

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **043755**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.06.20

(21) Номер заявки
202092086

(22) Дата подачи заявки
2019.03.04

(51) Int. Cl. *A61K 31/69* (2006.01)
C07F 5/02 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) ИНГИБИТОРЫ АРГИНАЗЫ(31) **62/638,412**(32) **2018.03.05**(33) **US**(43) **2021.02.09**(86) **PCT/US2019/020507**(87) **WO 2019/173188 2019.09.12**

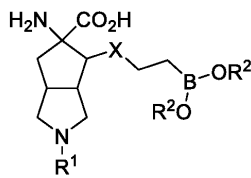
(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АРКУС БАЙОСАЙЕНСИЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Фоли Корин Николь, Грейндж Ребека
Луис, Гуней Тезджан, Калисиак
Ярослав, Ньюкомб Эрик Томас, Тран
Анх Тху (US)**

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(56) PUBCHEM-CID: 67513622 Create Date: 30
November 2012 (30.11.2012) pg 2, structure
WO-A1-2016210106
US-A1-0150191492
WO-A1-2016100555
US-A1-20170319536

(57) В изобретении описаны соединения, которые являются ингибиторами по меньшей мере одного из ARG1 и ARG2, а также композиции, содержащие соединения, и способы синтеза этих соединений. В изобретении также описано применение таких соединений и композиций для лечения разнообразного множества заболеваний, нарушений и состояний, включая рак и иммунозависимые нарушения, которые опосредуются, по меньшей мере частично, ARG1 и ARG2. Более конкретно, изобретение относится к соединению формулы (I)



или его фармацевтически приемлемой соли, где X представляет собой CH₂; R¹ является элементом, выбранным из группы, состоящей из H, X^a-NH₂, -C(O)-X^a-NH₂ и R^c, при этом X^a представляет собой C₁₋₄ алкилен, который является незамещенным; и R^c представляет собой четырех-шестичленное насыщенное гетероциклическое кольцо, имеющее вершину кольца, которая означает O; или представляет собой C₁₋₆ алкил, который замещен одним-тремя заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксила и amino; или R¹ является натуральной аминокислотой, выбранной из группы, состоящей из аланина и пролина; и каждый R² представляет собой H.

B1**043755****043755****B1**

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится к соединениям, которые являются ингибиторами по меньшей мере одного из ARG1 и ARG2, а также композициям, содержащим соединения, и способам синтеза этих соединений. Изобретение также относится к применению таких соединений и композиций для лечения разнообразного множества заболеваний, нарушений и состояний, включая рак и иммунозависимые нарушения, которые опосредуются, по меньшей мере частично, ARG1 и ARG2.

Предшествующий уровень техники

Аргиназа играет фундаментальную роль в цикле мочевины печени, метаболизируя L-аргинин до L-орнитина и мочевины. Кроме того, было показано, что аргиназа отвечает или участвует в вызванной воспалением иммунной дисфункции, ускользании опухоли от иммунного ответа, иммуносупрессии и иммунопатологии инфекционного заболевания [Bronte V, Zanovello P (2005b). Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat Rev Immunol* 5: 641-654].

У человека существуют два изофермента аргиназы: аргиназа I (ARG-1) и аргиназа II (ARG-2). Они катализируют одну и ту же биохимическую реакцию, но различаются клеточной экспрессией, регуляцией и субклеточной локализацией [Jenkinson et al. (1996). Comparative properties of arginases. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 114: 107-132]. ARG-1 истощает аргинин в микроокружении опухоли, что приводит к нарушению функции T-клеток, например, к остановке пролиферации и секреции цитокинов. [Rodriguez et al. (2002). Regulation of T cell receptor CD3zeta chain expression by L-arginine. *J Biol Chem* 277: 21123-21129; Munder, Arginase in the Immune System, *British Journal of Pharmacology* (2009) 158 638-651]. Высокие уровни аргиназы были обнаружены у пациентов с различными видами рака, включая рак желудка, рак толстой кишки, рак молочной железы и рак легкого [Suer et al. (1999). Arginase and ornithine, as markers in human non-small cell lung carcinoma. *Cancer Biochem Biophys* 17:125-31; Singh et al. (2000). Arginase activity in human breast cancer cell lines: N(omega)-hydroxy-L-arginine selectively inhibits cell proliferation and induces apoptosis in MDA-MB-468 cells. *Cancer Res* 60:3305-12].

Таким образом, существует потребность в ингибиторах аргиназы. Настоящее изобретение удовлетворяет эту потребность, а также обеспечивает связанные с этим преимущества.

Краткое изложение сущности изобретения

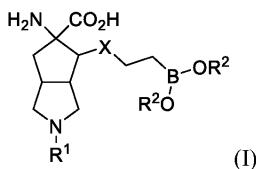
Настоящее изобретение относится к соединениям, которые ингибируют аргиназу, и к композициям (например, фармацевтическим композициям), содержащим эти соединения. Такие соединения, включая способы их синтеза, и композиции подробно описаны ниже.

Настоящее изобретение также относится к применению таких соединений и композиций для лечения и/или профилактики разнообразных заболеваний, нарушений и состояний, опосредованных, полностью или частично, аргиназой. Такие заболевания, нарушения и состояния подробно описаны в других разделах настоящего изобретения. Если не указано иное, когда здесь описано использование соединений по настоящему изобретению, следует понимать, что такие соединения могут быть в форме композиции (например, фармацевтической композиции).

Как обсуждается ниже, хотя предполагается, что соединения по настоящему изобретению проявляют свою активность путем ингибирования аргиназы, точное понимание основного механизма действия соединений не требуется для практического применения изобретения.

Аргиназа представляет собой фермент, существующий у млекопитающих в двух изоформах: ARG-1 обнаруживается в цитозоле и преимущественно экспрессируется в печени, тогда как ARG-2 обнаруживается в митохондриях и экспрессируется в почках, тонкой кишке, головном мозге, моноцитах и макрофагах. Аргиназа катализирует превращение аминокислоты L-аргинина в орнитин и мочевину, которая является важным предшественником последующих метаболических путей, обеспечивая регенерацию тканей, пролиферацию клеток и противовоспалительные реакции. L-аргинин также может метаболизироваться синтазой оксида азота (NOS), что приводит к образованию оксида азота, высоко реактивного соединения, важного в цитотоксическом механизме макрофагов. Считается, что ARG-1 предпочтительно экспрессируется в миелоидных супрессорных клетках (MDSC), инфильтрирующих опухоли, что приводит к истощению аргинина из микроокружения опухоли. Это истощение дополнительно приводит к потере экспрессии дзета-цепи TCR, основного элемента передачи сигнала TCR, вызывая нарушение пролиферации и снижение продукции цитокинов. По существу, определенные варианты осуществления настоящего изобретения относятся к соединениям и способам лечения рака путем увеличения уровней аргинина в микроокружении опухоли, что позволяет активировать цитотоксические T-клетки организма. [Timosenko, Modulation of cancer-specific immune responses by amino acid degrading enzymes. *Immunotherapy* (2017) 9(1), 83-97].

В одном конкретном аспекте настоящее изобретение обеспечивает соединения формулы (I):



или их фармацевтически приемлемую соль, где

X представляет собой CH_2 ;

R^1 является элементом, выбранным из группы, состоящей из H, $\text{X}^a\text{-NH}_2$, $-\text{C}(\text{O})\text{-X}^a\text{-NH}_2$ и R^c ,

где X^a представляет собой C_{1-4} алкилен, который является незамещенным; и

R^c представляет собой четырех-шестичленное насыщенное гетероциклическое кольцо, имеющее вершину кольца, которая означает O; или представляет собой C_{1-6} алкил, который замещен одним-тремя заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксила и амина; или

R^1 является натуральной аминокислотой, выбранной из группы, состоящей из аланина и пролина; и каждый R^2 представляет собой H.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение рассматривает способы лечения или профилактики рака у субъекта (например, человека), включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного описанного в настоящем изобретении ингибитора аргиназы.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает способы лечения или профилактики рака у субъекта путем введения субъекту по меньшей мере одного из соединений, описанных в настоящем изобретении, в количестве, эффективном для замедления, остановки или регрессии опосредованной аргиназой иммуносупрессии.

В некоторых вариантах осуществления иммуносупрессия, опосредованная аргиназой, опосредована супрессорной клеткой миелоидного происхождения (MDSC).

Примеры рака, который можно лечить с использованием описанных в настоящем изобретении соединений и композиций, включают рак простаты, колоректальный рак, рак поджелудочной железы, рак шейки матки, рак желудка, рак эндометрия, опухоль головного мозга, рак печени, рак мочевого пузыря, рак яичника, рак яичка, рак головы, рак шеи, рак кожи (включая меланому и базальную карциному), опухоль мезотелиальной оболочки, гемобластозы (включая лимфому и лейкоз), рак пищевода, рак молочной железы, опухоль мышцы, опухоль соединительной ткани, рак легкого (включая мелкоклеточную карциному и немелкоклеточную карциному легкого), рак надпочечника, рак щитовидной железы, рак почки или рак кости; глиобластому, мезотелиому, почечно-клеточную карциному, рак желудка, саркома, хориокарциному, базально-клеточную карциному кожи и семиному яичка, но не ограничиваются ими.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения рак представляет собой меланому, рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак простаты, рак легкого, лейкоз, опухоль головного мозга, лимфому, саркому, рак яичника, рак головы и шеи, рак шейки матки или саркому Капоши. Раковые заболевания, которые являются кандидатами на лечение соединениями и композициями по настоящему изобретению, обсуждаются ниже.

Настоящее изобретение предусматривает способы лечения субъекта, получающего трансплантат костного мозга или трансплантат стволовых клеток периферической крови, путем введения терапевтически эффективного количества ингибитора аргиназы.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способы лечения или профилактики инфекционного заболевания (например, вирусной инфекции) у субъекта (например, человека), включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного ингибитора аргиназы (например, нового ингибитора по настоящему изобретению).

В некоторых вариантах осуществления инфекционное заболевание представляет собой вирусную инфекцию (например, хроническую вирусную инфекцию), бактериальную инфекцию, грибковую инфекцию или паразитарную инфекцию.

В некоторых вариантах осуществления вирусная инфекция представляет собой вирус иммунодефицита человека или цитомегаловирус.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение рассматривает способы лечения или профилактики иммунозависимого заболевания, расстройства или состояния у субъекта (например, человека), включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного ингибитора аргиназы, описанного в настоящем изобретении.

Примеры иммунозависимых заболеваний, нарушений и состояний описаны ниже.

Другие заболевания, расстройства и состояния, которые можно лечить или предотвращать, полностью или частично, путем модуляции активности аргиназы, являются возможными показаниями для соединений - ингибиторов аргиназы по настоящему изобретению.

Настоящее изобретение также предполагает применение описанных в настоящем изобретении ингибиторов аргиназы в комбинации с одним или несколькими дополнительными агентами. Один или несколько дополнительных агентов могут действовать посредством различных механизмов действия.

В некоторых вариантах осуществления такие агенты включают облучение (например, локализованную лучевую терапию или лучевую терапию всего тела) и/или другие способы лечения нефармакологического характера. Когда используется комбинированная терапия, соединение (соединения), описанное в настоящем изобретении, и один дополнительный агент (агенты) могут быть в форме одной композиции или нескольких композиций, и лечебные воздействия могут применяться одновременно, последовательно или по некоторой другой схеме. В качестве примера настоящее изобретение рассматривает схему ле-

чения, в которой за фазой облучения следует фаза химиотерапии. Комбинированная терапия может иметь аддитивный или синергетический эффект. Другие преимущества комбинированной терапии описаны ниже.

В конкретных вариантах осуществления настоящее изобретение предполагает применение описанных в настоящем изобретении ингибиторов аргиназы в сочетании с ингибиторами иммунных контрольных точек. Было показано, что блокада иммунной контрольной точки, приводящая к усилению антиген-специфических Т-клеточных ответов, является многообещающим подходом в терапии рака человека. Примеры иммунных контрольных точек (лигандов и рецепторов), некоторые из которых избирательно активируются в различных типах опухолевых клеток, которые являются кандидатами на блокаду, и ингибиторы иммунных контрольных точек и комбинированная терапия с ними подробно обсуждаются в другом месте в настоящем изобретении.

В других вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способы лечения рака у субъекта, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного ингибитора аргиназы и по меньшей мере одного химиотерапевтического агента, включая алкилирующие агенты (например, азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, циклофосфамид, изофамид, мелхлорэтамин, мелфалан и урамустин); азиридины, такие как тиотепа; метансульфонатные сложные эфиры, такие как бусульфан; нуклеозидные аналоги (например, гемцитабин); нитрозо-мочевины, такие как кармустин, ломустин и стрептозоцин; ингибиторы топоизомеразы I (например, иринотекан); комплексы платины, такие как цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин; биоредуктивные алкиляторы, такие как митомицин, прокарбазин, дакарбазин и альтретамины; средства на основе антрациклинов (например, доксорубин, даунорубин, эпирубинин и идарубин); агенты разрыва цепи ДНК (например, блеомицин); ингибиторы топоизомеразы II (например, амсакрин, дактиномицин, даунорубин, идарубин, митоксантрон, доксорубин, эпопозид и тенипозид); агенты, связывающие малую бороздку ДНК (например, пликамидин); антиметаболиты (например, антагонисты фолиевой кислоты, такие как метотрексат и триметотрексат; антагонисты пиримидинов, такие как фторурацил, фтордезоксифуридин, CB3717, азациитидин, цитарабин и флоксурин; антагонисты пуринов, такие как меркаптопурин, 6-тиогуанин, флударабин, пентостатин; аспарагиназу; и ингибиторы рибонуклеотид-редуктазы, такие как гидроксимочевина); агенты, взаимодействующие с тубулином (например, винкристин, эстрамустин, винбластин, доцетаксел, производные эпотилона и паклитаксел); гормональные агенты (например, эстрогены; конъюгированные эстрогены; этинилэстрадиол; диэтилстильбестерол; хлортрианизен; иденестрол; прогестины, такие как гидроксипрогестерона капроат, медроксипрогестерон и мегестрол; и андрогены, такие как тестостерон, тестостерон пропионат, флуоксиместерон и метилтестостерон); кортикостероиды надпочечников (например, преднизон, дексаметазон, метилпреднизолон и преднизолон); агенты, высвобождающие лютеинизирующий гормон, или антагонисты гонадотропин-высвобождающего гормона (например, лейпролида ацетат и гозерелина ацетат); и антигормональные агенты (например, тамоксифен, антиандрогенные агенты, такие как флутамид; и антиадреналовые агенты, такие как митотан и аминоглутетимид); но не ограничиваясь ими. Настоящее изобретение также предполагает применение ингибиторов аргиназы в комбинации с другими агентами, известными в данной области техники (например, триоксидом мышьяка) и другими химиотерапевтическими агентами, которые будут разработаны.

В некоторых вариантах осуществления, относящихся к способам лечения рака, введение терапевтически эффективного количества ингибитора аргиназы, описанного в настоящем изобретении, в комбинации по меньшей мере с одним химиотерапевтическим агентом приводит к более высокой выживаемости при раке, по сравнению с показателем выживаемости при раке, наблюдаемым при введении по отдельности.

В дополнительных вариантах осуществления, относящихся к способам лечения рака, введение терапевтически эффективного количества ингибитора аргиназы, описанного в настоящем изобретении, в комбинации по меньшей мере с одним химиотерапевтическим агентом приводит к уменьшению размера опухоли или замедлению роста опухоли в большей степени, чем уменьшение размера или роста опухоли, наблюдаемое при введении только одного агента.

В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение предусматривает способы лечения или профилактики рака у субъекта, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного описанного в настоящем изобретении ингибитора аргиназы и по меньшей мере одного ингибитора сигнальной трансдукции (STI).

В конкретном варианте осуществления по меньшей мере один STI выбран из группы, состоящей из ингибиторов киназы bcr/abl, ингибиторов рецептора эпидермального фактора роста (EGF), ингибиторов рецептора her-2/neu и ингибиторов фарнезилтрансферазы (FTI). Другие потенциальные агенты STI указаны в других местах в настоящем изобретении.

Настоящее изобретение также рассматривает способы усиления отторжения опухолевых клеток у субъекта, включающие применение ингибитора аргиназы в сочетании по меньшей мере с одним химиотерапевтическим агентом и/или лучевой терапией, при которых результирующее отторжение опухолевых клеток больше, чем достигается путем применения только ингибитора аргиназы, химиотерапевтического агента или лучевой терапии.

В дополнительных вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает способы лечения рака у субъекта, включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного ингибитора аргиназы и по меньшей мере одного иммуномодулятора, отличного от ингибитора аргиназы.

В конкретных вариантах осуществления по меньшей мере один иммуномодулятор выбран из группы, состоящей из CD4OL, B7, B7RP1, анти-CD40, анти-CD38, анти-ICOS, лиганда 4-1BB, вакцины против рака дендритных клеток, IL2, IL12, ELC/CCL19, SLC/CCL21, MCP-1, IL-4, IL-18, TNF, IL-15, MDC, IFN- α /-13, M-CSF, IL-3, GM-CSF, IL-13, анти-IL-10, ингибиторов индоламин-2,3-диоксигеназы 1 (IDO1) и антагонистов рецептора аденозина 2. Другие потенциальные иммуномодулирующие агенты изложены в другом месте в настоящем изобретении.

Настоящее изобретение рассматривает варианты осуществления, включающие способы лечения или профилактики инфекционного заболевания (например, вирусной инфекции) у субъекта (например, человека), включающие введение субъекту терапевтически эффективного количества по меньшей мере одного описанного в настоящем изобретении ингибитора аргиназы и терапевтически эффективного количества противоиного агента (агентов).

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения дополнительный терапевтический агент представляет собой цитокин, включая, например, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF) или flt3-лиганд.

Настоящее изобретение также рассматривает способы лечения или профилактики вирусной инфекции (например, хронической вирусной инфекции), включая вирус гепатита С (HCV), вирус папилломы человека (HPV), цитомегаловирус (CMV), вирус Эпштейна-Барр (EBV), вирус ветряной оспы, вирус Коксаки и вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), но не ограничиваясь ими.

Использование описанных в настоящем изобретении соединений для лечения (отдельно или в качестве компонента комбинированной терапии) инфекции обсуждается далее.

В дополнительных вариантах осуществления лечение инфекционного заболевания осуществляют путем совместного применения вакцины в сочетании с введением терапевтически эффективного количества ингибитора аргиназы по настоящему изобретению.

В некоторых вариантах осуществления вакцина представляет собой противовирусную вакцину, включая, например, вакцину против ВИЧ.

В других вариантах осуществления вакцина эффективна против туберкулеза или малярии.

В других вариантах осуществления вакцина представляет собой противоопухолевую вакцину (например, вакцину, эффективную против меланомы); противоопухолевая вакцина может содержать генетически модифицированные опухолевые клетки или генетически модифицированную клеточную линию, включая генетически модифицированные опухолевые клетки или генетически модифицированную клеточную линию, которая была трансфицирована для экспрессии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF).

В конкретных вариантах осуществления вакцина включает один или несколько иммуногенных пептидов и/или дендритных клеток.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение рассматривает способы применения описанных в настоящем изобретении соединений в комбинации с одним или несколькими противомикробными агентами.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, предназначенных для лечения инфекции путем введения ингибитора аргиназы и по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента, симптом инфекции, наблюдаемый после введения как ингибитора аргиназы, так и дополнительного терапевтического агента, улучшается по сравнению с тем же симптомом наблюдаемой инфекции после введения по отдельности.

В некоторых вариантах осуществления наблюдаемый симптом инфекции может представлять собой снижение вирусной нагрузки, увеличение количества CD4⁺ Т-клеток, снижение оппортунистических инфекций, увеличение времени выживания, искоренение хронической инфекции, или их комбинацию.

Подробное описание изобретения

Перед дальнейшим описанием настоящего изобретения следует понимать, что изобретение не ограничено конкретными вариантами осуществления, изложенными в настоящем изобретении, и также следует понимать, что терминология, используемая в настоящем изобретении, предназначена для описания только конкретных вариантов осуществления, и не предназначена для ограничения.

