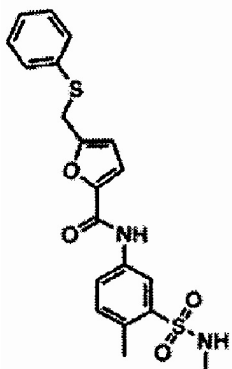
введение терапевтически эффективного количества соединения, выбранного из
 35 группы, состоящей из:



;



;

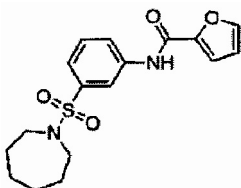


;

и их фармацевтически приемлемых солей.

2. Способ по п. 1, где заболевания или состояния выбраны из группы, состоящей из акромегалии, химиотерапии, рака, диабета, иммуносупрессии, болезни Альцгеймера и заболеваний и состояний, в отношении которых клеточная и тканевая регенерация оказывает благоприятный эффект.

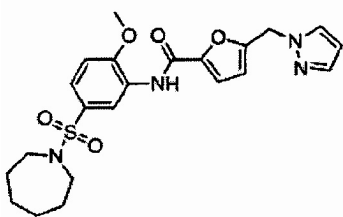
3. Способ по п. 1, где соединение выбрано из группы, состоящей из



,

и его фармацевтически приемлемых солей.

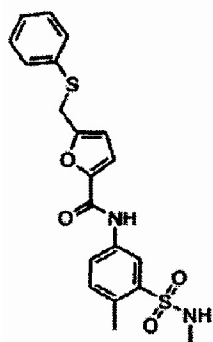
4. Способ по п. 1, где соединение выбрано из группы, состоящей из



,

и его фармацевтически приемлемых солей.

5. Способ по п. 1, где соединение выбрано из группы, состоящей из



и его фармацевтически приемлемых солей.

6. Способ по п. 3, где заболевания или состояния выбраны из группы, состоящей из акромегалии, химиотерапии, рака, диабета, иммуносупрессии, болезни Альцгеймера и заболеваний и состояний, в отношении которых клеточная и тканевая регенерация оказывает благоприятный эффект.

7. Способ по п. 4, где заболевания или состояния выбраны из группы, состоящей из акромегалии, химиотерапии, рака, диабета, иммуносупрессии, болезни Альцгеймера и заболеваний и состояний, в отношении которых клеточная и тканевая регенерация оказывает благоприятный эффект.

8. Способ по п. 5, где заболевания или состояния выбраны из группы, состоящей из акромегалии, химиотерапии, рака, диабета, иммуносупрессии, болезни Альцгеймера и заболеваний и состояний, в отношении которых клеточная и тканевая регенерация оказывает благоприятный эффект.

9. Способ по п. 6, где заболевания или состояния выбраны из группы, состоящей из акромегалии, рака, диабета, иммуносупрессии и болезни Альцгеймера.

10. Способ по п. 7, где заболевания или состояния выбраны из группы, состоящей из акромегалии, рака, диабета, иммуносупрессии и болезни Альцгеймера.

11. Способ по п. 8, где заболевания или состояния выбраны из группы, состоящей из акромегалии, рака, диабета, иммуносупрессии и болезни Альцгеймера.

12. Способ по п. 2, где заболевание или состояние представляет собой акромегалию.

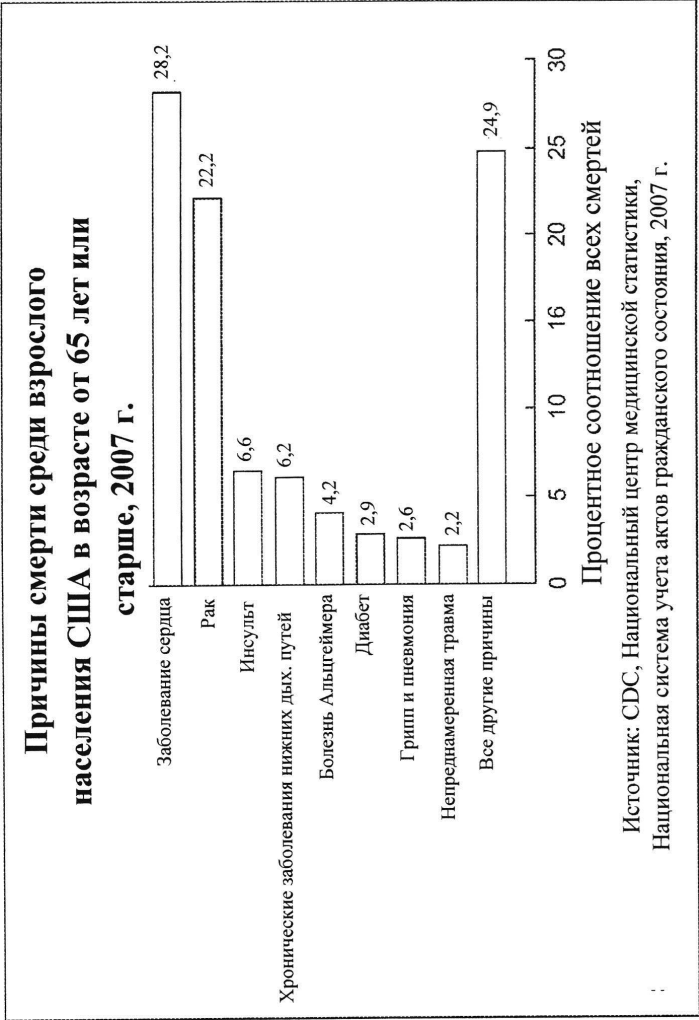
13. Способ по п. 2, где заболевание или состояние представляет собой рак.

14. Способ по п. 2, где заболевание или состояние представляет собой диабет.

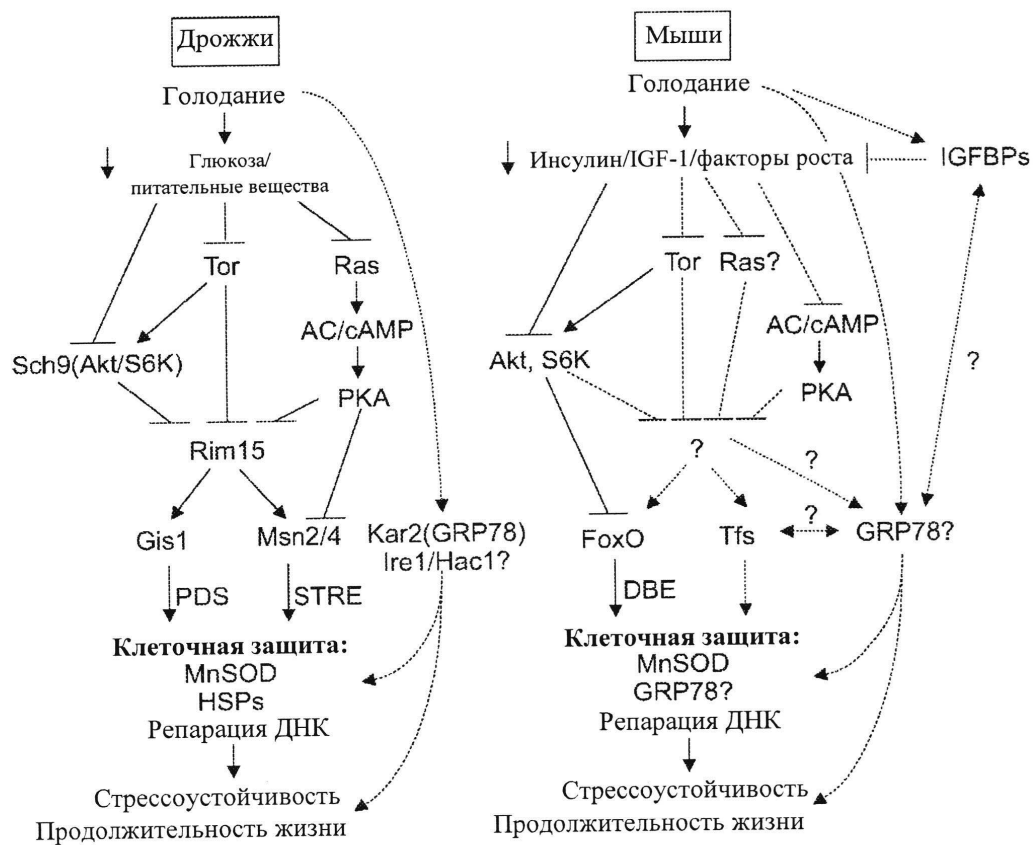
15. Способ по п. 2, где заболевание или состояние представляет собой болезнь Альцгеймера.

16. Способ по п. 2, где заболевание или состояние представляет собой иммуносупрессию.