Если предоставляется диапазон значений, подразумевается, что каждое промежуточное значение, вплоть до десятой единицы нижнего предела, если контекст явно не диктует иное, между верхним и нижним пределом этого диапазона и любым другим указанным или промежуточным значением в указанном диапазоне входит в объем изобретения. Верхний и нижний пределы этих меньших диапазонов могут независимо включаться в меньшие диапазоны, а также охватываются настоящим изобретением с учетом любого специально исключенного ограничения в указанном диапазоне. Если указанный диапазон включает один или оба предела, диапазоны, исключаящие один или оба из этих включенных пределов, также включены в изобретение. Если не указано иное, все технические и научные термины, используе-

мые в настоящем изобретении, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в области техники, к которой принадлежит это изобретение.

Используемые в настоящем изобретении формы единственного числа включают множественное число, если контекст явно не диктует иное. Кроме того, следует отметить, что формула изобретения может быть составлена так, чтобы исключить любой необязательный элемент. Таким образом, это заявление предназначено для использования в качестве предшествующей основы для использования такой исключительной терминологии, как "по отдельности", "только" и т.п. в связи с перечислением элементов формулы изобретения или использованием "отрицательного" ограничения.

Обсуждаемые в настоящем изобретении публикации предоставляются исключительно для их раскрытия до даты подачи настоящего изобретения. Кроме того, указанные даты публикации могут отличаться от фактических дат публикации, которые могут потребовать независимого подтверждения.

Основные положения.


В настоящем изобретении, например, представлены соединения и композиции для ингибирования аргиназы, а также фармацевтические композиции, содержащие их. В настоящем изобретении также представлены, например, способы лечения или профилактики заболевания, расстройства или состояния, или их симптомов, опосредованные ингибированием аргиназы.

Определения

Если не указано иное, предполагается, что следующие термины имеют значение, изложенное ниже. Другие термины определены в другом месте описания.

Термин "алкил", сам по себе или как часть другого заместителя, означает, если не указано иное, углеводородный радикал с прямой или разветвленной цепью, имеющий указанное число атомов углерода (т.е. C₁₋₈ означает от одного до восьми атомов углерода). Алкил может включать любое количество атомов углерода, например, C₁₋₂, C₁₋₃, C₁₋₄, C₁₋₅, C₁₋₆, C₁₋₇, C₁₋₈, C₁₋₉, C₁₋₁₀, C₂₋₃, C₂₋₄, C₂₋₅, C₂₋₆, C₃₋₄, C₃₋₅, C₃₋₆, C₄₋₅, C₄₋₆ и C₅₋₆. Примеры алкильных групп включают метил, этил, н-пропил, изопропил, н-бутил, трет-бутил, изобутил, втор-бутил, н-пентил, н-гексил, н-гептил, н-октил и т.п.

Термин "алкилен" относится к линейному или разветвленному, насыщенному алифатическому радикалу, имеющему указанное число атомов углерода и связывающему по меньшей мере две другие группы, то есть двухвалентному углеводородному радикалу. Две группы, связанные с алкиленом, могут быть связаны с одним и тем же атомом или разными атомами алкиленовой группы. Например, алкилен с прямой цепью может быть двухвалентным радикалом -(CH₂)_n-, где n равно 1, 2, 3, 4, 5 или 6. Типичные алкиленовые группы включают метилен, этилен, пропилен, изопропилен, бутилен, изобутилен, втор-бутилен, пентилен и гексилен, но не ограничиваются ими. Алкиленовые группы, часто обозначаемые в настоящем изобретении как группы X¹ или X², могут быть замещенными или незамещенными. Когда группа, содержащая X¹ или X², при необходимости замещена, понятно, что необязательные замещения могут быть в алкиленовой части фрагмента.

Используемая в настоящем изобретении волнистая линия «», которая пересекает одинарную, двойную или тройную связь в любой изображенной здесь химической структуре, представляет точечное присоединение одинарной, двойной или тройной связи к остальной части молекулы. Кроме того, связь, идущая к центру кольца (например, фенильного кольца), предназначена для обозначения присоединения в любой из доступных вершин кольца. Специалист в данной области техники поймет, что несколько заместителей, показанных как присоединенные к кольцу, будут занимать вершины кольца, которые обеспечивают стабильные соединения и в остальном являются стерически совместимыми. Для двухвалентного компонента представление должно включать ориентацию (прямую или обратную). Например, группа "-C(O)NH" предназначена для включения связи в любой ориентации: -C(O)NH- или -NHС(O)-, и аналогичным образом "-O-CH₂CH₂-" означает включение как -O-CH₂CH₂-, так и -CH₂CH₂-O-.

Термины "гало" или "галоген" сами по себе или как часть другого заместителя означают, если не указано иное, атом фтора, хлора, брома или йода. Кроме того, такие термины, как "галогеналкил", включают моногалогеналкил и полигалогеналкил. Например, термин "C₁₋₄ галогеналкил" означает трифторметил, 2,2,2-трифторэтил, 4-хлорбутил, 3-бромпропил и тому подобное.

Термин "арил" означает, если не указано иное, полиненасыщенную, обычно ароматическую углеводородную группу, которая может представлять собой одно кольцо или несколько колец (до трех колец), которые конденсированы вместе или связаны ковалентно. Неограничивающие примеры арильных групп включают фенил, нафтил и бифенил.

Вышеупомянутые термины (например, "алкил" и "арил") в некоторых вариантах осуществления могут быть при необходимости замещенными. Выбранные заместители для каждого типа радикала представлены ниже.

Необязательные заместители для алкильных радикалов (включая группы, часто называемые алкиленом, алкилилом и алкинилом) могут быть различными группами, выбранными из галогена, -OR', -NR'R'', -SR', -SiR'R''R''', -OC(O)R', -C(O)R', -CO₂R', -CONR'R'', -OC(O)NR'R'', -NR'C(O)R', -NR'-C(O)NR''R''', -NR''C(O)₂R', -NH-C(NH₂)=NH, -NR'C(NH₂)=NH, -NH-C(NH₂)=NR', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -NR'S(O)₂R'', -CN (циано), -NO₂, арила, арилокси, оксо, циклоалкила и гетероциклоалкила в количестве от нуля до (2m'+1), где m' - общее количество атомов углерода в таком радикале. R', R'' и R''' каждый неза-

висимо относится к водороду, незамещенному C₁₋₈ алкилу, незамещенному арилу, арилу, замещенному 1-3 галогеновыми атомами, C₁₋₈ алкокси или C₁₋₈ тиоалкокси группам, или незамещенным арил-C₁₋₄ алкильным группам. Когда R' и R'' присоединены к одному и тому же атому азота, они могут быть объединены с атомом азота с образованием 3-, 4-, 5-, 6- или 7-членного кольца. Например, подразумевается, что -NR'R'' включает 1-пирролидинил и 4-морфолинил.

Аналогичным образом, необязательные заместители для арильных групп варьируют и обычно выбраны из -галогена, -OR', -OC(O)R', -NR'R'', -SR', -R', -CN, -NO₂, -CO₂R', -CONR'R'', -C(O)R', -OC(O)NR'R'', -NR''C(O)R', -NR''C(O)₂R', -NR''C(O)NR'R''', -NH-C(NH₂)=NH, -NR'C(NH₂)=NH, -NH-C(NH₂)=NR', -S(O)R', -S(O)₂R', -S(O)₂NR'R'', -NR'S(O)₂R'', -N₃, перфтор(C₁₋₄)алкокси и перфтор(C₁₋₄)алкила, в количестве от нуля до общего количества открытых валентностей в системе ароматических колец; и где R', R'' и R''' независимо выбраны из водорода, C₁₋₈ алкила, C₁₋₈ галогеналкила, C₃₋₆ циклоалкила, C₂₋₈ алкенила и C₂₋₈ алкинила. Другие подходящие заместители включают каждый из вышеуказанных арильных заместителей, присоединенный к атому кольца алкиленовой связью из 1-6 атомов углерода.

Два заместителя у соседних атомов арильного кольца могут быть при необходимости замещены заместителем формулы -TC(O)-(CH₂)_q-U-, где T и U независимо представляют собой -NH-, -O-, -CH₂- или одинарную связь, и q представляет собой целое число от 0 до 2. Альтернативно, два заместителя у соседних атомов арильного или гетероарильного кольца могут быть при необходимости замещены заместителем формулы -A-(CR^fR^g)_t-B-, где A и B независимо представляют собой -CH₂-, -O-, -NH-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂-, -S(O)₂NR'- или одинарную связь, r представляет собой целое число от 1 до 3, и каждый из R^f и R^g независимо представляет собой H галогена. Одна из одинарных связей сформированного таким образом нового кольца может быть при необходимости заменена двойной связью. Альтернативно, два заместителя на соседних атомах арильного или гетероарильного кольца могут при необходимости быть замещены заместителем формулы -(CH₂)_s-X-(CH₂)_t-, где s и t независимо представляют собой целые числа от 0 до 3, и X представляет собой -O-, -NR'-, -S-, -S(O)-, -S(O)₂- или -S(O)₂NR'-. Заместитель R' в -NR'- и -S(O)₂NR'- выбран из водорода или незамещенного C₁₋₆ алкила.

Используемый в настоящем изобретении термин "гетероатом" означает кислород (O), азот (N), серу (S) и кремний (Si).

Термин "фармацевтически приемлемые соли" включает соли активных соединений, которые получают с относительно нетоксичными кислотами или основаниями, в зависимости от конкретных заместителей, обнаруженных в соединениях, описанных в настоящем изобретении. Когда соединения по настоящему изобретению содержат относительно кислотные функциональные группы, соли присоединения оснований могут быть получены путем контакта нейтральной формы таких соединений с достаточным количеством необходимого основания либо в чистом виде, либо в подходящем инертном растворителе. Примеры солей, полученных из фармацевтически приемлемых неорганических оснований, включают соли алюминия, аммония, кальция, меди, трехвалентного железа, двухвалентного железа, лития, магния, трехвалентного марганца, двухвалентного марганца, калия, натрия, цинка и тому подобное. Соли, полученные из фармацевтически приемлемых органических оснований, включают соли первичных, вторичных и третичных аминов, включая замещенные амины, циклические амины, натуральные амины и тому подобное, такие как аргинин, бетаин, кофеин, холин, N,N'-дибензилэтилендиамин, диэтиламин, 2-диэтиламиноэтанол, 2-диметиламиноэтанол, этаноламин, этилендиамин, N-этилморфолин, N-этилпиперидин, глюкозамин, глюкозамин, гистидин, гидрабамин, изопропиламин, лизин, метилглюкозамин, морфолин, пиперазин, пиперидин, полиаминовые смолы, прокаин, пурины, теобромин, триэтиламин, триметиламин, трипропиламин, трометамин и тому подобное. Когда соединения из настоящего изобретения содержат относительно основные функциональные группы, кислотные соли могут быть получены путем контакта нейтральной формы таких соединений с достаточным количеством необходимой кислоты либо в чистом виде, либо в подходящем инертном растворителе. Примеры фармацевтически приемлемых кислотных солей включают соли, полученные из неорганических кислот, таких как соляная, бромистоводородная, азотная, угольная, моногидрокарбоновая, фосфорная, моногидрофосфорная, дигидрофосфорная, серная, моногидросерная, йодоводородная или фосфорная кислоты и т.п., а также соли, полученные из относительно нетоксичных органических кислот, таких как уксусная, пропионовая, изомасляная, малоновая, бензойная, янтарная, субериновая, фумаровая, миндальная, фталевая, бензолсульфоновая, п-толилсульфоновая, лимонная, винная, метансульфоновая и тому подобные. Также включены соли аминокислот, такие как аргинат и т.п., и соли органических кислот, таких как глюкокуроновая или галактуоновая кислоты и т.п. (см., например, Berge, SM, et al., "Pharmaceutical Salts", Journal of Pharmaceutical Science, 1977, 66, 1-19). Некоторые конкретные соединения по настоящему изобретению содержат как основные, так и кислотные функциональные группы, которые позволяют превращать соединения в соли присоединения либо основания, либо кислоты.

Нейтральные формы соединений могут быть регенерированы путем обеспечения контакта соли с основанием или кислотой и выделения исходного соединения обычным способом. Исходная форма соединения отличается от различных солевых форм некоторыми физическими свойствами, такими как растворимость в полярных растворителях, но в остальном соли эквивалентны исходной форме соединения

для целей настоящего изобретения. В дополнение к солевым формам настоящее изобретение обеспечивает соединения, которые находятся в форме пролекарства. Пролекарства описанных в настоящем изобретении соединений представляют собой те соединения, которые легко претерпевают химические изменения в физиологических условиях, обеспечивая соединения по настоящему изобретению. Кроме того, пролекарства можно превратить в соединения по настоящему изобретению химическими или биохимическими методами в среде *ex vivo*. Например, пролекарства могут медленно превращаться в соединения по настоящему изобретению при помещении в резервуар для трансдермального пластыря с подходящим ферментом или химическим реагентом. Пролекарства более подробно описаны в других разделах настоящего изобретения.

В дополнение к солевым формам настоящее изобретение обеспечивает соединения, которые находятся в форме пролекарства. Пролекарства описанных в настоящем изобретении соединений представляют собой те соединения, которые легко претерпевают химические изменения в физиологических условиях, обеспечивая соединения по настоящему изобретению. Кроме того, пролекарства можно превратить в соединения по настоящему изобретению химическими или биохимическими методами в среде *ex vivo*. Например, пролекарства могут медленно превращаться в соединения по настоящему изобретению при помещении в резервуар для трансдермального пластыря с подходящим ферментом или химическим реагентом.

Некоторые соединения по настоящему изобретению могут существовать в несольватированных формах, а также в сольватированных формах, включая гидратированные формы. Обычно сольватированные формы эквивалентны несольватированным формам и предназначены для включения в объем настоящего изобретения. Некоторые соединения по настоящему изобретению могут существовать во множестве кристаллических или аморфных форм. В общем, все физические формы эквивалентны для использования, предусмотренного настоящим изобретением, и предполагается, что они находятся в пределах объема настоящего изобретения.

Некоторые соединения настоящего изобретения обладают асимметричными атомами углерода (оптическими центрами) или двойными связями; предполагается, что рацематы, диастереомеры, геометрические изомеры, региоизомеры и отдельные изомеры (например, отдельные энантиомеры) входят в объем настоящего изобретения. Когда показано стереохимическое изображение, это означает, что оно относится к соединению, в котором присутствует один из изомеров, и по существу не содержит другого изомера. "По существу не содержит" другого изомера означает соотношение двух изомеров по меньшей мере 80/20, более предпочтительно 90/10 или 95/5, или более. В некоторых вариантах осуществления один из изомеров будет присутствовать в количестве по меньшей мере 99%.

Соединения по настоящему изобретению могут также содержать ненатуральные пропорции атомных изотопов у одного или нескольких атомов, которые составляют такие соединения. Ненатуральные пропорции изотопа могут быть определены как варьирующие от количества, встречающегося в природе, до количества, состоящего на 100% из рассматриваемого атома. Например, соединения могут включать радиоактивные изотопы, такие как, например, тритий (^3H), йод-125 (^{125}I) или углерод-14 (^{14}C), или нерадиоактивные изотопы, такие как дейтерий (^2H) или углерод-13 (^{13}C). Такие изотопные вариации могут предоставить дополнительные полезные свойства по сравнению с описанными в другом месте в этом изобретении. Например, изотопные варианты соединений по изобретению могут найти дополнительное полезное применение, включая применение в качестве диагностических реагентов и/или реагентов для визуализации или в качестве цитотоксических/радиотоксичных терапевтических средств, но не ограничиваясь этим. Кроме того, изотопные варианты соединений по изобретению могут иметь измененные фармакокинетические и фармакодинамические характеристики, которые могут способствовать повышению безопасности, переносимости или эффективности во время лечения. Предполагается, что все изотопные варианты соединений из настоящего изобретения, радиоактивные или не радиоактивные, входят в объем настоящего изобретения.

Термины "пациент" или "субъект" используются взаимозаменяемо для обозначения человека или животного, не являющегося человеком (например, млекопитающего).

Термины "введение", "вводить" и подобные, в том смысле, в каком они используются, например, по отношению к субъекту, клетке, ткани, органу или биологической жидкости, относятся к контакту, например, с ингибитором аргиназы, с фармацевтической композицией, содержащей его, или с диагностическим агентом для субъекта, клетки, ткани, органа или биологической жидкости. В контексте клетки введение включает контакт (например, *in vitro* или *ex vivo*) реагента с клеткой, а также контакт реагента с жидкостью, где жидкость находится в контакте с клеткой.

Термины "лечить", "лечение" и тому подобные относятся к курсу действий (например, к применению ингибитора аргиназы или фармацевтической композиции, содержащей его), инициированному после того, как заболевание, расстройство или состояние или его симптом был диагностирован, наблюдался и тому подобное, чтобы устранить, уменьшить, подавить, смягчить или облегчить, временно или постоянно, по меньшей мере одну из основных причин заболевания, расстройства или состояния, поражающего субъекта, или по меньшей мере один из симптомов, связанных с заболеванием, нарушением, состоянием, поражающим субъекта. Таким образом, лечение включает ингибирование (например, оста-

новку развития или дальнейшего развития заболевания, расстройства или состояния, или связанных с ними клинических симптомов) активного заболевания.

Термин "нуждающийся в лечении" в контексте настоящего описания относится к заключению, сделанному врачом или другим лицом, осуществляющим уход, о том, что субъект требует лечения или получит от него пользу. Это суждение делается на основе множества факторов, которые находятся в компетенции врача или лица, осуществляющего уход.

Термины "предотвращать", "предотвращающий", "предотвращение" и т.п. относятся к курсу действий (например, к применению ингибитора аргиназы или фармацевтической композиции, содержащей его), инициированного способом (например, до начала заболевания, расстройства, состояния или его симптома), чтобы предотвратить, подавить, ингибировать или уменьшить, временно или постоянно, риск развития у субъекта заболевания, расстройства, состояния или тому подобного (как определено, например, отсутствием клинических симптомов) или замедлить их начало, как правило, в контексте субъекта, предрасположенного к конкретному заболеванию, нарушению или состоянию. В некоторых случаях эти термины также относятся к замедлению прогрессирования заболевания, расстройства или состояния, или к ингибированию их прогрессирования до вредного или иного нежелательного состояния.

Термин "нуждающийся в профилактике" в контексте настоящего описания относится к заключению врача или другого лица, осуществляющего уход, о том, что субъекту требуется профилактический уход или он получит пользу от него. Это суждение делается на основе множества факторов, которые находятся в компетенции врача или лица, осуществляющего уход.

Фраза "терапевтически эффективное количество" относится к введению агента у субъекта либо по отдельности, либо как части фармацевтической композиции, и либо в разовой дозе, либо как части серии доз, в количестве, способном оказывать любое обнаруживаемое положительное действие на любой симптом, аспект или характеристику заболевания, расстройства или состояния при применении у субъекта. Терапевтически эффективное количество может быть установлено путем измерения соответствующих физиологических эффектов, и оно может быть скорректировано в связи с режимом дозирования, диагностическим анализом состояния субъекта и т.д. Например, измерение сывороточного уровня ингибитора аргиназы (или, например, его метаболита) в конкретное время после введения может указывать на то, было ли использовано терапевтически эффективное количество.

Фраза "в количестве, достаточном для осуществления изменения" означает, что существует обнаруживаемая разница между уровнем показателя, измеренным до (например, базовый уровень) и после применения конкретной терапии. Показатели включают любой объективный параметр (например, концентрацию в сыворотке) или субъективный параметр (например, хорошее самочувствие субъекта).

Термин "малые молекулы" относится к химическим соединениям, имеющим молекулярную массу менее примерно 10, менее примерно 2 или менее примерно 1 кДа. Малые молекулы включают неорганические молекулы, органические молекулы, органические молекулы, содержащие неорганический компонент, молекулы, содержащие радиоактивный атом, и синтетические молекулы, но не ограничиваются ими. С терапевтической точки зрения малая молекула может лучше проникать в клетку, менее восприимчива к деградации и с меньшей вероятностью вызывает иммунный ответ, чем большие молекулы.