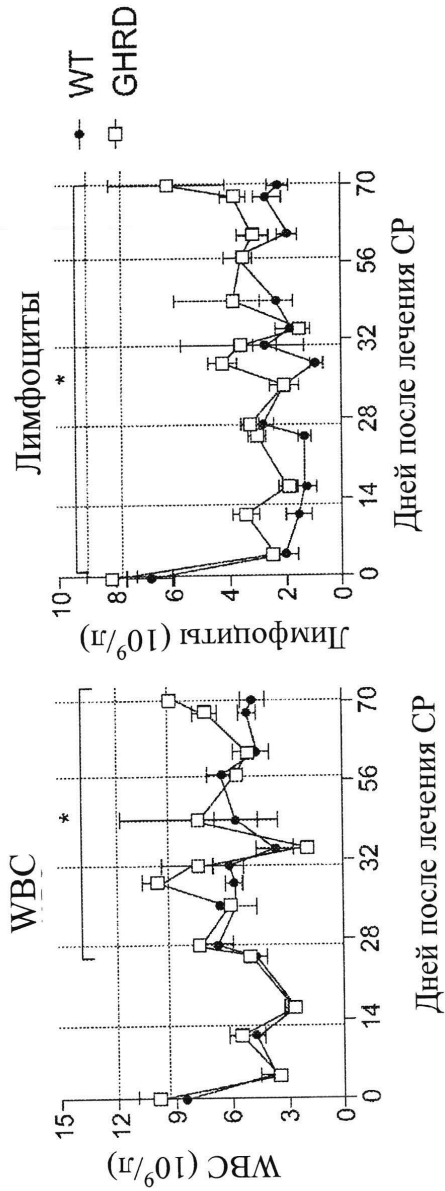
17. Способ по п. 2, где заболевания или состояния представляют собой заболевания и состояния, в отношении которых клеточная и тканевая регенерация оказывает благоприятный эффект.