Термин "лиганд" относится, например, к пептиду, полипептиду, мембрано-ассоциированной или мембрано-связанной молекуле, или их комплексу, которые могут действовать как агонист или антагонист рецептора. Лиганд включает природные и синтетические лиганды, например, цитокины, варианты цитокинов, аналоги, мутеины и связывающие композиции, полученные из антител, а также малые молекулы. Термин также включает агент, который не является ни агонистом, ни антагонистом, но который может связываться с рецептором без значительного влияния на его биологические свойства, например, передачу сигналов или адгезию. Кроме того, термин включает мембрано-связанный лиганд, который был заменен, например, химическими или рекомбинантными методами на растворимую версию мембрано-связанного лиганда. Лиганд или рецептор могут быть полностью внутриклеточными, то есть они могут находиться в цитозоле, ядре или каком-либо другом внутриклеточном компартменте. Комплекс лиганда и рецептора называется "комплексом лиганд-рецептор".

Термины "ингибиторы" и "антагонисты", или "активаторы" и "агонисты" относятся к ингибирующим или активирующим молекулам, соответственно, например, для активации, например, лиганда, рецептора, кофактора, гена, клетки, ткани или органа. Ингибиторы являются молекулами, которые уменьшают, блокируют, предотвращают, задерживают активацию, инактивируют, снижают чувствительность или подавляют, например, ген, белок, лиганд, рецептор или клетку. Активаторы представляют собой молекулы, которые увеличивают, активируют, облегчают, усиливают активацию, сенсibiliзируют или повышают регуляцию, например, гена, белка, лиганда, рецептора или клетки. Ингибитор также можно определить как молекулу, которая снижает, блокирует или инактивирует конститутивную активность. "Агонист" является молекулой, которая взаимодействует с мишенью, вызывая или способствуя увеличению активации мишени. "Антагонист" является молекулой, которая противодействует действию (действиям) агониста. Антагонист предотвращает, снижает, ингибирует или нейтрализует активность агониста, и антагонист также может предотвращать, ингибировать или снижать конститутивную активность мишени, например, целевого рецептора, даже если нет идентифицированного агониста.

Термины "модулировать", "модуляция" и т.п. относятся к способности молекулы (например, активатора или ингибитора) увеличивать или уменьшать функцию или активность аргиназы, прямо или косвенно. Модулятор может действовать сам по себе, или он может использовать кофактор, например, белок, ион металла или малую молекулу. Примеры модуляторов включают низкомолекулярные соединения и другие биоорганические молекулы. Многочисленные библиотеки низкомолекулярных соединений (например, комбинаторные библиотеки) коммерчески доступны и могут служить отправной точкой для идентификации модулятора. Специалист в данной области техники может разработать один или несколько анализов (например, биохимических или клеточных анализов), в которых такие библиотеки соединений могут быть подвергнуты скринингу, чтобы идентифицировать одно или несколько соединений, обладающих необходимыми свойствами; после этого квалифицированный медицинский химик сможет оптимизировать такое одно или несколько соединений, например, синтезируя и оценивая их аналоги и производные. Исследования синтетического и/или молекулярного моделирования также могут быть использованы для идентификации активатора.

"Активность" молекулы может описывать или относиться к связыванию молекулы с лигандом или рецептором; к каталитической активности; к способности стимулировать экспрессию генов или передачу сигналов, дифференцировку или созревание клеток; к антигенной активности; к модуляции активности других молекул; и тому подобному. Термин "пролиферативная активность" охватывает активность, которая способствует, является необходимой или специфически связана, например, с нормальным делением клеток, а также с раком, опухолями, дисплазией, трансформацией клеток, метастазированием и ангиогенезом.

Используемые в настоящем изобретении термины "сопоставимый", "сопоставимая активность", "активность, сопоставимая с", "сопоставимый эффект", "эффект, сопоставимый с" и т.п. являются относительными терминами, которые можно рассматривать количественно и/или качественно. Значение терминов часто зависит от контекста, в котором они используются. Например, два агента, которые активируют рецептор, могут рассматриваться как имеющие сопоставимый эффект с качественной точки зрения, но два агента могут рассматриваться как не имеющие сопоставимого эффекта с количественной точки зрения, если один агент способен достичь только 20% активности другого агента, как определено в принятом в данной области техники анализе (например, в анализе реакции на дозу) или в принятой в данной области техники модели на животных. При сравнении одного результата с другим результатом (например, одного результата с эталонным стандартом) "сопоставимый" часто (хотя и не всегда) означает, что один результат отклоняется от эталонного стандарта менее чем на 35, менее чем на 30, менее чем на 25, менее чем на 20, менее чем на 15, менее чем на 10, менее чем на 7, менее чем на 5, менее чем на 4, менее чем на 3, менее чем на 2, или менее чем на 1%. В конкретных вариантах осуществления один результат сопоставим с эталонным стандартом, если он отклоняется менее чем на 15, менее чем на 10 или менее чем на 5% от эталонного стандарта. В качестве примера, но не для ограничения, активность или эффект могут относиться к эффективности, стабильности, растворимости или иммуногенности.

"По существу чистый" означает, что компонент составляет более примерно 50% от общего содержания композиции и обычно более примерно 60% от общего содержания полипептида. Более типично, "по существу чистый" относится к композициям, в которых по меньшей мере 75, по меньшей мере 85, по меньшей мере 90% или более от всей композиции является интересующим компонентом.

В некоторых случаях полипептид будет составлять более примерно 90 или более примерно 95% от общего содержания композиции.

Термины "специфически связывает" или "избирательно связывает", когда они относятся к лиганду/рецептору, антителу/антигену или другой паре связывания, обозначают реакцию связывания, которая является определяющей для присутствия белка в гетерогенной популяции белков и других биопрепаратов. Таким образом, в определенных условиях указанный лиганд связывается с конкретным рецептором и не связывается в значительном количестве с другими белками, присутствующими в образце. Антитело или связывающая композиция, полученная из антигенсвязывающего сайта антитела, из рассматриваемого способа связывается со своим антигеном или его вариантом, или мутеином с аффинностью, которая по меньшей мере в два раза выше, по меньшей мере в десять раз выше, по меньшей мере в 20 раз выше или по меньшей мере в 100 раз выше, чем аффинность к любому другому антителу или связывающей композиции, полученной из него. В конкретном варианте осуществления антитело будет иметь аффинность, превышающую примерно 10^9 л/моль, как определено, например, анализом Скэтчарда (Munsen, et al., 1980 *Analyt. Biochem.* 107: 220-239).

Термин "ответ", например, клетки, ткани, органа или организма, охватывает изменение биохимического или физиологического поведения, например, концентрации, плотности, адгезии или миграции в пределах биологического компартмента, скорости экспрессии гена или состояния дифференцировки, когда изменение коррелирует с активацией, стимуляцией или лечением, или с внутренними механизмами, такими как генетическое программирование. В определенных контекстах термины "активация", "стимуляция" и т.п. относятся к активации клеток, регулируемой внутренними механизмами, а также внешними факторами или факторами окружающей среды; тогда как термины "ингибирование", "подавление" и т.п. относятся к противоположным эффектам.

Термины "полипептид", "пептид" и "белок", используемые в настоящем изобретении взаимозаменяемо, относятся к полимерной форме аминокислот любой длины, которая может включать генетически кодируемые и не генетически кодированные аминокислоты, химически или биохимически модифицированные или дериватизированные аминокислоты и полипептиды, имеющие модифицированные полипептидные цепи. Термины включают химерные белки, включая химерные белки с гетерологичной аминокислотной последовательностью, химерные белки с гетерологичными и гомологичными лидерными последовательностями, с N-концевыми остатками метионина или без них; иммунологически меченые белки; и тому подобное, но не ограничиваясь ими.

Используемые в настоящем изобретении термины "варианты" и "гомологи" используются взаимозаменяемо для обозначения аминокислотных или ДНК-последовательностей, которые аналогичны эталонным аминокислотным или нуклеиновым последовательностям, соответственно. Термин охватывает натуральные варианты и ненатуральные варианты. Натуральные варианты включают гомологи (полипептиды и нуклеиновые кислоты, которые различаются по аминокислотной или нуклеотидной последовательности, соответственно, от одного вида к другому) и аллельные варианты (полипептиды и нуклеиновые кислоты, которые отличаются по аминокислотной или нуклеотидной последовательности, соответственно, между индивидуумами в пределах одного вида). Таким образом, варианты и гомологи включают натуральные последовательности ДНК и кодируемые ими белки и их изоформы, а также варианты сплайсинга белка или гена. Термины также охватывают последовательности нуклеиновых кислот, которые отличаются по одному или нескольким основаниям от натуральной последовательности ДНК, но все же транслируются в аминокислотную последовательность, которая соответствует натуральному белку из-за вырожденности генетического кода. Ненатуральные варианты и гомологи включают полипептиды и нуклеиновые кислоты, которые содержат изменение аминокислотной или нуклеотидной последовательности, соответственно, где изменение последовательности вводится искусственно (например, мутеины); например, изменение вызвано в лаборатории вмешательством человека ("рукой человека"). Следовательно, ненатуральные варианты и гомологи могут также относиться к тем, которые отличаются от натуральных последовательностей одной или несколькими консервативными заменами и/или метками, и/или конъюгатами.

Используемый в настоящем изобретении термин "мутеины" в широком смысле относится к мутированным рекомбинантным белкам. Эти белки обычно несут одну или несколько аминокислотных замен и часто происходят из клонированных генов, подвергшихся сайт-специфическому или случайному мутагенезу, или из полностью синтетических генов.

Термины "ДНК", "нуклеиновая кислота", "молекула нуклеиновой кислоты", "полинуклеотид" и т.п. используются в настоящем изобретении взаимозаменяемо для обозначения полимерной формы нуклеотидов любой длины, дезоксирибонуклеотидов или рибонуклеотидов или их аналогов. Неограничивающие примеры полинуклеотидов включают линейные и кольцевые нуклеиновые кислоты, матричную РНК (мРНК), комплементарную ДНК (кДНК), рекомбинантные полинуклеотиды, векторы, зонды, праймеры и т.п.

Аргиназа и ее ингибирование.

Как изложено выше, точное понимание лежащего в основе механизма действия соединений, посредством которого соединения настоящего изобретения влияют на их активность, не требуется для практического применения изобретения, соединений (или их подгруппы), которые, как полагают, ингибируют аргиназу. Хотя соединения по настоящему изобретению обычно называются в настоящем изобретении ингибиторами аргиназы, следует понимать, что термин "ингибиторы аргиназы" охватывает соединения, которые действуют индивидуально посредством ингибирования аргиназы, но также действуют посредством дополнительных механизмов.

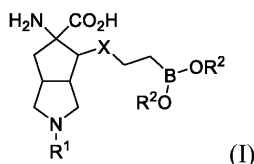
Идентификация ингибиторов аргиназы, обладающих необходимыми характеристиками.

Настоящее изобретение частично направлено на идентификацию ингибиторов аргиназы по меньшей мере с одним свойством или характеристикой, имеющей терапевтическое значение. Кандидаты в ингибиторы могут быть идентифицированы с использованием, например, общепринятого анализа или модели, примеры которых описаны в настоящем изобретении.

После идентификации кандидаты в ингибиторы могут быть дополнительно оценены с использованием способов, которые предоставляют данные, касающиеся характеристик ингибиторов (например, фармакокинетических параметров, средств определения растворимости или стабильности). Сравнение потенциальных ингибиторов с эталонным стандартом (который может быть "лучшим в своем классе" из существующих ингибиторов) указывает на потенциальную эффективность таких кандидатов.

Соединения по изобретению.

В настоящем изобретении обеспечены соединения, имеющие формулу (I)



или их фармацевтически приемлемая соль, где

X представляет собой CH₂;

R¹ является элементом, выбранным из группы, состоящей из H, X^a-NH₂, -C(O)-X^a-NH₂ и -R^c, где

X^a представляет собой C₁₋₄ алкилен, который является незамещенным; и

R^c представляет собой четырех-шестичленное насыщенное гетероциклическое кольцо, имеющее вершину кольца, которое означает O; или представляет собой C₁₋₆ алкил, который замещен одним-тремя заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксила и amino; или

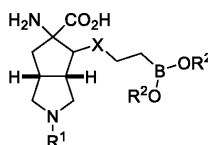
R¹ является натуральной аминокислотой, выбранной из группы, состоящей из аланина и пролина; и каждый R² представляет собой H.

В некоторых вариантах осуществления формулы (I)

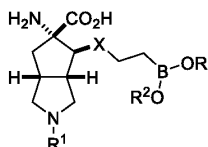
R¹ является элементом, выбранным из группы, состоящей из H, -X^a-NH₂ и -C(O)-X^a-NH₂; где X^a представляет собой C₁₋₄ алкилен, который является незамещенным; или

R¹ является натуральной аминокислотой, выбранной из группы, состоящей из аланина и пролина.

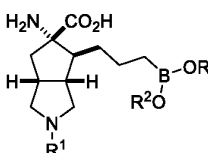
В одной избранной группе вариантов осуществления предложены соединения формулы (I), имеющие формулу:



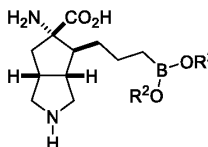
В другой избранной группе вариантов осуществления предложены соединения формулы (I), имеющие формулу:



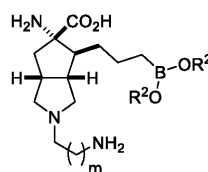
В другой избранной группе вариантов осуществления представлены соединения формулы (I), имеющие формулу:



В другой избранной группе вариантов осуществления предложены соединения формулы (I), имеющие формулу:

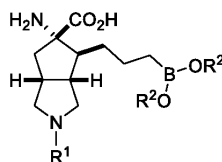


В еще других избранных вариантах осуществления предложено соединение формулы (I), имеющее формулу:



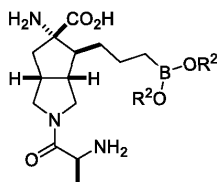
где m равно 1, 2 или 3.

В некоторых избранных вариантах осуществления предложены соединения формулы (I), имеющие формулу:

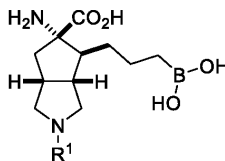


где R¹ представляет собой натуральную аминокислоту.

В еще одних избранных вариантах осуществления предложены соединения формулы (I), имеющие формулу:



В некоторых избранных вариантах осуществления соединение формулы (I) имеет формулу:



В некоторых избранных вариантах осуществления обеспечено любое соединение из таблицы.

В некоторых выбранных вариантах осуществления представлены дейтерированные формы соединений формулы (I). Дейтерий может быть независимо замещен водородом в любом положении, где может присутствовать водород.

Способы синтеза.

В целом соединения, представленные в настоящем изобретении, могут быть получены обычными способами, как описано в примерах ниже.

Пролекарства и другие средства доставки лекарств и/или продления периода полужизни.

В некоторых аспектах настоящего изобретения описанные здесь соединения применяют в форме пролекарства.

Для увеличения терапевтической активности молекулы лекарств могут быть сконструированы с использованием носителей для доставки. Такие носители используются либо нековалентным образом, с физико-химическим составом лекарственной части в смеси растворитель-носитель, либо путем постоянного ковалентного присоединения реагента-носителя к одной из функциональных групп лекарственной части (см. в целом WO 20150202317).

Предпочтительны несколько нековалентных подходов. В качестве примера, но не с целью ограничения, в некоторых вариантах осуществления используются депо-составы, включающие нековалентное инкапсулирование лекарственного средства в полимерные носители. В таких составах молекулу лекарственного средства объединяют с материалом носителя и обрабатывают таким образом, что молекула лекарственного средства распределялась внутри объемного носителя. Примеры включают агрегаты микро-частиц полимер-лекарство (например, микросферы Degradex® (Phosphorex, Inc.)), которые вводят в виде суспензии для инъекций; агрегаты молекулы полимер-лекарство, приготовленные в виде гелей (например, Lupron Depot® (AbbVie Inc.)), которые вводят в виде однократной болюсной инъекции; и липосомальные композиции (например, DepoCyt® (Pacira Pharmaceuticals)), где носитель может быть полимерным или неполимерным веществом, способным сольбилизовать лекарственное средство. В этих составах высвобождение молекулы лекарственного средства может происходить, когда носитель набухает или физически разрушается. В других случаях химическое разложение делает возможным диффузию лекарственного средства в биологическую среду; такие процессы химического разложения могут быть автогидролитическими или ферментативными. Помимо других ограничений, нековалентное инкапсулирование лекарственного средства требует предотвращения неконтролируемого высвобождения лекарственного средства, а зависимость механизма высвобождения лекарства от биodeградации может вызвать вариабельность у разных пациентов.

В конкретных вариантах осуществления молекулы лекарственного средства, включая как небольшие молекулы, так и большие молекулы, конъюгированы с носителем посредством постоянных ковалентных связей. Некоторые низкомолекулярные терапевтические средства, которые проявляют низкую растворимость в водных жидкостях, могут быть сольбилизованы путем конъюгации с гидрофильными полимерами, примеры которых описаны в других местах в настоящем изобретении. Что касается крупномолекулярных белков, продление периода полужизни может быть достигнуто, например, путем постоянной ковалентной модификации пальмитоильным фрагментом и постоянной ковалентной моди-

фикации другим белком, который сам имеет увеличенный период полужизни (например, Альбуферон®). Как правило, молекулы лекарства проявляют пониженную биологическую активность, когда носитель ковалентно конъюгирован с лекарством.

В некоторых случаях ограничения, связанные либо с молекулами лекарственного средства, содержащими нековалентные полимерные смеси, либо с постоянным ковалентным присоединением, могут быть успешно устранены путем использования пролекарственного подхода для химической конъюгации лекарственного средства с полимерным носителем. В этом контексте терапевтические агенты, которые неактивны или менее активны, чем сама составляющая лекарственного средства, предсказуемо превращаются в активные молекулярные образования. Сниженная биологическая активность пролекарства по сравнению с высвобожденным лекарственным средством является преимуществом, если необходимо медленное или контролируемое высвобождение лекарственного средства. В таких случаях высвобождение лекарственного средства происходит с течением времени, что снижает необходимость повторного и частого введения лекарственного средства. Пролекарственный подход также может быть выгодным, когда лекарственный фрагмент сам по себе не абсорбируется или имеет менее чем оптимальную абсорбцию в желудочно-кишечном тракте; в этих случаях пролекарство облегчает абсорбцию лекарственной части, а затем отделяется через некоторое время (например, в результате метаболизма первого прохождения). Биологически активная молекула лекарственного средства обычно связана с полимерным несущим фрагментом временной связью, образованной между несущим фрагментом и гидроксильной, амино- или карбоксильной группой молекулы лекарственного средства.

Описанные выше подходы связаны с несколькими ограничениями. Активация пролекарства может происходить путем ферментативного или неферментативного расщепления временной связи между носителем и молекулой лекарственного средства или их последовательной комбинации (например, ферментативная стадия с последующей неферментативной модификацией). В среде *in vitro*, свободной от ферментов (например, в водном буферном растворе), временная связь, такая как сложный эфир или амид, может подвергаться гидролизу, но соответствующая скорость гидролиза может быть такой, что она выходит за пределы терапевтически полезного диапазона. Напротив, в среде *in vivo* обычно присутствуют эстеразы или амидазы, и эстеразы и амидазы могут вызывать значительное каталитическое ускорение кинетики гидролиза от двукратного до нескольких порядков амплитуды (см., например, Greenwald et al. (1999) *J Med Chem* 42 (18): 3857-67).

Как описано в настоящем изобретении, пролекарства можно классифицировать как (i) биопрекурсоры и (ii) связанные с носителем пролекарства. Биопрекурсоры не содержат группы носителей и активируются путем метаболического создания функциональной группы. Напротив, в пролекарствах, связанных с носителем, активное вещество конъюгировано с несущим фрагментом посредством временной связи в функциональной группе биоактивного объекта. Предпочтительными функциональными группами являются гидроксильные группы или аминокислоты. И химия присоединения, и условия гидролиза зависят от типа используемой функциональной группы. Носитель может быть биологически инертным (например, ПЭГ) или может обладать свойствами направленного действия (например, антитело). Расщепление несущего фрагмента пролекарства, связанного с носителем, приводит к получению представляющего интерес биоактивного объекта, и природа функциональной группы со снятой защитой биоактивного объекта часто способствует его биоактивности.