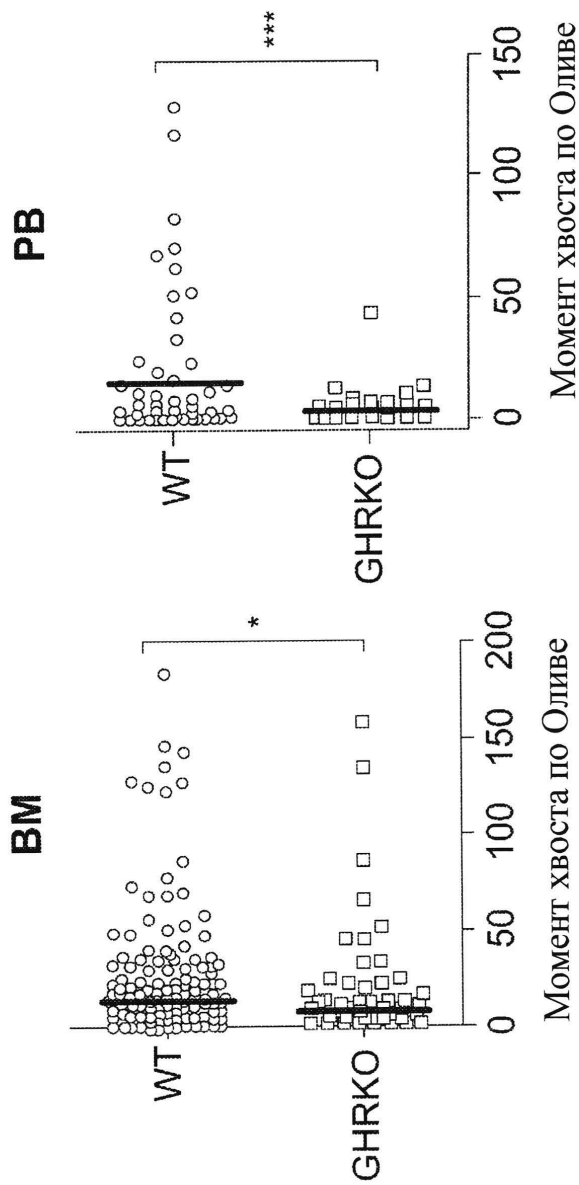
Фиг. 1



Фиг. 2

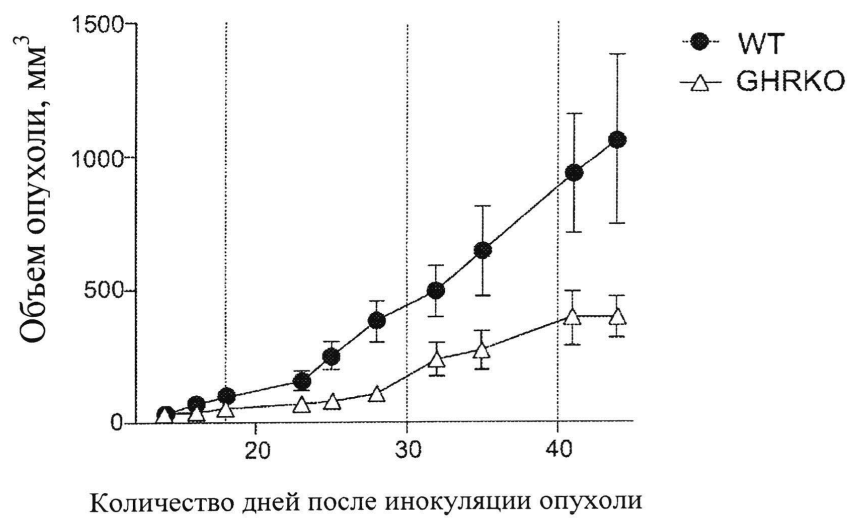


Фиг. 3А

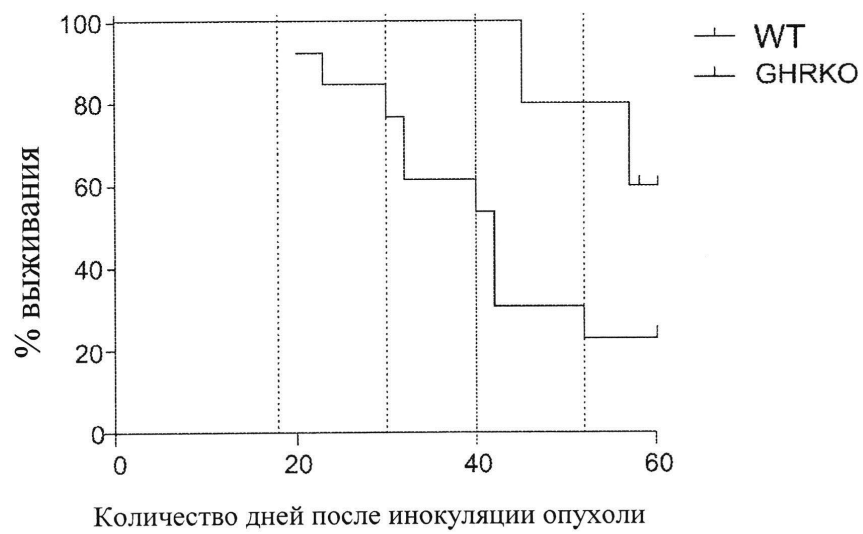


Фиг. 3В

5/15

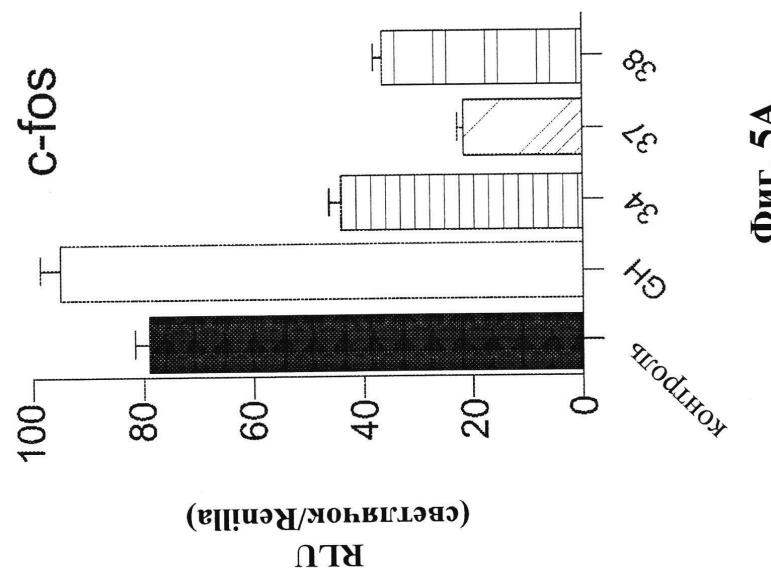
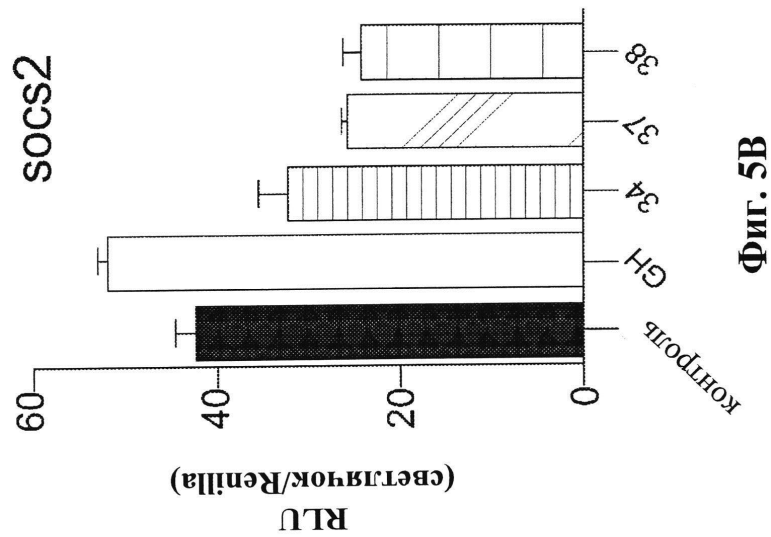