Патентная и научная литература описывает многие макромолекулярные пролекарства, в которых временная связь представляет собой лабильную сложноэфирную связь. В этих случаях функциональная группа биоактивного объекта представляет собой либо гидроксильную группу, либо карбоновую кислоту (см., например, Cheng et al. (2003) *Bioconjugate Chem* 14: 1007-17). Кроме того, для биомолекул и некоторых низкомолекулярных лекарств часто выгодно связывать носитель с аминокислотной группой (аминокислотами) биоактивного объекта (например, аминокислотами N-конца или лизина белков). Во время приготовления пролекарства аминокислоты могут подвергаться более хемоселективной адресации из-за их большей нуклеофильности по сравнению с гидроксильными или фенольными группами. Это особенно актуально для белков и пептидов, содержащих большое количество различных реактивных функциональных групп, где реакции неселективной конъюгации приводят к нежелательным смесям продуктов, требующим обширной характеристики или очистки, что снижает выход реакции и терапевтическую эффективность активного фрагмента.

В целом, амидные связи более устойчивы к гидролизу, чем сложноэфирные связи, и скорость расщепления амидной связи может быть слишком низкой для терапевтического применения в пролекарстве, связанном с носителем. В результате может быть выгодным добавление структурных химических компонентов для контроля над расщепляемостью амидной связи пролекарства. Эти дополнительные химические компоненты, контролируемые расщепление, которые не предоставляются ни носителем, ни лекарством, обычно называют "линкерами". Линкеры пролекарств могут иметь большое влияние на скорость гидролиза временной связи, и изменение химической природы линкеров часто приводит к определенным свойствам. Активация пролекарства аминокислотных биологически активных групп специфическими ферментами для целенаправленного высвобождения требует, чтобы структура линкера отображала структурный мотив, распознаваемый в качестве субстрата соответствующим эндогенным фермен-

том. В этих случаях разрыв временной связи происходит в одностадийном процессе, который катализируется ферментом. Например, ферментативное высвобождение цитарабина осуществляется протеазой плазмином, концентрация которой относительно высока в различных типах опухолевых масс.

Вариабельность у разных пациентов является основным недостатком преобладающего ферментативного расщепления. Уровни ферментов могут значительно различаться у разных субъектов, что приводит к биологической вариации активации пролекарства ферментативным расщеплением. Уровни ферментов также могут варьировать в зависимости от места введения (например, при подкожной инъекции определенные области тела дают более предсказуемые терапевтические эффекты, чем другие). Кроме того, трудно установить корреляцию *in vivo* - *in vitro* фармакокинетических свойств фермент-зависимых пролекарств, связанных с носителем.

Другие пролекарства-носители, использующие временные связи с аминогруппами в составе лекарственного средства, основаны на каскадном механизме. Каскадное расщепление обеспечивается линкерными соединениями, которые состоят из структурной комбинации маскирующей группы и активирующей группы. Маскирующая группа присоединяется к активирующей группе посредством первой временной связи, такой как сложный эфир или карбамат. Активирующая группа присоединяется к аминогруппе молекулы лекарства через вторую временную связь (например, карбамат). Стабильность или подверженность гидролизу второй временной связи зависит от присутствия или отсутствия маскирующей группы. В присутствии маскирующей группы вторая временная связь очень стабильна и вряд ли высвобождает молекулу лекарственного средства с терапевтически полезной кинетикой, тогда как в отсутствие маскирующей группы эта связь становится очень лабильной, что приводит к быстрому расщеплению и высвобождению лекарственной части.

Расщепление первой временной связи является этапом ограничения скорости в каскадном механизме. Первая стадия может вызвать молекулярную перегруппировку активирующей группы (например, 1,6-элиминирование, как описано в Greenwald et al. (1999) *J Med Chem* 42: 3657-67), а перегруппировка делает вторую временную связь более лабильной, так что индуцируется её расщепление. В идеале скорость расщепления первой временной связи идентична необходимой скорости высвобождения молекулы лекарства в данном терапевтическом сценарии. Кроме того, необходимо, чтобы разрыв второй временной связи происходил практически мгновенно после того, как ее лабильность была вызвана разрывом первой временной связи.

Другой вариант осуществления включает полимерные аминоксодержащие пролекарства на основе лактонизации триметилового замка (см., например, Greenwald et al. (2000) *J Med Chem* 43 (3): 457-87). В этой системе пролекарства замещенная *o*-гидроксифенил-диметилпропионовая кислота связана с ПЭГ сложноэфирной, карбонатной или карбаматной группой в качестве первой временной связи, и с аминогруппой молекулы лекарственного средства посредством амидной связи в качестве второй временной связи. Определяющим скорость этапом высвобождения лекарственного средства является ферментативное расщепление первой связи, за которым следует быстрое расщепление амида путем лактонизации с высвобождением ароматического побочного продукта лактона. Основным недостатком систем пролекарств, описанных Greenwald et al., представляет собой высвобождение высокореактивных и потенциально токсичных ароматических низкомолекулярных побочных продуктов, таких как хинонметиды или ароматические лактоны, после расщепления временной связи. Потенциально токсичные вещества высвобождаются в стехиометрии 1:1 с лекарством и могут принимать высокие концентрации *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления каскадных пролекарств, содержащих ароматические активирующие группы на основе 1,6-элиминирования, маскирующая группа структурно отделена от носителя. Это может быть достигнуто путем использования стабильной связи между полимерным носителем и активирующей группой, где стабильная связь не участвует в механизме каскадного расщепления. Если носитель не служит маскирующей группой, а активирующая группа связана с носителем посредством стабильной связи, высвобождение потенциально токсичных побочных продуктов (таких как активирующая группа) предотвращается. Стабильное связывание активирующей группы и полимера также подавляет высвобождение промежуточных соединений лекарственного средство-линкер с неопределенной фармакологией.

Первый пример подхода, описанного в предыдущем абзаце, включает полимерную пролекарственную систему на основе активирующей группы миндальной кислоты (см., например, Shabat et al. (2004) *Chem Eur J.* 10: 2626-34). В этом подходе маскирующая группа связана с активирующей группой карбаматной связью. Активирующая группа постоянно конъюгирована с полиакриламидным полимером через амидную связь. После ферментативной активации маскирующей группы каталитическим антителом маскирующая группа отщепляется циклизацией и высвобождается лекарство; активирующая группа все еще связана с полиакриламидным полимером после высвобождения лекарства. Подобная система пролекарств основана на активирующей группе миндальной кислоты и ферментативно расщепляемой сложноэфирной маскирующей группе (см., например, Lee et al. (2004) *Angew Chem* 116: 1707-10).

Когда используются вышеупомянутые линкеры, на стадии 1,6-элиминирования по-прежнему образуется высокореактивный ароматический промежуточный продукт. Даже если ароматическая часть остается постоянно прикрепленной к полимерному носителю, могут возникнуть побочные реакции с потен-

циально токсичными побочными продуктами или иммуногенными эффектами. Таким образом, предпочтительно создавать линкерные технологии для образования полимерных пролекарств из аминокислотных активных агентов с использованием алифатических линкеров пролекарств, которые не зависят от фермента и не образуют реакционноспособные ароматические промежуточные соединения во время расщепления. В одном из таких примеров используют PEG5000-малеиновый ангидрид для обратимой модификации аминогрупп активатора плазминогена тканевого типа и урокиназы (см., например, (1987) Garman et al., FEBS Lett 223 (2): 361-65). Регенерация функционального фермента из конъюгата PEG-uPA при инкубации в буфере с pH 7,4 путем расщепления связи малеаминовой кислоты следует кинетике первого порядка с периодом полураспада примерно 6 ч. Недостатком связи малеаминовой кислоты является отсутствие стабильности конъюгата при более низких значениях pH.

Дополнительный подход включает каскадную систему пролекарств ПЭГ на основе линкера N,N-бис-(2-гидроксиэтил)глицинамида (бицина) (см., например, (2004) J Med Chem 47: 726-34). В этой системе две молекулы-носителя ПЭГ связаны временными связями с молекулой бицина, соединенной с аминогруппой молекулы лекарства. Первые этапы активации пролекарства включают ферментативное расщепление первых временных связей, соединяющих обе молекулы-носители ПЭГ с гидроксигруппами активирующей группы бицина. Различные связи между ПЭГ и бицином приводят к разной кинетике активации пролекарства. Второй этап активации пролекарства включает расщепление второй временной связи, соединяющей активирующую группу бицина с аминогруппой молекулы лекарства. Недостатком этой системы является медленная скорость гидролиза этой второй временной бицин-амидной связи, что приводит к высвобождению модифицированного бицином промежуточного пролекарства, которое может проявлять другие фармакокинетические, иммуногенные, токсические и фармакодинамические свойства по сравнению с молекулой нативного исходного лекарственного средства.

В конкретных вариантах осуществления дипептиды используют для разработки пролекарств для нацеливания или направленного транспорта, поскольку они являются субстратами для ферментов или биотранспортных систем. Неферментативный путь образования дипептидного пролекарства, то есть способность претерпевать внутримолекулярную циклизацию с образованием соответствующего дикетопиперазина (DKP) и высвобождением активного лекарственного средства, недостаточно определен.

В некоторых вариантах осуществления дипептиды присоединены к фрагменту лекарственного средства через сложноэфирные связи, как было описано для дипептидных эфиров лекарственного средства парацетамола (Gomes et al. (2005) Bio & Med Chem Lett). В этом случае реакция циклизации состоит из нуклеофильной атаки N-концевого амина пептида на атом углерода сложного эфира с образованием тетраэдрического промежуточного соединения, за которым следует перенос протона от амина к оксианиону уходящей группы с одновременным образованием пептидной связи с получением циклического продукта DKP и свободного лекарственного средства. Этот метод применим к гидроксил-содержащим лекарствам *in vitro*, но было обнаружено, что он конкурирует с ферментативным гидролизом сложноэфирной связи *in vivo*, поскольку соответствующие дипептидные эфиры высвобождают парацетамол намного быстрее, чем в буфере (Gomes et al. (Molecules 12 (2007) 2484-2506). Чувствительность пролекарств на основе дипептидов к пептидазам может быть устранена путем включения по меньшей мере одной ненатуральной аминокислоты в дипептидный мотив. Однако эндогенные ферменты, способные расщеплять сложноэфирные связи, не ограничиваются пептидазами, и ферментная зависимость такого расщепления пролекарства все еще приводит к непредсказуемым характеристикам *in vivo*.

В некоторых вариантах осуществления изобретения ферментную зависимость намеренно встраивают в пролекарства DKP, например, когда пролекарства сложного эфира дипептида формируют по аминоконцу дипептида, и ферментативное деформирование используется для инициирования образования дикетопиперазина и последующего расщепления связи сложного эфира-дипептида с последующим высвобождением молекулы лекарственного средства (см., например, USP 7163923). В качестве дополнительного примера, октапептид присоединяется сложноэфирной связью к 4-гидроксильной группе винбластина и подвергается расщеплению сложноэфирной связи за счет образования DKP после специфического ферментативного удаления N-концевого гексапептида (см. Brady et al. (2002) J Med Chem 45: 4706-15).

Объем реакции образования DKP также был расширен на амидные пролекарства. В качестве примера USP 5952294 описывает активацию пролекарства с использованием образования дикетопиперазина для дипептидамида пролекарств цитарабина. В этом случае временная связь образуется между карбонилем дипептида и ароматической аминогруппой цитарабина. Однако маловероятно, что для таких конъюгатов может быть достигнут эффект медленного высвобождения, поскольку в них отсутствует носитель или другая часть, или функциональность, увеличивающая период полужизни.

Также были описаны дипептидные пролекарства, содержащие биоактивные пептиды, такие как GLP-1, способные высвобождать пептид посредством образования дикетопиперазина из дипептидного удлинения (см., например, WO 2009/099763). Биоактивный пептидный фрагмент может включать дополнительную цепь ПЭГ на одном из аминокислотных остатков боковой цепи для достижения расширенной циркуляции биоактивного пептида. Однако такой подход связан с рядом существенных недостатков. Во-первых, цепь ПЭГ должна быть связана с пептидом без ущерба для его биоактивности, что может быть

трудно достижимым для многих биоактивных агентов на основе пептидов. Во-вторых, поскольку пегилированный пептид сам по себе является биоактивным, дипептидный профрагмент оказывает влияние на биоактивность пептида и может отрицательно влиять на его свойства связывания с рецептором.

Конкретные примерные технологии, которые можно использовать с соединениями по настоящему изобретению, включают технологии, разработанные ProLynx (Сан-Франциско, Калифорния) и Ascendis Pharma (Пало-Альто, Калифорния). В технологической платформе ProLynx используются наборы новых линкеров, которые предварительно запрограммированы на расщепление с различной скоростью, чтобы обеспечить контролируемое, предсказуемое и длительное высвобождение малых молекул и пептидов из циркулирующих полутвердых макромолекулярных конъюгатов. Технология позволяет поддерживать необходимый стабильный уровень терапевтических агентов в сыворотке крови от недель до месяцев.

Технологическая платформа Ascendis объединяет преимущества пролекарств и технологий замедленного высвобождения для улучшения свойств малых молекул и пептидов. Находясь в циркуляции, патентованные пролекарства высвобождают немодифицированное активное исходное терапевтическое средство с заданными скоростями, которые регулируются физиологическим значением pH и температурными условиями. Поскольку терапевтический агент выпускается в неизменном виде, он сохраняет свой первоначальный механизм действия.

Модификации для улучшения ингибирующих характеристик.

Часто полезно, а иногда и необходимо улучшить одно или несколько физических свойств способов лечения, раскрытых в настоящем изобретении, и/или способ их применения. Улучшения физических свойств включают, например, способы увеличения растворимости в воде, биодоступности, периода полужизни в сыворотке и/или терапевтического периода полужизни; и/или модулирование биологической активности.

Модификации, известные в данной области техники, включают пегилирование, Fc-гибридизацию и гибридизацию с альбумином. Хотя такие модификации обычно связаны с крупномолекулярными агентами (например, полипептидами), такие модификации недавно были оценены с использованием конкретных малых молекул. Например, Chiang, M. et al. (*J. Am. Chem. Soc.*, 2014, 136 (9): 3370-73) описывают низкомолекулярный агонист рецептора аденозина 2a, конъюгированный с доменом Fc иммуноглобулина. Конъюгат малая молекула-Fc сохранял сильные взаимодействия с рецептором Fc и рецептором аденозина 2a, и демонстрировал превосходные свойства по сравнению с неконъюгированной малой молекулой. Также описано ковалентное присоединение молекул ПЭГ к низкомолекулярным терапевтическим средствам (Li, W. et al., *Progress in Polymer Science*, 2013 38: 421-44).

Другие известные модификации включают дейтерирование для улучшения фармакокинетики, фармакодинамики и профилей токсичности. Из-за большей атомной массы дейтерия разрыв связи углерод-дейтерий требует больше энергии, чем связь углерод-водород. Поскольку эти более прочные связи труднее разорвать, скорость метаболизма лекарственного средства ниже по сравнению с недейтерированными формами, что позволяет реже вводить дозу и может дополнительно снизить токсичность. (Charles Schmidt, *Nature Biotechnology*, 2017, 35(6): 493-494; Harbeson, S. and Tung, R., *Medchem News*, 2014(2): 8-22).

Терапевтическое и профилактическое использование.

Настоящее изобретение предполагает использование описанных в настоящем изобретении ингибиторов аргиназы для лечения или профилактики широкого диапазона заболеваний, расстройств и/или состояний и/или их симптомов. Хотя конкретные применения подробно описаны ниже, следует понимать, что настоящее изобретение этим не ограничивается. Кроме того, хотя общие категории конкретных заболеваний, расстройств и состояний изложены ниже, некоторые из заболеваний, расстройств и состояний могут быть членами более чем одной категории, а другие могут не входить ни в одну из раскрытых категорий.

В некоторых вариантах осуществления заболевания, расстройства и/или состояния, описанные в настоящем изобретении, опосредуются, по меньшей мере частично, аргиназой.

В некоторых вариантах осуществления ингибиторы аргиназы, описанные в настоящем изобретении, применяют в количестве, эффективном для замедления, остановки или обращения активности опосредованной аргиназой иммуносупрессии.

Заболевания, связанные с онкологией.

В соответствии с настоящим изобретением ингибитор аргиназы можно использовать для лечения или профилактики пролиферативного заболевания или расстройства, включая рак, например рак матки, шейки матки, молочной железы, простаты, яичка, желудочно-кишечного тракта (например, пищевода, ротоглотки, желудка, тонкой или толстой кишки, толстой или прямой кишки), почки, почечных клеток, мочевого пузыря, кости, костного мозга, кожи, головы или шеи, печени, желчного пузыря, сердца, легкого, поджелудочной железы, слюнной железы, надпочечника, щитовидной железы, головного мозга (например, глиомы), ганглиев, центральной нервной системы (ЦНС) и периферической нервной системы (ПНС), а также онкопатологии кроветворной системы и иммунной системы (например, селезенки или тимуса). Настоящее изобретение также относится к способам лечения или профилактики других связанных с раком заболеваний, нарушений или состояний, включая, например, иммуногенные опухоли, неим-

муногенные опухоли, латентные опухоли, вирус-индуцированный рак (например, рак эпителиальных клеток, рак эндотелиальных клеток, плоскоклеточный рак и папилломавирус), аденокарциномы, лимфомы, карциномы, меланомы, лейкозы, миеломы, саркомы, тератокарциномы, химически индуцированные виды рака, метастазы и ангиогенез. Изобретение предполагает ингибирование аргиназы для того, чтобы обратить вспять истощение аргинина, которое приводит к истощению Т-клеток и предотвращает их активацию и пролиферацию (Rodriguez et al. (2004). Продукция аргиназы I в микроокружении опухоли зрелыми миелоидными клетками подавляет экспрессию Т-клеточного рецептора и антиген-специфические Т-клеточные ответы. *Cancer Res.* 64 (16), 5839-5849). В конкретных вариантах осуществления опухоль или рак представляет собой рак толстой кишки, рак яичника, рак молочной железы, меланому, рак легкого, глиобластому или лейкоз. Использование термина (терминов) заболеваний, расстройств и состояний, связанных с раком, предназначено для широкого обозначения состояний, которые прямо или косвенно связаны с раком, и включает, например, ангиогенез и предраковые состояния, такие как дисплазия.

В некоторых вариантах осуществления рак может быть метастатическим или иметь риск стать метастатическим, или может возникать в диффузную ткань, включая онкологическое заболевание крови или костного мозга (например, лейкоз). В некоторых дополнительных вариантах осуществления соединения по настоящему изобретению можно использовать для преодоления толерантности Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам лечения пролиферативного состояния, рака, опухоли или предракового состояния с помощью ингибитора аргиназы и по меньшей мере одного дополнительного терапевтического или диагностического агента, примеры которых изложены в другом месте в настоящем изобретении.

Иммунные и воспалительные заболевания.

Используемые в настоящем изобретении термины, такие как "иммунное заболевание", "иммунное состояние", "иммунное расстройство", "воспалительное заболевание", "воспалительное состояние", "воспалительное расстройство" и т.п., предназначены для широкого охвата любого связанного с иммунитетом состояния (например, аутоиммунного заболевания) или расстройства с воспалительным компонентом, которое можно лечить с помощью описанных в настоящем изобретении ингибиторов аргиназы, так что достигается некоторый терапевтический эффект. Такие состояния часто неразрывно связаны с другими заболеваниями, расстройствами и состояниями. Например, "иммунное состояние" может относиться к пролиферативным состояниям, таким как рак, опухоли и ангиогенез; включая инфекции (острые и хронические), опухоли и рак, которые сопротивляются уничтожению иммунной системой.

Ингибиторы аргиназы по настоящему изобретению можно использовать для повышения или усиления иммунного ответа; для улучшения иммунизации, в том числе повышения эффективности вакцины; и для усиления воспаления. Иммунодефицитные состояния, связанные с иммунодефицитными заболеваниями, иммуносупрессивным лечением, острой и/или хронической инфекцией и старением, можно лечить с использованием соединений, раскрытых в настоящем изобретении. Ингибиторы аргиназы можно также использовать для стимуляции иммунной системы пациентов, страдающих от ятрогенно-индуцированного подавления иммунитета, включая тех, кто перенес трансплантацию костного мозга, химиотерапию или лучевую терапию.