Фиг. 4А

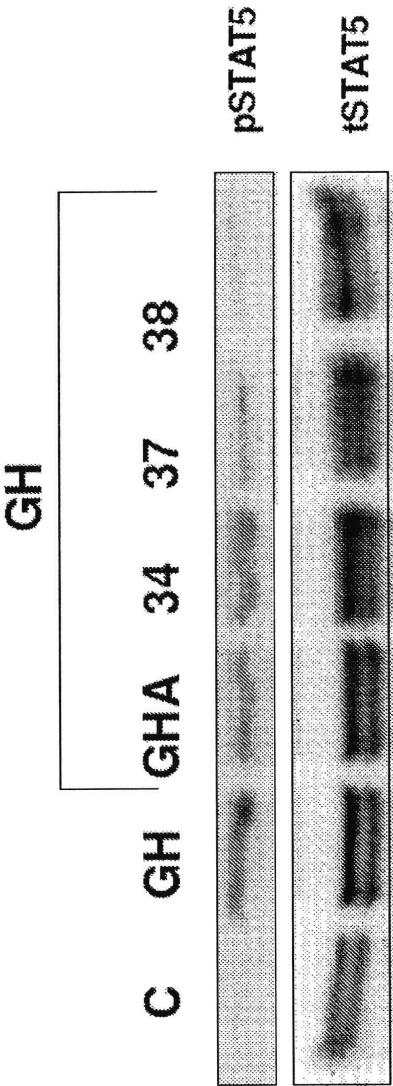


Фиг. 4В

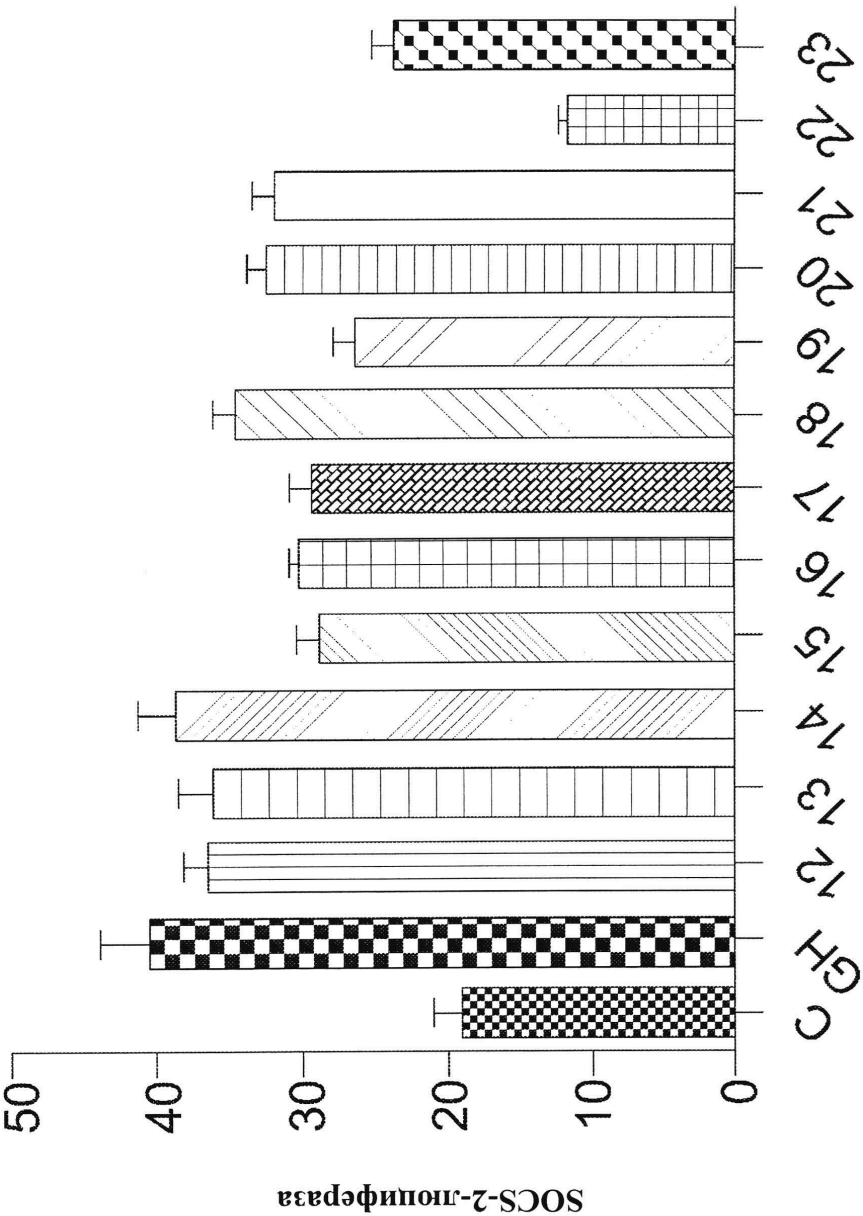
6/15



7/15



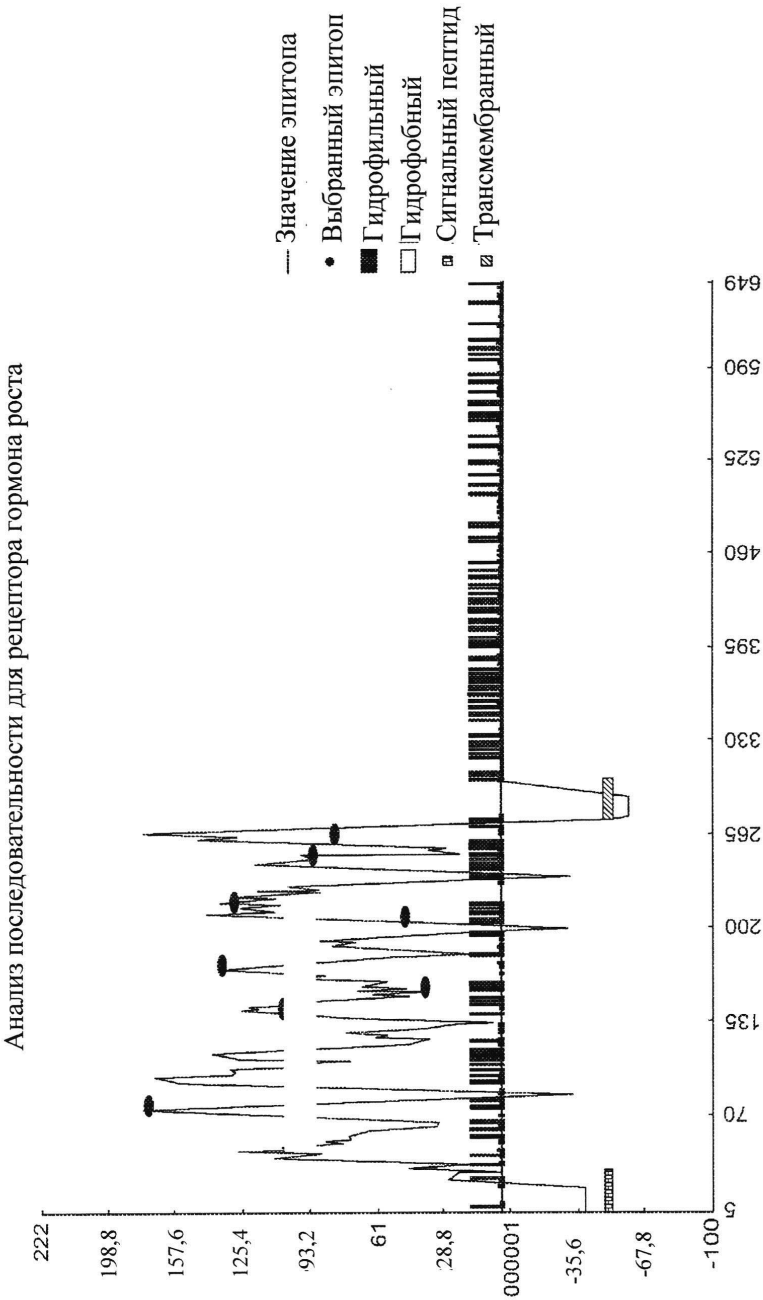
Фиг. 6



Фиг. 7

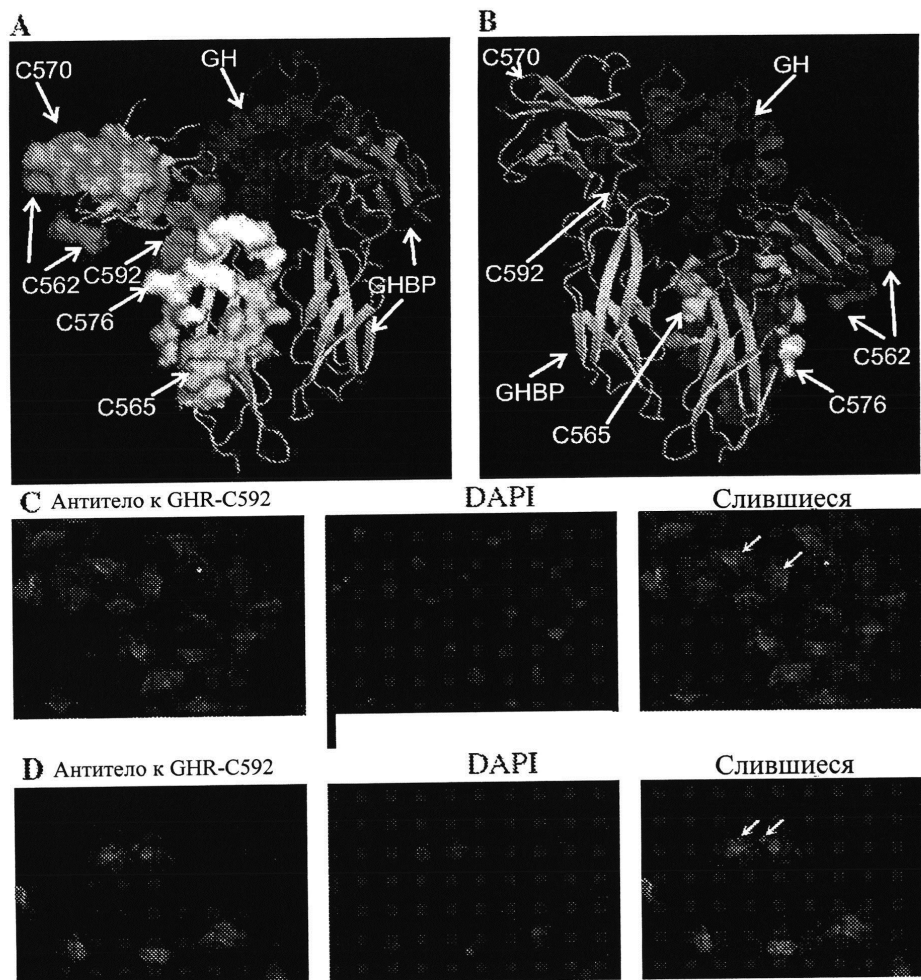
MDLCQVFLTLALAVTSSTFSGSEATPATLGKASPVLQRINPSLGTSSSGKPRFTKCRSPELE
TFSCYWTEGDNPDCLKTPGSIQLYYAKRESQRQAARIAHEWWTQEWKECPDYVSAGKNSC
YFNSSYTSIWIPYCIKLTNTNGDLLDQKCTVDEIVQDPPIGLNWTLLNISLTGIRGDIQVS
WQPPPNADVLLKGWIILEYEIQYKEVNESKWVMGPIWLTYPVYSLRMDKEHEVRVRS
RQRSFEKYSEFSEVLRVIFPQTNILEACEEDIQFPWFLLIIFGIFGVAVMILFVVFSSKQQRKIM
 LILPPVPVPKIGIDPDLKKEGLEEVNTILGIHDNYKPDFYNDSDSWVEFIELDIDEADV
 EKTEGSDTDRLLSNDHEKSAGILGAKDDDSGRTSCYDPDILDTDFTSDMCDGTLKFRQ
 SQKLNMEADLLCLDQKNLKNLPYDASGLSLHPSITQTVEENKPPQLLSSETEATHQLAST
 PMSNPTSLANIDFYAQVSDITPAGGDVLSPPGQKIKAGIAQGNTRQREVATPCQENYSMNSA
 YFCESDAKKCIAVARRMEATSCIKPSFNQEDIYITTESLTTTAQMSETADIAPDAEMSVPD
 YTTVHTVQSPRGLILNATALPLPKKNFPSSCGYVSTDQLNKIMQ

Фиг. 8А



Фиг. 8В

11/15



Фиг. 9

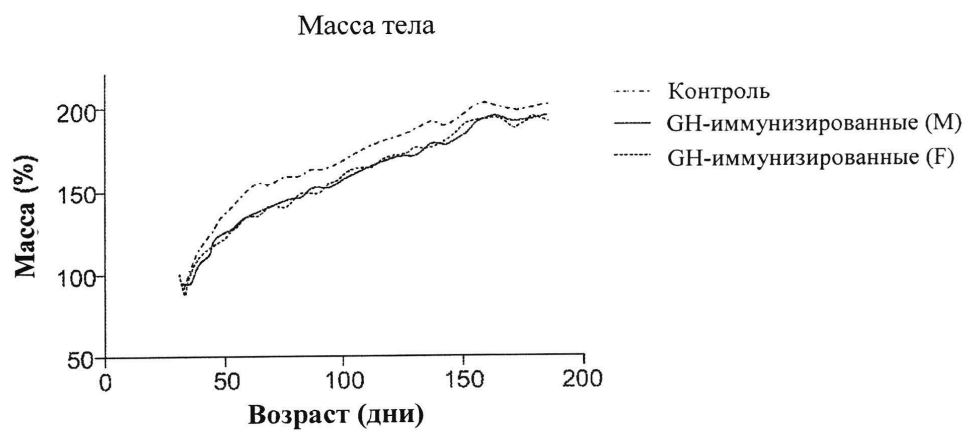
12/15

Моноклональное антитело	Эпитоп	GHR (N)	GHR (C)
14618-1-1/C562	SEQ ID NO 2: TEGDNPDLKTPG	69	80
14618-1-3/C565	SEQ ID NO 3: ESKWKVMGPIWL	209	220
14618-1-5/C570	SEQ ID NO 4: KLTNGDLLDQK	136	147
14618-1-6/C576	SEQ ID NO 5: RSFEKYSEFSEV	243	254
14618-1-8/C592	SEQ ID NO 6: TVDEIVQDPPI	150	161
14618-1-4/C000	SEQ ID NO 7: TLLNISLTGIRG	166	177
14618-1-7/C579, 580, 581	SEQ ID NO 8: EYEIQYKEVNES	199	210
14618-1-9/C497	SEQ ID NO 9: PVYSLRMDKEHE	224	235