В конкретных вариантах осуществления настоящего раскрытия ингибиторы аргиназы используются для увеличения или усиления иммунного ответа на антиген путем обеспечения адьювантной активности. В конкретном варианте осуществления субъекту вводят по меньшей мере один антиген или вакцину в сочетании по меньшей мере с одним ингибитором аргиназы по настоящему изобретению для продления иммунного ответа на антиген или вакцину. Также обеспечиваются терапевтические композиции, которые включают по меньшей мере один антигенный агент или вакцинный компонент, включая, помимо прочего, вирусы, бактерии и грибы или их части, белки, пептиды, опухолеспецифические антигены и вакцины на основе нуклеиновых кислот, в комбинации по меньшей мере с одним ингибитором аргиназы по настоящему изобретению.

Неограничивающий список иммунных и воспалительных заболеваний, нарушений и состояний, которые можно лечить или предотвращать с помощью соединений и композиций по настоящему изобретению, включает артрит (например, ревматоидный артрит), почечную недостаточность, волчанку, астму, псориаз, колит, панкреатит, аллергию, фиброз, хирургические осложнения (например, когда воспалительные цитокины препятствуют заживлению), анемию и фибромиалгию. Другие заболевания и расстройства, которые могут быть связаны с хроническим воспалением, включают болезнь Альцгеймера, застойную сердечную недостаточность, инсульт, стеноз аортального клапана, артериосклероз, остеопороз, болезнь Паркинсона, инфекции, воспалительную болезнь кишечника (например, болезнь Крона и язвенный колит), аллергический контактный дерматит, и другие экземы, системный склероз, трансплантацию и рассеянный склероз.

Среди других иммунозависимых нарушений предполагается, что ингибирование функции аргиназы также может играть роль в иммунологической толерантности и предотвращении отторжения плода в утробе матери.

В некоторых вариантах осуществления описанный в настоящем изобретении ингибитор аргиназы можно комбинировать с иммуносупрессивным агентом для уменьшения количества иммунных эффек-

торных клеток.

Некоторые из вышеупомянутых заболеваний, расстройств и состояний, при которых ингибитор аргиназы может быть особенно эффективным (например, из-за ограничений современных методов лечения), описаны более подробно ниже.

Ревматоидный артрит (РА), который обычно характеризуется хроническим воспалением слизистой оболочки (синовиальной оболочки) суставов, поражает приблизительно 1% населения США (-2,1 миллиона человек). Дальнейшее понимание роли цитокинов, включая ФНО- α и ИЛ-1, в воспалительном процессе позволило разработать и внедрить новый класс болезнь-модифицирующих антиревматических препаратов (БМАРП). Агенты (некоторые из которых частично совпадают с методами лечения РА) включают ENBREL (этанерцепт), REMICADE (инфликсимаб), HUMIRA (адалимумаб) и KINERET (анакинра). Хотя некоторые из этих агентов облегчают симптомы, подавляют прогрессирование структурных повреждений и улучшают физическую функцию в конкретных группах пациентов, все еще существует потребность в альтернативных средствах с улучшенной эффективностью, дополнительными механизмами действия и меньшим числом/меньшей тяжестью побочных эффектов.

Псориаз, совокупность распространенных иммунозависимых хронических кожных заболеваний, поражает более 4,5 миллионов человек в США, из которых 1,5 миллиона считаются страдающими умеренной или тяжелой формой заболевания. Кроме того, более 10% пациентов с псориазом заболевают псориагическим артритом, который повреждает кости и соединительную ткань вокруг суставов. Лучшее понимание физиологии псориаза привело к применению агентов, которые, например, нацелены на активность Т-лимфоцитов и цитокинов, ответственных за воспалительную природу заболевания. К таким агентам относятся ингибиторы ФНО- α (также используемые при лечении ревматоидного артрита (РА)), включая ENBREL (этанерцепт), REMICADE (инфликсимаб) и HUMIRA (адалимумаб), а также ингибиторы Т-клеток, такие как AMEVIVE (алефасепт) и RAPTIVA (эфализумаб). Хотя некоторые из этих агентов в некоторой степени эффективны для определенных групп пациентов, ни один из них не продемонстрировал эффективность лечения всех пациентов.

Заболевания, связанные с микроорганизмами.

Настоящее изобретение предполагает использование описанных в настоящем изобретении ингибиторов аргиназы для лечения и/или профилактики любого вирусного, бактериального, грибкового, паразитарного или другого инфекционного заболевания, расстройства или состояния, при которых лечение ингибитором аргиназы может быть полезным.

Примеры предполагаемых вирусных заболеваний, нарушений и состояний включают вирус гепатита В (HBV), вирус гепатита С (HCV), вирус папилломы человека (HPV), ВИЧ, СПИД (включая его проявления, такие как кахексия, деменция и диарея), вирус простого герпеса (HSV), вирус Эпштейна-Барра (EBV), вирус ветряной оспы, вирус Коксаки и цитомегаловирус (CMV), но не ограничиваются ими.

Дополнительные примеры таких заболеваний и нарушений включают стафилококковые и стрептококковые инфекции (например, *Staphylococcus aureus* и *Streptococcus sanguinis*, соответственно), лейшмании, токсоплазмы, трихомонады, лямблии, *Candida albicans*, бациллы сибирской язвы и *Pseudomonas aeruginosa*. В некоторых вариантах осуществления заболевания или расстройства включают инфекцию *Mycobacterium* (например, *Mycobacterium leprae* или *Mycobacterium tuberculosis*) или инфекцию, вызванную *Listeria monocytogenes* или *Toxoplasma gondii*. Соединения по настоящему изобретению можно использовать для лечения сепсиса, для уменьшения или подавления роста бактерий, а также для снижения или подавления воспалительных цитокинов.

Дальнейшие варианты осуществления предполагают лечение паразитарной инфекции, включая *Leishmania donovani*, *Leishmania tropica*, *Leishmania major*, *Leishmania aethiopica*, *Leishmania mexicana*, *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale* или *Plasmodium malariae*, но не ограничиваясь ими. Часто противопаразитарную терапию проводят профилактически (например, до того, как субъект отправится в район с высокой частотой паразитарных инфекций).

Другие заболевания. Варианты осуществления настоящего изобретения предусматривают применение описанных в настоящем изобретении ингибиторов аргиназы у субъекта для лечения или профилактики любого другого расстройства, которое может выиграть по меньшей мере от некоторого уровня ингибирования аргиназы. Такие заболевания, расстройства и состояния включают, например, сердечно-сосудистые заболевания (например, ишемию сердца), желудочно-кишечные заболевания (например, болезнь Крона), метаболические заболевания (например, диабет), печеночные заболевания (например, фиброз печени, НАСГ и НАЖБП), легочные заболевания (например, ХОБЛ и астму), офтальмологические заболевания (например, диабетическую ретинопатию) и почечные заболевания (например, почечную недостаточность).

Фармацевтические композиции.

Ингибиторы аргиназы по настоящему изобретению могут быть в форме композиций, подходящих для применения у субъекта. В целом, такие композиции представляют собой "фармацевтические композиции", содержащие ингибитор (ингибиторы) аргиназы и один или несколько фармацевтически приемлемых или физиологически приемлемых разбавителей, носителей или наполнителей.

В некоторых вариантах осуществления ингибиторы аргиназы присутствуют в терапевтически приемлемом количестве.

Фармацевтические композиции можно использовать в способах по настоящему изобретению; таким образом, например, фармацевтические композиции можно вводить *ex vivo* или *in vivo* субъекту для практического использования терапевтических и профилактических способов и применений, описанных в настоящем изобретении.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть составлены таким образом, чтобы они были совместимы с предполагаемым способом или путем введения; примерные пути введения изложены в настоящем изобретении. Кроме того, фармацевтические композиции можно использовать в сочетании с другими терапевтически активными агентами или соединениями, как описано в настоящем изобретении, для лечения или профилактики заболеваний, нарушений и состояний, предусмотренных настоящим изобретением.

Фармацевтические композиции, содержащие активный ингредиент (например, ингибитор функции аргиназы), могут быть в форме, подходящей для перорального применения, например, в виде таблеток, капсул, пастилок, леденцов, водных или масляных суспензий, диспергируемых порошков или гранул, эмульсий, твердых или мягких капсул, или сиропов, растворов, микрогранул или эликсиров.

Фармацевтические композиции, предназначенные для перорального применения, могут быть приготовлены любым способом, известным в данной области техники для производства фармацевтических композиций, и такие композиции могут содержать один или несколько агентов, таких как, например, подсластители, ароматизаторы, красители и консерванты, чтобы обеспечить фармацевтически элегантные и приятные на вкус препараты. Таблетки, капсулы и т.п. содержат активный ингредиент в смеси с нетоксичными фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, которые пригодны для производства таблеток. Эти вспомогательные вещества могут быть, например, разбавителями, такими как карбонат кальция, карбонат натрия, лактоза, фосфат кальция или фосфат натрия; гранулирующими средствами и дезинтегрантами, например, кукурузным крахмалом или альгиновой кислотой; связующими агентами, например, крахмалом, желатином или аравийской камедью, и смазочными веществами, например, стеаратом магния, стеариновой кислотой или тальком.

Таблетки, капсулы и т.п., подходящие для перорального применения, могут быть без покрытия или покрыты известными способами для задержки распада и абсорбции в желудочно-кишечном тракте и, таким образом, для обеспечения длительного действия. Например, можно использовать материал для пролонгированного высвобождения, такой как глицерил моностеарат или глицерил дистеарат. На них также можно наносить покрытие с помощью способов, известных в данной области техники, для получения осмотических терапевтических таблеток с контролируемым высвобождением. Дополнительные агенты включают биodeградируемые или биосовместимые частицы или полимерное вещество, такое как полиэферы, полиаминокислоты, гидрогель, поливинилпирролидон, полиангидриды, полигликолевая кислота, этилен-винилацетат, метилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза, протаминсульфат или сополимеры лактида и гликолида, сополимеры полилактида и гликолида, или сополимеры этиленвинилацетата для контроля доставки применяемой композиции. Например, пероральный агент может быть заключен в микрокапсулы, полученные методиками коацервации или межфазной полимеризацией, с использованием гидроксиметилцеллюлозы, или в микрокапсулы из желатина, или микрокапсулы из поли(метилметакрилата), соответственно, или в коллоидную систему доставки лекарственного средства. Коллоидные дисперсионные системы включают комплексы макромолекул, микрокапсулы, микросферы, микрогранулы и системы на основе липидов, включая эмульсии масло-в-воде, мицеллы, смешанные мицеллы и липосомы.

Способы приготовления вышеупомянутых составов будут очевидны специалистам в данной области техники.

Составы для перорального применения также могут быть представлены в виде твердых желатиновых капсул, в которых активный ингредиент смешан с инертным твердым разбавителем, например, карбонатом кальция, фосфатом кальция, каолином или микрокристаллической целлюлозой, или в виде мягких желатиновых капсул, в которых активный ингредиент смешивают с водой или масляной средой, например, арахисовым маслом, жидким парафином или оливковым маслом.

Водные суспензии содержат активные вещества в смеси с вспомогательными веществами, пригодными для их производства. Такими вспомогательными веществами могут быть суспендирующие агенты, например карбоксиметилцеллюлоза натрия, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, альгинат натрия, поливинилпирролидон, трагакантовая камедь и аравийская камедь; диспергирующие или смачивающие агенты, например, натуральный фосфатид (например, лецитин), или продукты конденсации алкиленоксида с жирными кислотами (например, полиоксиэтиленстеарат), или продукты конденсации этиленоксида с длинноцепочечными алифатическими спиртами (например, гептадекаэтиленоксицетанол), или продукты конденсации этиленоксида с неполными сложными эфирами, полученными из жирных кислот и гекситола (например, полиоксиэтиленсорбитол моноолеат), или продукты конденсации этиленоксида с неполными сложными эфирами, полученными из жирных кислот и ангидридов гекситола (например, полиэтиленсорбитан моноолеат). Водные суспензии также могут содержать один или несколько

консервантов.

Масляные суспензии могут быть составлены путем суспендирования активного ингредиента в растительном масле, например, арахисовом масле, оливковом масле, кунжутном масле или кокосовом масле, или в минеральном масле, таком как жидкий парафин. Масляные суспензии могут содержать загуститель, например, пчелиный воск, твердый парафин или цетиловый спирт. Подсластители, такие как указанные выше, и ароматизаторы могут быть добавлены для обеспечения приятного на вкус перорального препарата.

Диспергируемые порошки и гранулы, пригодные для приготовления водной суспензии путем добавления воды, обеспечивают активный ингредиент в смеси с диспергирующим или смачивающим агентом, суспендирующим агентом и одним или несколькими консервантами. Примеры подходящих диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов приведены в настоящем изобретении.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению также могут быть в форме эмульсий масло-в-воде. Масляная фаза может быть растительным маслом, например, оливковым маслом или арахисовым маслом, или минеральным маслом, например, жидким парафином, или их смесями. Подходящими эмульгирующими агентами могут быть натуральные камеди, например, аравийская камедь или трагакантовая камедь; натуральные фосфатиды, например, соевые бобы, лецитин и сложные или неполные сложные эфиры, полученные из жирных кислот; ангидриды гекситола, например, сорбитан моноолеат; и продукты конденсации неполных сложных эфиров с этиленоксидом, например, полиоксиэтилен-сорбитан моноолеат.

Фармацевтические композиции обычно включают терапевтически эффективное количество ингибитора аргиназы, предусмотренного настоящим изобретением, и один или несколько фармацевтически и физиологически приемлемых агентов для состава. Подходящие фармацевтически приемлемые или физиологически приемлемые разбавители, носители или наполнители включают антиоксиданты (например, аскорбиновую кислоту и бисульфат натрия), консерванты (например, бензиловый спирт, метилпарабены, этил или *n*-пропил, *p*-гидроксibenзоат), эмульгирующие агенты, суспендирующие агенты, диспергирующие агенты, растворители, наполнители, объемобразующие агенты, детергенты, буферы, основы, разбавители и/или адьюванты, но не ограничиваются ими. Например, подходящей основой может быть физиологический раствор, или физиологический раствор с цитратным буфером, возможно с добавлением других материалов, обычно используемых в фармацевтических композициях для парентерального введения. Дополнительными примерами основ являются нейтральный забуференный физиологический раствор или физиологический раствор, смешанный с сывороточным альбумином. Специалисты в данной области техники легко узнают множество буферов, которые можно использовать в фармацевтических композициях и лекарственных формах, рассматриваемых в настоящем изобретении. Типичные буферы включают фармацевтически приемлемые слабые кислоты, слабые основания или их смеси, но не ограничиваются ими. В качестве примера буферные компоненты могут представлять собой водорастворимые материалы, такие как фосфорная кислота, винная кислота, молочная кислота, янтарная кислота, лимонная кислота, уксусная кислота, аскорбиновая кислота, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота и их соли. Приемлемые буферные агенты включают, например, трис-буфер, *N*-(2-гидроксиэтил) пиперазин-*N*-(2-этансульфоновою кислоту) (HEPES), 2-(*N*-морфолино)этансульфоновою кислоту (MES), 2-(*N*-морфолино)этансульфоновою кислоты натриевую соль (MES), 3-(*N*-морфолино)пропансульфоновою кислоту (MOPS) и *N*-трис[гидроксиметил]метил-3-аминопропансульфоновою кислоту (TAPS).

После составления фармацевтической композиции ее можно хранить в стерильных флаконах в виде раствора, суспензии, геля, эмульсии, твердого вещества или дегидратированного или лиофилизированного порошка. Такие составы могут храниться либо в форме, готовой к употреблению, либо в лиофилизированной форме, требующей восстановления перед использованием, либо в жидкой форме, требующей разбавления перед применением, либо в другой приемлемой форме.

В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция обеспечена в одноразовом контейнере (например, одноразовом флаконе, ампуле, шприце или автоинъекторе (подобном, например, EpiPen®)), тогда как многоразовый контейнер (например, многоразовый флакон) предоставляется в других вариантах осуществления.

Составы также могут включать носители для защиты композиции от быстрого разложения или выведения из организма, такие как состав с контролируемым высвобождением, включая липосомы, гидрогели, пролекарства и микрокапсулированные системы доставки. Например, можно использовать материал для пролонгированного высвобождения, такой как глицерин моностеарат или глицерин стеарат, отдельно или в комбинации с воском. Для доставки ингибитора аргиназы можно использовать любое устройство для доставки лекарственного средства, включая имплантаты (например, имплантируемые насосы) и катетерные системы, насосы для медленного введения и устройства, все из которых хорошо известны специалисту в данной области техники.

Депо-инъекции, которые обычно вводят подкожно или внутримышечно, также могут быть использованы для высвобождения ингибиторов аргиназы, описанных в настоящем изобретении, в течение определенного периода времени. Депо-инъекции обычно производят либо на твердой, либо на масляной основе, и обычно они содержат по меньшей мере один из компонентов композиции, указанных в на-

стоящем изобретении. Рядовой специалист в данной области техники знаком с возможными составами и применением депо-инъекций.

Фармацевтические композиции могут быть в форме стерильной водной или масляной суспензии для инъекций. Эта суспензия может быть составлена в соответствии с известным уровнем техники с использованием подходящих диспергирующих или смачивающих агентов и суспендирующих агентов, упомянутых в настоящем изобретении. Стерильный препарат для инъекций может также представлять собой стерильный раствор или суспензию для инъекций в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, например, в виде раствора в 1,3-бутандиоле. Приемлемые разбавители, растворители и дисперсионные среды, которые можно использовать, включают воду, раствор Рингера, изотонический раствор хлорида натрия, Stemo-phor EL™ (BASF, Парсиппани, Нью-Джерси) или фосфатно-солевой буфер (ФБР), этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль) и их подходящие смеси. Кроме того, стерильные нелетучие масла обычно используют в качестве растворителя или суспендирующей среды. Для этой цели можно использовать любое легкое нелетучее масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Более того, жирные кислоты, такие как олеиновая кислота, находят применение при приготовлении инъекционных препаратов. Пролонгированная абсорбция определенных инъекционных составов может быть достигнута путем включения агента, замедляющего абсорбцию (например, моностеарата алюминия или желатина).

Настоящее изобретение предполагает применение ингибиторов аргиназы в форме суппозитория для ректального введения. Суппозитории можно приготовить путем смешивания лекарственного средства с подходящим нераздражающим вспомогательным веществом, который является твердым при обычных температурах, но жидким при ректальной температуре и, следовательно, будет плавиться в прямой кишке с высвобождением лекарственного средства. Такие материалы включают масло какао и полиэтиленгликоли, но не ограничиваются ими.

Ингибиторы аргиназы, рассматриваемые в настоящем изобретении, могут быть в форме любой другой подходящей фармацевтической композиции (например, спреев для интраназального или ингаляционного применения), известных в настоящее время или разработанных в будущем.

Пути применения.

Настоящее изобретение предусматривает применение ингибиторов аргиназы и их композиций любым подходящим способом. Подходящие пути применения включают пероральный, парентеральный (например, внутримышечный, внутривенный, подкожный (например, посредством инъекции или имплантата)), интраперитонеальный, интрацестеральный, внутрисуставной, интрацеребральный (интрапаренхимный) и интрацеребровентрикулярный), интраназальный, вагинальный, сублингвальный, интраокулярный, ректальный, местный (например, трансдермальный), буккальный и ингаляционный. Депо-инъекции, которые обычно вводят подкожно или внутримышечно, также можно использовать для высвобождения ингибиторов аргиназы, описанных в настоящем изобретении, в течение определенного периода времени.

Конкретные варианты осуществления настоящего изобретения предполагают пероральное применение.

Комбинированная терапия.

Настоящее изобретение предполагает использование ингибиторов аргиназы по отдельности или в комбинации с одним или несколькими активными терапевтическими агентами. Дополнительные активные терапевтические агенты могут быть малыми химическими молекулами; макромолекулами, такими как белки, антитела, пептидотела, пептиды, ДНК, РНК или фрагменты таких макромолекул; или клеточной или генной терапией. В такой комбинированной терапии различные активные агенты часто имеют разные взаимодополняющие механизмы действия. Такая комбинированная терапия может быть особенно полезной, поскольку позволяет снизить дозу одного или нескольких агентов, тем самым уменьшая или устраняя побочные эффекты, связанные с одним или несколькими агентами. Кроме того, такая комбинированная терапия может иметь синергетический терапевтический или профилактический эффект в отношении основного заболевания, расстройства или состояния.

Используемый в настоящем изобретении термин "комбинация" предназначен для включения терапий, которые можно применять по отдельности, например, составленных по отдельности для отдельного введения (например, как может быть предоставлено в наборе), и терапий, которые можно применять вместе в едином составе (т.е. "совместном составе").

В некоторых вариантах осуществления ингибиторы аргиназы вводят или применяют последовательно, например, когда один агент вводят до одного или нескольких других агентов. В других вариантах осуществления ингибиторы аргиназы вводят одновременно, например, когда два или более агента вводят одновременно или примерно в одно и то же время; два или более агентов могут присутствовать в двух или более отдельных препаратах или могут быть объединены в один препарат (т.е. совместный препарат). Независимо от того, вводятся ли два или более агента последовательно или одновременно, считается, что их вводят в комбинации для целей настоящего изобретения.

Ингибиторы аргиназы по настоящему изобретению можно использовать в комбинации по меньшей мере с одним другим (активным) агентом любым подходящим способом в данных обстоятельствах. В

одном варианте осуществления лечение по меньшей мере одним активным агентом и по меньшей мере одним ингибитором аргиназы по настоящему изобретению продолжают в течение определенного периода времени.

В другом варианте осуществления лечение по меньшей мере одним активным агентом сокращают или прекращают (например, когда субъект находится в стабильном состоянии), в то время как лечение ингибитором аргиназы по настоящему изобретению сохраняют в режиме постоянного дозирования.

В другом варианте осуществления лечение по меньшей мере одним активным агентом сокращают или прекращают (например, когда субъект находится в стабильном состоянии), тогда как лечение ингибитором аргиназы по настоящему изобретению уменьшают (например, применяют более низкую дозу, менее частое дозирование или более короткий режим лечения).

В еще одном варианте осуществления лечение по меньшей мере одним активным агентом уменьшают или прекращают (например, когда субъект находится в стабильном состоянии), а лечение ингибитором аргиназы по настоящему изобретению увеличивают (например, применяют более высокую дозу, более частое дозирование или более длительный режим лечения).

В еще одном варианте осуществления лечение по меньшей мере одним активным агентом сохраняют, а лечение ингибитором аргиназы по настоящему изобретению уменьшают или прекращают (например, применяют более низкую дозу, менее частое введение или более короткий режим лечения).

В еще одном варианте осуществления лечение по меньшей мере одним активным агентом и лечение ингибитором аргиназы по настоящему изобретению снижают или прекращают (например, применяют более низкую дозу, менее частое дозирование или более короткий режим лечения).

Заболевания, связанные с онкологией.

Настоящее изобретение обеспечивает способы лечения и/или профилактики пролиферативного состояния, рака, опухоли или предракового заболевания, расстройства или состояния с помощью ингибитора аргиназы и по меньшей мере одного дополнительного терапевтического или диагностического агента.

В некоторых вариантах осуществления дополнительный терапевтический или диагностический агент представляет собой облучение, иммуномодулирующий агент, химиотерапевтический агент или диагностический агент. Подходящие иммуномодуляторы, которые можно использовать в настоящем изобретении, включают CD40L, B7 и B7RP1; активирующие моноклональные антитела (mAb) к стимулирующим рецепторам, такие как анти-CD40, анти-CD38, анти-ICOS и 4-1BB лиганд; нагрузку антигеном дендритных клеток (*in vitro* или *in vivo*); противораковые вакцины, такие как противораковые вакцины на основе дендритных клеток; цитокины/хемокины, такие как ILL IL2, IL12, IL18, ELC/CCL19, SLC/CCL21, MCP-1, IL-4, IL-18, TNF, IL-15, MDC, IFNa/b, M-CSF, IL-3, GM-CSF, IL-13 и анти-IL-10; бактериальные липополисахариды (ЛПС); ингибиторы индоламин-2,3-диоксигеназы 1 (IDO1) и иммуностимулирующие олигонуклеотиды.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способам подавления роста опухоли, включающим применение описанного в настоящем изобретении ингибитора аргиназы в комбинации с ингибитором сигнальной трансдукции (STI) для достижения аддитивного или синергетического подавления роста опухоли. Используемый в настоящем изобретении термин "ингибитор сигнальной трансдукции" относится к агенту, который избирательно ингибирует одну или несколько стадий сигнального пути. Ингибиторы сигнальной трансдукции (STI) по настоящему изобретению включают: (i) ингибиторы киназ bcr/abl (например, GLEEVEC); (ii) ингибиторы рецептора эпидермального фактора роста (EGF), включая ингибиторы киназ и антитела; (iii) ингибиторы рецептора her-2/neu (например, HERCEPTIN); (iv) ингибиторы киназ семейства Akt или пути Akt (например, рапамицин); (v) ингибиторы киназы клеточного цикла (например, флавопиридол); (vi) ингибиторы фосфатидилинозитолкиназы и (vii) ингибиторы фосфоинозитидкиназы, такие как ингибиторы PI3K. Агенты, участвующие в иммуномодуляции, также можно использовать в комбинации с описанными в настоящем изобретении ингибиторами аргиназы для подавления роста опухоли у больных раком.

Примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилендиофосфорамид и триметилломеламин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтамин оксид гидрохлорид, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как аклациномицины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, калихеамицин, карабицин, каминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эсорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, микрофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пеплоницин, потфирамицин, пуромоцин, келамицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антимаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, три-

метрексат; пуриновые аналоги, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; пиримидиновые аналоги, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин, 5-FU; андрогены, такие как калустерон, дромостанолона пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; средства, угнетающие функции надпочечников, такие как аминоглутетимид, митотан, трилостан; восполнитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; альдофосфамида гликозид; аминоклевулиновую кислоту; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиковон; элформитин; эллиптиния ацетат; этоглоцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбазин; разоксан; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиковон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид (Ага-С); циклофосфамид; тиотепа; таксоиды, например паклитаксел и доксетаксел; хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; платину и координационные комплексы платины, такие как дисплатин, карбоплатин и оксалиплатин; винбластин; эпопозид (VP-16); ифосфамид; митомидин С; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навельбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминокпертин; кселода; ибандронат; СРТ11; ингибиторы топоизомеразы; диформетилорнитин (DMFO); ретиновую кислоту; эсперамицины; капецитабин; антрациклины; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных, но не ограничиваются ими.

Химиотерапевтические агенты также включают антигормональные агенты, которые регулируют или ингибируют гормональное действие на опухоли, такие как антиэстрогены, включая, например, тамоксифен, ралоксифен, ингибирующие ароматазу 4(5)-имидазолы, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, онапристон и торемифен; и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных.

В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия включает схему химиотерапии, включающую один или несколько химиотерапевтических агентов.

В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия включает применение гормона или родственного гормонального агента.

Дополнительные методы лечения, которые могут использоваться в комбинации с ингибитором аргиназы, включают радиотерапию, моноклональное антитело против опухолевого антигена, комплекс моноклонального антитела и токсина, адьювант Т-клеток, трансплантат костного мозга или антигенпрезентирующие клетки (например, терапию дендритными клетками), включая агонисты TLR, которые используют для стимуляции таких антигенпрезентирующих клеток.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предполагает использование описанных в настоящем изобретении соединений в комбинации с адаптивной клеточной терапией, новой и многообещающей формой персонализированной иммунотерапии, в которой иммунные клетки с противоопухолевой активностью вводят онкологическим больным. Адаптивная клеточная терапия изучается с использованием инфильтрирующих опухоль лимфоцитов (ОИЛ) и Т-клеток, сконструированных для экспрессии, например, химерных антигенных рецепторов (CAR) или Т-клеточных рецепторов (TCR). Адаптивная клеточная терапия обычно включает сбор Т-клеток у индивидуума, их генетическую модификацию для нацеливания на конкретный антиген или для усиления их противоопухолевого действия, их амплификацию до достаточного количества и вливание генетически модифицированных Т-клеток больному раком. Т-клетки могут быть получены от пациента, которому впоследствии повторно вливают размноженные клетки (например, аутологичные), или могут быть получены от пациентов-доноров (например, аллогенные).

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предполагает использование описанных в настоящем изобретении соединений в сочетании с терапиями на основе РНК-интерференции для подавления экспрессии генов. РНК-интерференция начинается с расщепления более длинных двухцепочечных РНК на малые интерферирующие РНК (миРНК). Одну цепь миРНК включают в рибонуклеопротеидный комплекс, известный как РНК-индуцированный сайленсинг-комплекс (RISC), который затем используют для идентификации молекул мРНК, которые по меньшей мере частично комплементарны встроенной цепи миРНК. RISC может связываться с мРНК или расщеплять ее, и то и другое подавляет трансляцию.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предполагает использование описанных в настоящем изобретении соединений в комбинации с антагонистами рецептора аденозина 2 (A₂R). Аденозин может связываться с четырьмя различными рецепторами, связанными с G-белком, и активировать их: A₁R, A_{2a}R, A_{2b}R и A₃R. Связывание аденозина с рецептором A_{2a}R, который экспрессируется на Т-клетках, клетках - натуральных киллерах и миелоидных клетках, таких как дендритные клетки, приводит к повышенному внутриклеточным уровням циклического АМФ и нарушению созревания и/или активации таких клеток. Этот процесс значительно снижает активацию иммунной системы против раковых клеток. Кроме того, A_{2a}R участвует в избирательном повышении противовоспалительных цитокинов, приводя к усилению регуляции PD-1 и CTLA-4, способствуя генерации регуляторных Т-клеток

LAG-3 и Foxp3+ и опосредуя ингибирование регуляторных Т-клеток. PD-1, CTLA-4 и другие иммунные контрольные точки обсуждаются далее в настоящем изобретении. Сочетание антагонистов A₂R в комбинациях, описанных в настоящем изобретении, может обеспечивать по меньшей мере дополнительный эффект ввиду их различных механизмов действия.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение предполагает использование описанных в настоящем изобретении соединений в комбинации с эктонуклеотидами, которые катализируют превращение АТФ в аденозин. Ферментативная активность CD39 и CD73 играет стратегическую роль в калибровке продолжительности, амплитуды и химической природы пуринергических сигналов, доставляемых к различным клеткам (например, иммунным клеткам). Изменение этой ферментативной активности может изменить течение или диктовать исход нескольких патофизиологических событий, включая рак, аутоиммунные заболевания, инфекции, атеросклероз и ишемически-реперфузионное повреждение. Исследования с использованием тканей, которые сверхэкспрессируют CD73, и с использованием мышей с нокаутом CD73 предоставили доказательства того, что ингибиторы CD73 потенциально полезны для лечения меланом, рака легкого, рака простаты и рака молочной железы (см., например, Sadej R. (2006) *Melanoma Res* 16: 213 -22). Поскольку более высокие уровни экспрессии CD73 связаны с неоваскуляризацией опухоли, инвазивностью, устойчивостью к химиотерапии и метастазированием, ингибиторы CD73 могут использоваться для контроля прогрессирования опухоли и метастазирования.

Ингибиторы иммунных контрольных точек.

Настоящее изобретение предполагает использование описанных в настоящем изобретении ингибиторов функции аргиназы в комбинации с ингибиторами иммунных контрольных точек.

Огромное количество генетических и эпигенетических изменений, характерных для всех видов рака, обеспечивает разнообразный набор антигенов, которые иммунная система может использовать для отличия опухолевых клеток от их нормальных аналогов. В случае Т-клеток конечная амплитуда (например, уровни продукции цитокинов или пролиферации) и качество ответа (например, тип генерируемого иммунного ответа, такой как характер продукции цитокинов), который инициируется посредством распознавания антигена Т-клеточным рецептором (TCR), регулируется балансом между костимулирующими и тормозящими сигналами (иммунными контрольными точками). В нормальных физиологических условиях иммунные контрольные точки имеют решающее значение для предотвращения аутоиммунитета (т.е. поддержания аутоотолерантности), а также для защиты тканей от повреждений, когда иммунная система реагирует на патогенную инфекцию. Экспрессия белков иммунных контрольных точек может нарушаться опухолями как важный механизм иммунной резистентности.

Т-клетки были основным направлением усилий по терапевтическому манипулированию эндогенным противоопухолевым иммунитетом из-за (i) их способности к селективному распознаванию пептидов, полученных из белков, во всех клеточных компартментах; (ii) их способности непосредственно распознавать и убивать антиген-экспрессирующие клетки (эффекторными Т-клетками CD8⁺; также известными как цитотоксические Т-лимфоциты (CTL)); и (iii) их способности управлять разнообразными иммунными ответами с помощью CD4⁺ хелперных Т-клеток, которые интегрируют адаптивные и врожденные эффекторные механизмы.

В клинических условиях блокада иммунных контрольных точек, которая приводит к усилению антиген-специфических Т-клеточных ответов, показала себя многообещающим подходом в терапии рака человека.

Опосредованный Т-клетками иммунитет включает несколько последовательных этапов, каждый из которых регулируется уравниванием стимулирующих и ингибирующих сигналов для оптимизации ответа. В то время как почти все ингибирующие сигналы в иммунном ответе в конечном итоге модулируют внутриклеточные сигнальные пути, многие инициируются через мембранные рецепторы, лиганды которых либо связаны с мембраной, либо являются растворимыми (цитокины). В то время как костимулирующие и ингибирующие рецепторы и лиганды, которые регулируют активацию Т-клеток, часто не проявляют сверхэкспрессии при раке по сравнению с нормальными тканями, ингибирующие лиганды и рецепторы, которые регулируют эффекторные функции Т-клеток в тканях, обычно сверхэкспрессируются на опухолевых клетках или на нетрансформированных клетках, связанных с микроокружением опухоли. Функции растворимых и мембраносвязанных иммунных контрольных точек рецептор - лиганд можно модулировать с помощью антител-агонистов (для костимулирующих путей) или антител-антагонистов (для ингибирующих путей). Таким образом, в отличие от большинства антител, одобренных в настоящее время для лечения рака, антитела, которые блокируют иммунные контрольные точки, нацелены не на опухолевые клетки напрямую, а на рецепторы лимфоцитов или их лиганды, чтобы усилить эндогенную противоопухолевую активность. [См. Pardoll, (April 2012) *Nature Rev. Cancer* 12:252-64].

Примеры иммунных контрольных точек (лигандов и рецепторов), некоторые из которых избирательно активируются в различных типах опухолевых клеток, которые являются кандидатами на блокаду, включают PD1 (белок 1 запрограммированной гибели клеток); PDL1 (лиганд PD1); BTLA (аттенуатор В- и Т-лимфоцитов); CTLA4 (антиген 4, связанный с цитотоксическими Т-лимфоцитами); TIM3 (белок 3 Т-клеточной мембраны); LAG3 (ген активации лимфоцитов 3); TIGIT (Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM); и киллер-ингибирующие рецепторы, которые можно разделить на два класса в зави-

симости от их структурных особенностей: (i) иммуноглобулиноподобные рецепторы клеток-киллеров (KIR) и (ii) рецепторы лектина С-типа (члены семейства трансмембранных рецепторов типа II). В литературе описаны другие менее четко определенные иммунные контрольные точки, включая рецепторы (например, рецептор 2B4 (также известный как CD244)) и лиганды (например, некоторые ингибирующие лиганды семейства B7, такие как B7-H3 (также известный как CD276), и B7-H4 (также известный как B7-S1, B7х и VCTN1)). [См. Pardoll, (April 2012) *Nature Rev. Cancer* 12:252-64].

Настоящее изобретение предполагает использование описанных в настоящем изобретении ингибиторов функции аргиназы в комбинации с ингибиторами вышеупомянутых рецепторов и лигандов иммунных контрольных точек, а также еще не описанных рецепторов и лигандов иммунных контрольных точек. Некоторые модуляторы иммунных контрольных точек в настоящее время доступны, тогда как другие находятся на поздней стадии разработки. Чтобы проиллюстрировать это, при утверждении для лечения меланомы в 2011 году полностью гуманизированное моноклональное антитело CTLA4 ипилимумаб (YERVOY; Bristol-Myers Squibb) стало первым ингибитором иммунной контрольной точки, получившим одобрение регулирующих органов в США. Химерные белки, содержащие CTLA4 и антитело (CTLA4-Ig; абатацепт (ORENCIA; Bristol-Myers Squibb)), использовались для лечения ревматоидного артрита, и было показано, что другие химерные белки эффективны у пациентов с трансплантацией почек, сенсibilизированных к вирусу Эпштейна-Барр. Антитела PD1 находятся в стадии разработки (например, ниволумаб (Bristol-Myers Squibb) и ламбролизумаб (Merck)), а антитела против PDL1 также оцениваются (например, MPDL3280A (Roche)). Ниволумаб показал себя многообещающим при лечении пациентов с меланомой, раком легкого и раком почки.

В одном из аспектов настоящего изобретения заявленные ингибиторы аргиназы комбинируют с иммуноонкологическим агентом, который является (i) агонистом стимулирующего (в том числе костимулирующего) рецептора или (ii) антагонистом ингибирующего (в том числе коингибирующего) сигнала на Т-клетках, оба из которых приводят к усилению антиген-специфических Т-клеточных ответов. Некоторые из стимулирующих и ингибирующих молекул являются членами суперсемейства иммуноглобулинов (IgSF). Одним из важных семейств мембраносвязанных лигандов, которые связываются с костимулирующими или коингибирующими рецепторами, является семейство B7, которое включает B7-1, B7-2, B7-H1 (PD-L1), B7-DC (PD-L2), B7-H2 (ICOS-L), B7-H3, B7-H4, B7-H5 (VISTA) и B7-H6. Другое семейство мембраносвязанных лигандов, которые связываются с костимулирующими или коингибирующими рецепторами, представляет собой семейство молекул TNF, которые связываются с родственными членами семейства рецепторов TNF, включающими CD40 и CD40L, OX-40, OX-40L, CD70, CD27L, CD30, CD30L, 4-1BBL, CD137 (4-1BB), TRAIL/Apo2-L, TRAILR1/DR4, TRAILR2/DR5, TRAILR3, TRAILR4, OPG, RANK, RANKL, TWEAKR/Fn14, TWEAK, BAFFR, EDAR, XEDAR, TACI, APRIL, BCMA, LT13R, LIGHT, DcR3, HVEM, VEGI/TL1A, TRAMP/DR3, EDAR, EDA1, XEDAR, EDA2, TNFR1, лимфотоксин а/TNF13, TNFR2, TNF α , LT13R, лимфотоксин а 1132, FAS, FASL, RELT, DR6, TROY, NGFR.

В другом аспекте иммуноонкологический агент представляет собой цитокин, который ингибирует активацию Т-клеток (например, IL-6, IL-10, TGF- β , VEGF и другие иммуносупрессивные цитокины), или цитокин, который стимулирует активацию Т-клеток, для стимуляции иммунного ответа.

В одном аспекте Т-клеточные ответы можно стимулировать комбинацией описанных ингибиторов аргиназы и одного или нескольких из (i) антагониста белка, который ингибирует активацию Т-клеток (например, ингибиторов иммунной контрольной точки), таких как CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, LAG-3, TIM-3, галектин-9, CEACAM-1, BTLA, CD69, галектин-1, TIGIT, CD113, GPR56, VISTA, 2B4, CD48, GARP, PD1H, LAIR1, TIM-1 и TIM-4, и/или (ii) агониста белка, который стимулирует активацию Т-клеток, такого как B7-1, B7-2, CD28, 4-1BB (CD137), 4-1BBL, ICOS, ICOS-L, OX40, OX40L, GITR, GITRL, CD70, CD27, CD40, DR3 и CD2. Другие агенты, которые можно комбинировать с ингибиторами аргиназы по настоящему изобретению для лечения рака, включают антагонисты ингибиторных рецепторов NK-клеток или агонисты активирующих рецепторов NK-клеток. Например, соединения здесь можно комбинировать с антагонистами KIR, такими как лирилумаб.