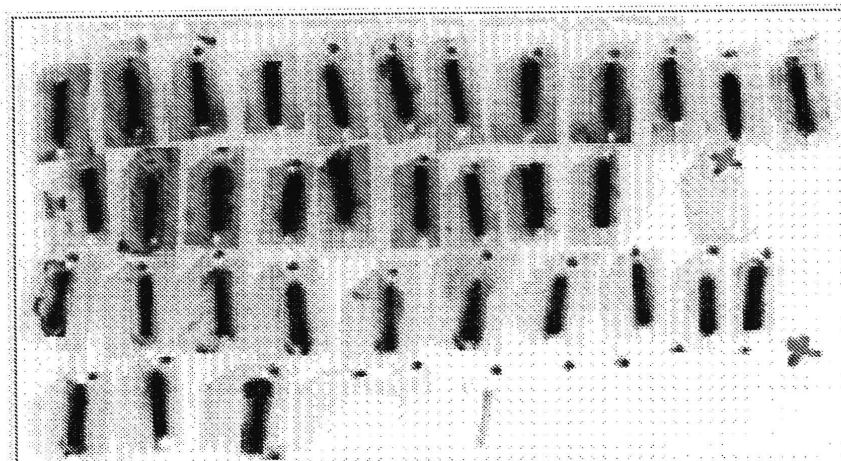
Фиг. 10



14/15

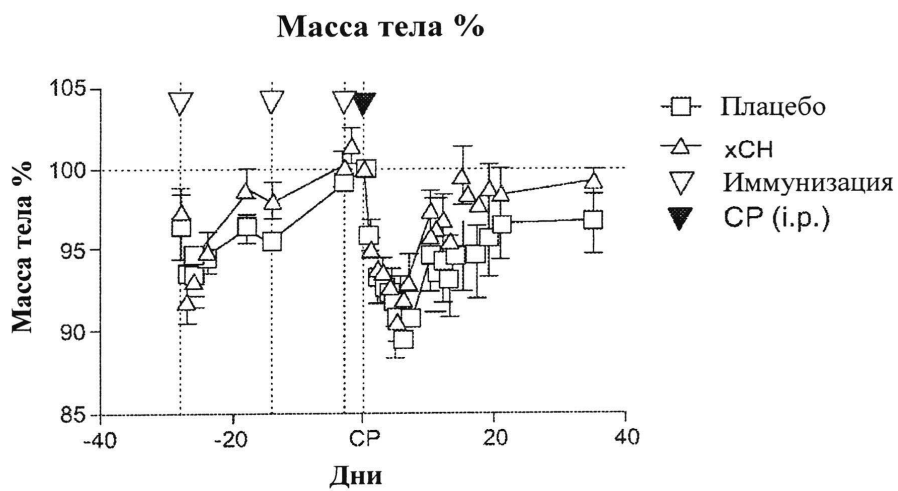


Фиг. 12А

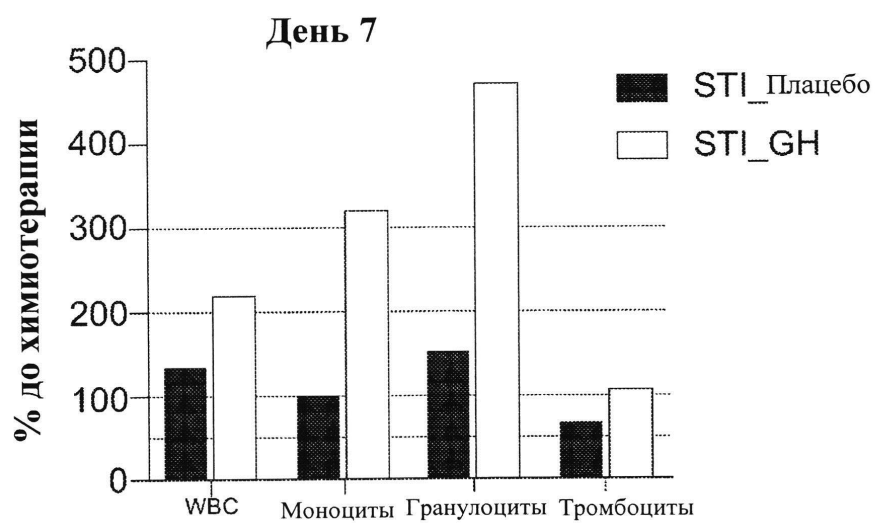


Фиг. 12В

15/15



Фиг. 12С



Фиг. 12D