Еще одни агенты для комбинированной терапии включают агенты, которые ингибируют или истощают макрофаги или моноциты, включая антагонисты CSF-1R, такие как антагонистические антитела CSF-1R, включая RG7155 (WO 11/70024, WO 11/107553, WO 11/131407, WO 13/87699, WO 13/119716, WO 13/132044) или FPA-008 (WO 11/140249; WO13169264; WO 14/036357), но не ограничиваясь ими.

В другом аспекте описанные ингибиторы аргиназы можно использовать с одним или несколькими агонистическими агентами, которые лигируют положительные костимулирующие рецепторы, блокирующими агентами, которые ослабляют передачу сигналов через ингибирующие рецепторы, антагонистами, и одним или несколькими агентами, которые системно увеличивают частоту противоопухолевых Т-клеток, агентами, которые преодолевают различные иммуносупрессивные пути в микроокружении опухоли (например, блокируют взаимодействие с ингибирующим рецептором (например, взаимодействие PD-L1/PD-1), истощают или ингибируют Treg (например, с использованием моноклональных антител к CD25 (например, даклизумаба) или истощением *ex vivo* с применением анти-CD25 гранул), или обращают/ предотвращают анергию или истощение Т-клеток) и агентами, которые запускают активацию врожденного иммунитета и/или воспаление на участках опухоли.

В одном из аспектов иммуноонкологический агент представляет собой антагонист CTLA-4, такой как антагонистическое CTLA-4 антитело. Подходящие CTLA-4 антитела включают, например, YERVOY (ипилиумаб) или тремелиумаб.

В другом аспекте иммуноонкологический агент представляет собой антагонист PD-1, такой как антагонистическое PD-1 антитело. Подходящие антитела к PD-1 включают, например, OPDIVO (ниволумаб), KEYTRUDA (пембролизумаб) или MEDI-0680 (AMP-514; WO 2012/145493). Иммуноонкологический агент может также включать пидилизумаб (CT-011), хотя его специфичность в отношении связывания PD-1 подвергается сомнению.

Другой подход к нацеливанию на рецептор PD-1 - это рекомбинантный белок, состоящий из внеклеточного домена PD-L2 (B7-DC), слитого с Fc-частью IgG1, называемый AMP-224.

В другом аспекте иммуноонкологический агент представляет собой антагонист PD-L1, такой как антагонистическое PD-L1 антитело. Подходящие антитела к PD-L1 включают, например, MPDL3280A (RG7446; WO 2010/077634), дурвалумаб (MEDI4736), BMS-936559 (WO 2007/005874) и MSB0010718C (WO 2013/79174).

В другом аспекте иммуноонкологический агент представляет собой антагонист LAG-3, такой как антагонистическое LAG-3 антитело. Подходящие антитела к LAG3 включают, например, BMS-986016 (WO 10/19570, WO 14/08218) или IMP-731 или IMP-321 (WO 08/132601, WO 09/44273).

В другом аспекте иммуноонкологический агент представляет собой агонист CD137 (4-1BB), такой как агонистическое CD137 антитело. Подходящие антитела к CD137 включают, например, урелумаб и PF-05082566 (WO 12/32433).

В другом аспекте иммуноонкологический агент представляет собой агонист GITR, такой как агонистическое GITR антитело. Подходящие антитела к GITR включают, например, BMS-986153, BMS-986156, TRX-518 (WO 06/105021, WO 09/009116) и MK-4166 (WO 11/028683).

В другом аспекте иммуноонкологический агент представляет собой агонист OX40, такой как агонистическое антитело к OX40. Подходящие антитела к OX40 включают, например, MEDI-6383 или MEDI-6469.

В другом аспекте иммуноонкологический агент представляет собой антагонист OX40L, такой как антагонистическое антитело к OX40. Подходящие антагонисты OX40L включают, например, RG-7888 (WO 06/029879).

В другом аспекте иммуноонкологический агент представляет собой агонист CD40, такой как агонистическое антитело против CD40. В еще одном варианте осуществления иммуноонкологический агент представляет собой антагонист CD40, такой как антагонистическое антитело против CD40. Подходящие антитела к CD40 включают, например, лукатумумаб или дацетузумаб.

В другом аспекте иммуноонкологический агент представляет собой агонист CD27, такой как агонистическое антитело к CD27. Подходящие антитела к CD27 включают, например, варлилумаб.

В другом аспекте иммуноонкологический агент представляет собой MGA271 (к В7Н3) (WO 11/109400).

Настоящее изобретение включает фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных соединений.

Метаболические и сердечно-сосудистые заболевания.

Настоящее изобретение обеспечивает способы лечения и/или профилактики определенных сердечно-сосудистых и/или связанных с метаболизмом заболеваний, нарушений и состояний, а также нарушений, связанных с ними, с помощью ингибитора аргиназы и по меньшей мере одного дополнительного терапевтического или диагностического агента.

Примеры терапевтических агентов, полезных в комбинированной терапии для лечения гиперхолестеринемии (а также атеросклероза), включают статины (например, CRESTOR, LESCOL, LIPITOR, MEVACOR, PRAVACOL и ZOCOR), которые ингибируют ферментативный синтез холестерина; секвестранты желчных кислот (например, COLESTID, LO-CHOLEST, PREVALITE, QUESTRAN и WELCHOL), которые секвестрируют холестерин и препятствуют его абсорбции; эзетимиб (ZETIA), блокирующий абсорбцию холестерина; фибриновую кислоту (например, TRICOR), которая снижает уровень триглицеридов и может незначительно повысить уровень ЛПВП; ниацин (например, NIACOR), который незначительно снижает холестерин ЛПНП и триглицериды; и/или комбинацию вышеупомянутого (например, VYTORIN (эзетимиб с симвастатином)). Альтернативные способы лечения холестерина, которые потенциально могут быть использованы в комбинации с ингибиторами аргиназы, описанными в настоящем изобретении, включают различные добавки и травы (например, чеснок, поликозанол и гутггул).

Настоящее изобретение охватывает фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных соединений.

Иммунные и воспалительные заболевания.

Настоящее изобретение обеспечивает способы лечения и/или профилактики иммунозависимых заболеваний, нарушений и состояний, и заболеваний, расстройств и состояний, имеющих воспалительный компонент; ингибитором аргиназы и по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим или диагностическим агентом.

Примеры терапевтических агентов, применимых в комбинированной терапии, включают нестероидное противовоспалительное средство (НПВП), такое как аспирин, ибупрофен, и другие производные пропионовой кислоты (алминопрофен, беноксапрофен, буклоксировую кислоту, карпрофен, фенбуфен, фенопрофен, флупрофен, флурбипрофен, индопрофен, кетопрофен, миропрофен, напроксен, оксапрозин, пирпрофен, пранопрофен, супрофен, тиaproфеновую кислоту и тиоксапрофен), производные уксусной кислоты (индометацин, ацетметацин, алклофенак, клиданак, диклофенак, фенклофенак, фенклозиновую кислоту, фентиазак, фуирофенак, ибуфенак, изоксепак, окспинак, сулиндак, тиопинак, толметин, зидометацин и зомепаирак), производные фенаминовой кислоты (флуфенамовую кислоту, меклофенамовую кислоту, мефенамовую кислоту, нифлумовую кислоту и толфенамовую кислоту), производные бифенилкарбоновой кислоты (дифлунисал и флуфенисал), оксикамы (изоксикам, пироксикам, судоксикам и теноксикам), салицилаты (ацетилсалициловую кислоту, сульфасалазин) и пиразолоны (апазон, безпиперилон, фепразон, мофебутазон, оксифенбутазон, фенилбутазон), но не ограничиваются ими.

Другие комбинации включают ингибиторы циклооксигеназы-2 (ЦОГ-2).

Другие активные агенты для комбинации включают стероиды, такие как преднизолон, преднизон, метилпреднизолон, бетаметазон, дексаметазон или гидрокортизон. Такая комбинация может быть особенно полезной, поскольку один или несколько побочных эффектов стероида могут быть уменьшены или даже устранены путем снижения необходимой дозы стероида.

Дополнительные примеры активных агентов, которые можно использовать в комбинациях для лечения, например, ревматоидного артрита, включают противовоспалительное лекарственное средство (средства), подавляющее цитокины (CSAID); антитела или антагонисты других цитокинов человека или факторов роста, например, TNF, LT, IL-10, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, EMAP-II, GM-CSF, FGF или PDGF.

Конкретные комбинации активных агентов могут интерферировать в различных точках аутоиммунного и последующего воспалительного каскада и включают антагонисты TNF, такие как химерные, гуманизированные или человеческие антитела к TNF, REMICADE, фрагменты антител против TNF (например, CDP870) и растворимые рецепторы TNF p55 или p75, их производные, p75TNFR1gG (ENBREL) или p55TNFR1gG (LENERCEPT), растворимый рецептор IL-13 (sIL-13), а также ингибиторы TNF α -превращающего фермента (TACE); аналогичным образом могут быть эффективны ингибиторы IL-1 (например, ингибиторы фермента, превращающего интерлейкин-1).

Другие комбинации включают интерлейкин 11, анти-P7s и гликопротеиновый лиганд p-селектина (PSGL).

Другие примеры агентов, которые можно использовать в комбинации с описанными в настоящем изобретении ингибиторами аргиназы, включают интерферон-131a (AVONEX); интерферон-131b (BETASERON); копаксон; гипербарический кислород; внутривенный иммуноглобулин; клабрибин; и антитела или антагонисты других человеческих цитокинов или факторов роста (например, антитела к лиганду CD40 и CD80).

Заболевания, обусловленные микроорганизмами.

Настоящее изобретение обеспечивает способы лечения и/или профилактики вирусных, бактериальных, грибковых и паразитарных заболеваний, нарушений и состояний, а также нарушений, связанных с ними, с помощью ингибитора аргиназы и по меньшей мере одного дополнительного терапевтического или диагностического агента (например, одного или нескольких других противовирусных средств и/или одно или несколько средств, не связанных с противовирусной терапией).

Такая комбинированная терапия включает противовирусные агенты, нацеленные на различные стадии жизненного цикла вируса и имеющие разные механизмы действия, включая ингибиторы декапсидации вируса (например, амантадин и ремантидин); ингибиторы обратной транскриптазы (например, ацикловир, зидовудин и ламивудин); агенты, нацеленные на интегразу; агенты, блокирующие прикрепление факторов транскрипции к вирусной ДНК; агенты (например, антисмысловые молекулы), влияющие на трансляцию (например, фомивирсен); агенты, которые модулируют трансляцию/функцию рибозима; ингибиторы протеаз; модуляторы сборки вируса (например, рифампицин); антиретровирусные препараты, такие как, например, нуклеозидные аналоги ингибиторов обратной транскриптазы (например, азидотимидин (AZT), ddI, ddC, 3TC, d4T); ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (например, эфавиренц, невирапин); нуклеотидные аналоги ингибиторов обратной транскриптазы; и агенты, предотвращающие высвобождение вирусных частиц (например, занамивир и осельтамивир), но не ограничиваясь ими. Лечение и/или профилактика определенных вирусных инфекций (например, ВИЧ) часто включает группу ("коктейль") противовирусных агентов.

Другие противовирусные агенты, предназначенные для использования в комбинации с ингибитором аргиназы, включают абакавир, адефовир, амантадин, ампренавир, амплиген, арбидол, атазанавир, атрипла, боцепревиретет, цидофовир, комбивир, дарунавир, делавирдин, диданозин, докозанол, эдоксудин, эмтрицитабин, энфувиртид, энтекавир, фамцикловир, фосампренавир, фоскарнет, фосфонет, http://en.wikipedia.org/wiki/Fusion_inhibitor ганцикловир, ибацитабин, имуновир, идоксуридин, имиквимод, индинавир, инозин, различные интерфероны (например, пегинтерферон альфа-2a), лопинавир, ловирид, маравирок, мороксидин, метисазон, нелфинавир, нексавир, пенцикловир, перамивир, плеконарил,

подофиллотоксин, ралтегравир, рибавирин, ритонавир, пираимидин, саквинавир, ставудин, теллапревир, тенофовир, типранавир, трифлуридин, тризивир, тромантадин, трувада, валацикловир, валганцикловир, викривирок, видарабин, вирамидин и зальцитабин, но не ограничиваются ими.

Настоящее изобретение предполагает использование описанных в настоящем изобретении ингибиторов функции аргиназы в комбинации с противопаразитарными средствами. Такие агенты включают тиабендазол, пирантела памоат, мебендазол, празиквантел, никлозамид, битионол, оксамнихин, метрифонат, ивермектин, альбендазол, эфлорнитин, меларсопрол, пентамидин, бензнидазол, нифуртимокс и нитроимидазол, но не ограничиваются ими. Квалифицированному специалисту известны другие агенты, которые могут найти применение для лечения паразитарных заболеваний.

Варианты осуществления настоящего изобретения предполагают использование описанных в настоящем изобретении ингибиторов аргиназы в комбинации с агентами, полезными для лечения или профилактики бактериальных заболеваний. Антибактериальные агенты можно классифицировать по-разному, в том числе по механизму действия, по химической структуре и по спектру активности. Примеры антибактериальных агентов включают те, которые нацелены на клеточную стенку бактерий (например, цефалоспорины и пенициллины) или на клеточную мембрану (например, полимиксины), или интерферируют с основными бактериальными ферментами (например, сульфониамиды, рифамицины и хинолины). Большинство антибактериальных агентов, нацеленных на синтез белка (например, тетрациклины и макролиды), являются бактериостатическими, тогда как такие агенты, как аминогликозид, являются бактерицидными.

Другой способ классификации антибактериальных средств основан на их целевой специфичности; агенты "узкого спектра" нацелены на определенные типы бактерий (например, грамположительные бактерии, такие как *Streptococcus*), тогда как агенты "широкого спектра" обладают активностью против более широкого круга бактерий. Специалисту в данной области техники известны типы антибактериальных агентов, которые подходят для использования при конкретных бактериальных инфекциях.

Варианты осуществления настоящего изобретения предполагают использование описанных в настоящем изобретении ингибиторов аргиназы в комбинации с агентами, полезными для лечения или профилактики грибковых заболеваний. Противогрибковые агенты включают полиены (например, амфотерицин, нистатин и пимарицин); азолы (например, флуконазол, итраконазол и кетоконазол); аллиламины (например, нафтифин и тербинафин) и морфолины (например, аморолфин); и антиметаболиты (например, 5-фторцитозин).

Настоящее изобретение охватывает фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные агентов (и членов классов агентов), изложенных выше.

Дозирование.

Ингибиторы аргиназы по настоящему изобретению можно применять у субъекта в количестве, которое зависит, например, от цели введения (например, от необходимой степени разрешения); возраста, массы тела, пола, а также здоровья и физического состояния субъекта, у которого применяют состав; от способа введения; и характера заболевания, расстройства, состояния или его симптома. Режим дозирования может также учитывать наличие, природу и степень любых побочных эффектов, связанных с применяемым агентом (агентами). Эффективные количества доз и режимы дозирования могут быть легко определены, например, из исследований безопасности и увеличения дозы, исследований *in vivo* (например, моделей на животных) и других методов, известных специалисту в данной области техники.

В общем, параметры дозирования диктуют, что количество дозировки должно быть меньше количества, которое может быть необратимо токсичным для субъекта (максимальная переносимая доза (MTD)), и не меньше количества, необходимого для оказания измеримого эффекта у субъекта. Такие количества определяются, например, фармакокинетическими и фармакодинамическими параметрами, связанными с АРМЭ, принимая во внимание путь введения и другие факторы.

Эффективная доза (ED) представляет собой дозу или количество агента, которые вызывают терапевтический ответ или необходимый эффект у некоторой части субъектов, принимающих его. "Средняя эффективная доза" или ED₅₀ агента представляет собой дозу или количество агента, которые вызывают терапевтический ответ или необходимый эффект у 50% популяции, которой его вводят. Хотя ED₅₀ обычно используется как мера разумного ожидания эффекта агента, это не обязательно доза, которую врач может признать подходящей с учетом всех соответствующих факторов. Таким образом, в некоторых ситуациях эффективное количество превышает рассчитанную ED₅₀, в других ситуациях эффективное количество меньше, чем рассчитанная ED₅₀, а в еще других ситуациях эффективное количество равно рассчитанной ED₅₀.

Кроме того, эффективная доза ингибиторов аргиназы по настоящему изобретению может представлять собой количество, которое при применении у субъекта в одной или нескольких дозах дает необходимый результат по сравнению со здоровым субъектом. Например, для субъекта, страдающего конкретным расстройством, эффективная доза может быть такой, которая улучшает диагностический параметр, показатель, маркер и т.п. этого расстройства по меньшей мере примерно на 5, по меньшей мере примерно на 10, по меньшей мере примерно на 20, по меньшей мере примерно на 25, по меньшей мере примерно на 30, по меньшей мере примерно на 40, по меньшей мере примерно на 50, по меньшей мере пример-

но на 60, по меньшей мере примерно на 70, по меньшей мере примерно на 80, по меньшей мере примерно на 90, или более чем на 90%, где 100% определяется как диагностический параметр, показатель, маркер и т.п., демонстрируемые нормальным субъектом.

В некоторых вариантах осуществления ингибиторы аргиназы, предусмотренные настоящим изобретением, можно применять (например, перорально) при уровнях доз примерно от 0,01 до 50 или примерно от 1 до 25 мг/кг массы тела субъекта в сутки, один или несколько раз в сутки для получения необходимого терапевтического эффекта.

Для применения перорального средства композиции могут быть предоставлены в форме таблеток, капсул и т.п., содержащих от 1,0 до 1000 мг активного ингредиента, в частности 1,0; 3,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 50,0; 75,0; 100,0; 150,0; 200,0; 250,0; 300,0; 400,0; 500,0; 600,0; 750,0; 800,0; 900,0 и 1000,0 мг активного ингредиента.

В некоторых вариантах осуществления доза необходимого ингибитора аргиназы содержится в "стандартной лекарственной форме". Фраза "стандартная лекарственная форма" относится к физически дискретным единицам, где каждая единица содержит заранее определенное количество ингибитора аргиназы, либо одного, либо в комбинации с одним или несколькими дополнительными агентами, достаточное для получения необходимого эффекта. Следует понимать, что параметры стандартной лекарственной формы будут зависеть от конкретного агента и эффекта, который должен быть достигнут.

Наборы.

Настоящее изобретение также предполагает наборы, содержащие описанное в настоящем изобретении соединение, и его фармацевтические композиции. Наборы обычно имеют форму физической структуры, содержащей различные компоненты, как описано ниже, и могут использоваться, например, при практическом применении описанных выше способов.

Набор может включать одно или несколько соединений, описанных в настоящем изобретении (предоставленных, например, в стерильном контейнере), которые могут быть в форме фармацевтической композиции, подходящей для применения у субъекта. Описанные в настоящем изобретении соединения могут быть представлены в форме, готовой к применению (например, в таблетке или капсуле), или в форме, требующей, например, восстановления или разбавления (например, порошка) перед введением. Когда соединения, описанные в настоящем изобретении, находятся в форме, которую необходимо восстановить или разбавить пользователем, набор может также включать разбавители (например, стерильную воду), буферы, фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества и т.п., упакованные вместе с соединениями, описанными в настоящем изобретении, или отдельно от них. Когда предполагается комбинированная терапия, набор может содержать несколько агентов по отдельности, или они могут быть уже объединены в наборе. Каждый компонент набора может быть заключен в отдельный контейнер, и все различные контейнеры могут находиться в одной упаковке.

Набор по настоящему изобретению может быть разработан для условий, необходимых для надлежащего обслуживания содержащихся в нем компонентов (например, охлаждения или замораживания).

Набор может содержать этикетку или вкладыш в упаковку, включающие идентифицирующую информацию для входящих в него компонентов и инструкции по их применению (например, параметры дозирования, клиническую фармакологию активного ингредиента (ингредиентов), включая механизм действия, фармакокинетику и фармакодинамику, нежелательные явления, противопоказания и др.).

Этикетки или вкладыши могут включать информацию о производителе, такую как номера партий и сроки годности.

Этикетка или упаковочный вкладыш могут быть, например, интегрированы в физическую структуру, в которой находятся компоненты, могут содержаться отдельно в физической структуре или быть прикреплены к компоненту набора (например, к ампуле, пробирке или флакону).

Этикетки или вкладыши могут дополнительно включать, или быть встроенными в машиночитаемый носитель, такой как диск (например, жесткий диск, карта, диск памяти), оптический диск, такой как CD- или DVD-ROM/RAM, DVD, MP3, магнитная лента или электрические носители данных, такие как RAM и ROM, или их гибриды, такие как магнитные/оптические носители данных, флэш-носители или карты памяти.

В некоторых вариантах осуществления настоящие инструкции отсутствуют в наборе, но предусмотрены средства для получения инструкций из удаленного источника, например, через Интернет.

Экспериментальный раздел.

Следующие примеры приведены для того, чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание того, как создать и использовать настоящее изобретение, и не предназначены для ограничения объема того, что изобретатели считают своим изобретением, и не предназначены для демонстрации того, что нижеуказанные эксперименты были выполнены, или что это все эксперименты, которые могут быть выполнены. Следует понимать, что примерные описания, изложенные в настоящем времени, не обязательно выполнялись, но, скорее, описания могут выполняться для генерации данных и тому подобного, описанного в них характера. Были предприняты усилия для обеспечения точности используемых чисел (например, количества, температуры и т.д.), но следует учитывать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения.

Если не указано иное, части являются массовыми частями, молекулярная масса представляет собой средневзвешенную молекулярную массу, температура указана в градусах Цельсия (°C), а давление равно или близко к атмосферному. Используются стандартные сокращения, включая следующие: wt=дикий тип; bp=пара (пары) оснований; kb=тысячи пар оснований; nt=нуклеотиды; aa=аминокислота (аминокислоты); s или sec=секунда (с); min=минута (с); h или hr=час (с); ng=нанограмм; мкг=микрограмм; мг=миллиграмм; г=грамм; кг=килограмм; dl или dL=децилитр; µl или µL=микролитр; ml или mL=миллилитр; l или L=литр; µM=микромольный; mM=миллимольный; M=мольный; кДа=килодальтон; i.m.=внутримышечно; i.p.=интраперитонеально; SC или SQ=подкожно; QD=ежедневно; BID=два раза в сутки; QW=еженедельно; QM=ежемесячно; ВЭЖХ=высокоэффективная жидкостная хроматография; BW=масса тела; U=единица измерения; ns=статистически не значимо; ФБР=физиологический раствор с фосфатным буфером; ИГХ=иммуногистохимия; DMEM=среда Игла в модификации Дульбеко; ЭДТА=этилендиаминтетрауксусная кислота.

Материалы и методы.

Были использованы следующие общие материалы и методы, если указано, или могут быть использованы в приведенных ниже примерах.

Стандартные методы молекулярной биологии описаны в научной литературе (см., например, Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; and Ausubel, et al. (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols. 1-4, John Wiley and Sons, Inc. New York, N.Y., где описано клонирование в бактериальных клетках и мутагенез ДНК (том 1), клонирование в клетках млекопитающих и дрожжах (том 2), гликоконъюгаты и экспрессия белков (том 3) и биоинформатика (том 4)).

В научной литературе описаны методы очистки белков, включая иммунопреципитацию, хроматографию, электрофорез, центрифугирование и кристаллизацию, а также химический анализ, химическую модификацию, посттрансляционную модификацию, производство гибридных белков и гликозилирование белков (см., например, Coligan, et al. (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vols. 1-2, John Wiley and Sons, Inc., NY).

Доступны пакеты программного обеспечения и базы данных для определения, например, антигенных фрагментов, лидерных последовательностей, фолдинга белков, функциональных доменов, сайтов гликозилирования и выравнивания последовательностей (см., например, GCG Wisconsin Package (Accelrys, Inc., San Diego, CA); и DeCypher™ (TimeLogic Corp., Crystal Bay, NV)).

Литература изобилует анализами и другими экспериментальными методами, которые могут служить основой для оценки описанных в настоящем изобретении соединений. В качестве примера, основанные на масс-спектрометрии анализы связывания лигандов (см., например, Massink, A. et al. *Purinergic Signaling* (2015) 11: 581. <https://doi.org/10.1007/s11302-015-9477-0>; Dionisotti S. et al., *J. Pharmacol Exp Ther.* (1996) 298: 726-732) можно использовать для определения различных свойств соединений по настоящему изобретению.

Функциональные анализы также могут быть использованы для оценки соединений по настоящему изобретению.

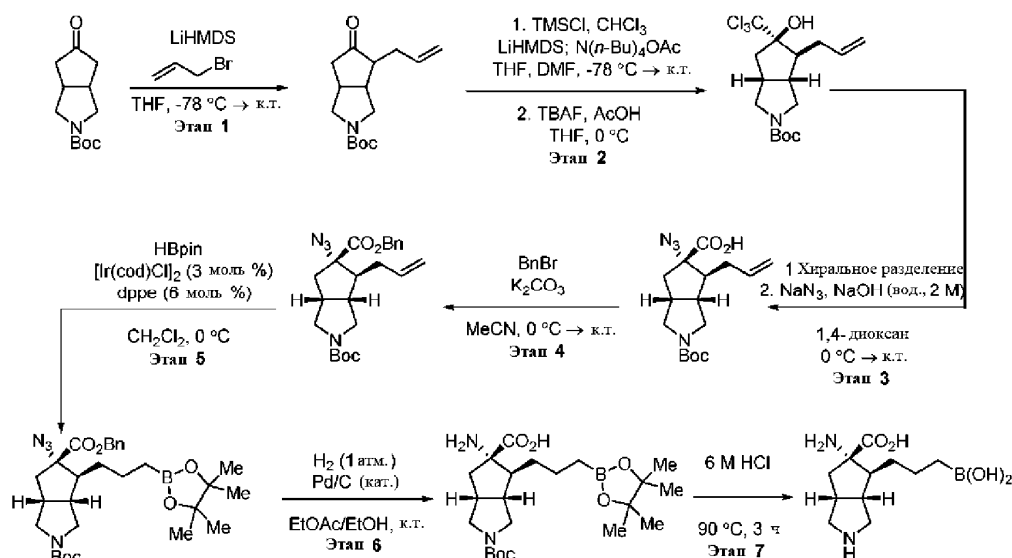
Примеры

Общие методы.

Специалисты в данной области поймут, что существует множество доступных способов получения молекул, представленных в формуле изобретения.

Различные способы, описанные выше, были использованы для получения соединений по изобретению, некоторые из которых проиллюстрированы в примерах. Дейтерированные формы приведенных ниже примеров можно синтезировать с использованием соответствующих дейтерированных промежуточных продуктов.

Пример 1. (3aR,4S,5S,6aR)-5-амино-4-[3-(дигидроксиборанил)пропил]октагидроциклопента[с]пиррол-5-карбоновая кислота.



Этап 1. К раствору цис-трет-бутил-5-оксогексагидроциклопента[с]пиррол-2(1H)-карбоксилата (11,49 г; 51 ммоль) в безводном THF (тетрагидрофуране) (155 мл) при -78°C добавляли раствор лития бис(триметилсилил)амида (61,2 мл; 1,0 М в THF) по каплям в течение 20 мин. После перемешивания в течение дополнительных 30 мин по каплям в течение 15 мин добавляли раствор аллилбромид (5,3 мл; 61,2 ммоль) в THF (15 мл). После завершения добавления холодную баню удаляли, и смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 12 ч, после чего ее выливали в воду/EtOAc (этилацетат), и разделяли слои. Водный слой дважды экстрагировали EtOAc. Объединенные органические слои промывали 1 М водным раствором HCl, рассолом, сушили над MgSO₄ и фильтровали. Неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией (SiO₂, CH₂Cl₂/гексаны (1:1)→CH₂Cl₂/гексаны (1:1)/EtOAc, 3:1), получая продукт аллилирования в виде бесцветного масла (4,74 г; выход 35%). Результаты ЭРИ-МС [M-iBu + H]⁺ для C₁₁H₁₆NO₃, рассчитано 210,1; обнаружено 210,0.

Этапы 2-4. К раствору безводного хлороформа (3,55 мл; 44,65 ммоль) и хлортриметилсилана (4,3 мл; 33,9 ммоль) в безводном THF (40,6 мл) при -78°C добавляли раствор лития бис(триметилсилил)амида (33,9 мл; 1,0 М в THF) по каплям в течение 30 мин. После дополнительных 30 мин при -78°C холодную баню заменяли на баню при -30°C. Одновременно раствор кетона с этапа 1 (4,74 г; 17,86 ммоль) в безводном DMF (диметилформамиде) (12,8 мл) и раствор тетрабутиламмония аммония (538 мг; 1,79 ммоль) в безводном DMF (1,28 мл) добавляли к реакционной смеси в течение 15 мин. Холодную баню удаляли и перемешивали в течение дополнительных 2 ч при температуре окружающей среды перед анализом отсутствия исходного кетона с помощью ТСХ (гексаны/CH₂Cl₂/EtOAc 3:3:1; окраска нингидрином). Затем реакционную смесь выливали в насыщенный водный раствор хлорида аммония и экстрагировали гексаном (3 × 250 мл). Объединенные органические слои промывали рассолом, сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали. Полученный неочищенный остаток использовали на следующем этапе как таковой. К раствору неочищенного силилового эфира в безводном THF (45 мл) при температуре 0°C добавляли уксусную кислоту (1,02 мл; 17,86 ммоль), а затем раствор тетрабутиламмония фторида (17,86 мл; 1 М в THF) по каплям в течение 15 мин. Смесь перемешивали еще 10 мин, выливали в ледяной раствор бикарбоната натрия (150 мл) и экстрагировали EtOAc (3×150 мл). Объединенные органические слои промывали рассолом, сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали. Рацемический продукт можно разделить на энантиомеры с использованием хиральной колонки (Chiralpak-AD; 3,5% i-PrOH в гексане), причем второй пик представляет собой необходимый энантиомер. ЭРИ-МС [M-iBu+H]⁺ для C₁₂H₁₇Cl₃NO₃, рассчитано 328,0 и 330,0; обнаружено 328,0 и 330,0.

К раствору третичного спирта в 1,4-диоксане (30 мл) при температуре 15°C добавляли предварительно охлажденный раствор азид натрия (3,5 г; 53,6 ммоль) и гидроксида натрия (2,14 г; 53,6 ммоль) в воде (26,8 мл) по каплям в течение 30 мин. Полученную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 часов, выливали в насыщенный водный раствор хлорида аммония (100 мл), а затем экстрагировали EtOAc (3×150 мл). Объединенные органические слои промывали рассолом, сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали. Полученный неочищенный остаток использовали на следующей стадии как таковой. ЭРИ-МС [M-H] для C₁₆H₂₃N₄O₄, рассчитано 335,2; обнаружено 335,0.

К неочищенной карбоновой кислоте и карбонату калия (12,3 г; 89,3 ммоль) в безводном ацетонитриле (45 мл) при 0°C добавляли бензилбромид (2,3 мл; 19,65 ммоль). Полученную смесь интенсивно перемешивали при комнатной температуре в течение 16 ч, после чего летучие вещества удаляли роторным испарением. К твердому остатку добавляли гексаны и воду, а затем два слоя разделяли. Водный слой экстрагировали гексаном (2×150 мл). Объединенные органические слои промывали рассолом, сушили над MgSO₄, фильтровали и концентрировали. Неочищенный остаток очищали с помощью колоночной

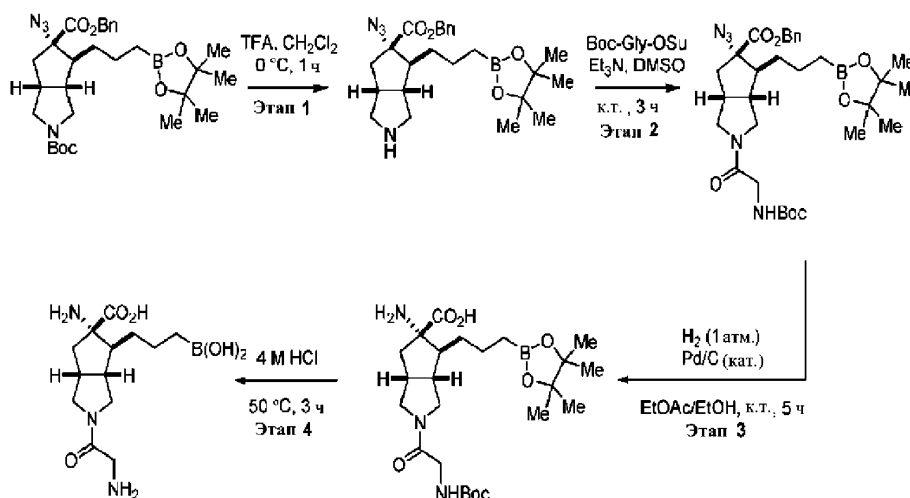
хроматографии (SiO_2 , гексаны \rightarrow гексаны/ EtOAc , 3:1), получая промежуточный бензиловый эфир в виде бесцветного масла (2,41 г; 35% за четыре стадии). ЭРИ-МС $[\text{M-iBu+H}]^+$ для $\text{C}_{19}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_4$, рассчитано 371,2; обнаружено 371,0.

Этап 5. Раствор алкена (2,41 г; 5,65 ммоль) в дихлорметане (15 мл) дегазировали (3 цикла вакуума/заполнения N_2). К этому раствору добавляли бис(1,5-циклооктадиен) диридия(I) дихлорид (114 мг; 0,1695 ммоль) и 1,2-бис(дифенилфосфино)этан (135 мг; 0,339 ммоль), и полученную смесь дегазировали второй раз (3 цикла вакуума/заполнения N_2). После выдерживания в течение 20 мин смесь охлаждали до 0°C и через шприцевой насос добавляли предварительно дегазированный раствор пинаколборана (1,1 мл; 7,91 ммоль) в дихлорметане (5 мл) в течение 1,5 ч. Холодную баню удаляли, и реакционную смесь перемешивали еще 25 мин при комнатной температуре, после чего ее снова охлаждали до 0°C , разбавляли дихлорметаном (100 мл) и добавляли воду (30 мл). После перемешивания в течение 15 мин слои разделяли, и водный слой экстрагировали дихлорметаном (2×100 мл). Объединенные органические слои промывали рассолом, сушили над MgSO_4 , фильтровали и концентрировали. Полученный неочищенный остаток очищали колоночной хроматографией (SiO_2 , гексаны \rightarrow гексаны/ EtOAc , 6:1), выделяя бесцветное масло (2,59 г; выход 83%). $^1\text{H-NMR}$: (400 МГц; CDCl_3) δ 7,37 (s; 5H); 5,21 (d; $J=3,1$ Гц; 2H); 3,46 - 3,21 (m; 3H); 2,94 - 2,79 (m; 1H); 2,60 - 2,41 (m; 2H); 1,95 - 1,85 (m; 1H); 1,80 - 1,70 (m; 1H); 1,48 - 1,33 (m; 12H); 1,29 - 1,08 (m; 14H); 0,73 - 0,62 (m; 2H), ЭРИ-МС $[\text{M-N}_2\text{-iBu+H}_2+\text{Na}]^+$ для $\text{C}_{25}\text{H}_{37}\text{BN}_2\text{O}_6\text{Na}$; рассчитано 495,3; обнаружено 495,2.

Этап 6. К азидобензиловому эфиру (700 мг; 1,26 ммоль) в смеси 1:1 безводного этанола (2,1 мл) и этилацетата (2,1 мл) в атмосфере азота добавляли Pd/C (90 мг; 0,126 ммоль, 15%). Атмосферу заменяли водородом (барботированием раствора в течение 5 мин) и перемешивали под баллоном водорода в течение 3 ч. Атмосферу водорода заменяли N_2 , реакционную смесь осторожно фильтровали через целит, а затем промывали этанолом (2×5 мл). Объем растворителя уменьшали примерно до 2 мл и фильтровали через шприц-фильтр с размером пор 0,22 мкм. Растворитель удаляли, получая неочищенное промежуточное аминокислотное соединение (390 мг) в виде почти белого твердого вещества. ЭРИ-МС $[\text{M-iBu+H}]^+$ для $\text{C}_{18}\text{H}_{32}\text{BN}_2\text{O}_6$, рассчитано 383,2; обнаружено 383,2.

Этап 7. Водный раствор HCl (3,0 мл; 6,0 M) добавляли к промежуточному аминокислотному соединению (продукт этапа 6; 380 мг; 0,867 ммоль). Реакционный сосуд герметично закрывали, нагревали до 90°C и перемешивали при этой температуре в течение 3 ч. Растворитель удаляли в вакууме, добавляли воду (примерно 10 мл) и снова удаляли в вакууме для уменьшения количества остаточной HCl. Полученное твердое вещество грязно-белого цвета растворяли в воде (примерно 5 мл) и очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ (колонокка RediSep C18 Gold, градиент ацетонитрила от 0 до 20% и воды с 0,1% добавкой TFA (трифторуксусной кислоты)) с получением продукта в виде белого твердого вещества. Этот материал превращали в бис-гидрохлоридную соль добавлением 1 M HCl и последующей лиофилизацией (повторенной дважды) с получением соединения с полностью снятой защитой в виде белого твердого вещества (160 мг, выход 56%). $^1\text{H-NMR}$ (400 МГц, D_2O) δ 3,56 (dd; $J=12,2$; 8,5 Гц; 1H); 3,47 (dd; $J=11,8$; 8,3 Гц; 1H); 3,39 - 3,29 (m; 1H); 3,24 (dd; $J=12,2$; 4,6 Гц; 1H); 3,17 (dd; $J=11,9$; 5,6 Гц; 1H); 3,00 - 2,87 (m; 1H); 2,68 (dd; $J=13,7$; 8,9 Гц; 1H); 2,15 - 2,05 (m; 1H); 1,82 (dd; $J=13,6$; 9,2 Гц; 1H); 1,66 - 1,52 (m; 1H); 1,50 - 1,40 (m; 1H); 1,39 - 1,24 (m; 2H); 0,82 - 0,70 (m; 2H), ЭРИ-МС $[\text{M-H}_2\text{O+H}]^+$ для $\text{C}_{11}\text{H}_{20}\text{BN}_2\text{O}_3$; рассчитано 239,2; обнаружено 239,0.

Пример 2. 5-Амино-2-(2-аминоацетил)-4-[3-(дигидроксисборанил)пропил]октагидроциклопента[с]пиррол-5-карбоновая кислота.



Этап 1. α -Азидобензиловый эфир (0,40 г; 0,72 ммоль; 1,0 эквив.) растворяли в CH_2Cl_2 (5,8 мл) и охлаждали до 0°C . По каплям в течение 15 мин добавляли TFA (1,44 мл; 18,0 ммоль; 25,0 эквив.), и реакци-

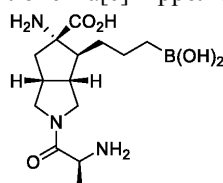
онную смесь перемешивали при 0°C в течение 1 ч. По завершении реакцию смесь разбавляли CH_2Cl_2 и промывали насыщенным водным раствором NaHCO_3 . Водный слой экстрагировали CH_2Cl_2 (3×20 мл). Объединенные органические экстракты промывали рассолом, сушили (Na_2SO_4), фильтровали и концентрировали роторным испарением с получением аминного продукта в виде желтого масла (0,32 г; выход 99%), который переносили на следующий этап без дополнительной очистки. ЭРИ-МС $[\text{M}+\text{H}]^+$ для $\text{C}_{24}\text{H}_{36}\text{BN}_4\text{O}_4$, рассчитано 455,3; обнаружено 455,2.

Этап 2. Амин (продукт этапа 1) (0,32 г; 0,72 ммоль; 1,0 эквив.) растворяли в DMSO (диметилсульфоксиде) (3,6 мл) и обрабатывали Et_3N (триэтиламин) (0,3 мл; 2,2 ммоль; 3,0 эквив.). Затем добавляли Вос-глицин N-гидроксисукцинимид эфир (0,24 г; 0,86 ммоль; 1,2 эквив.) в виде твердого вещества, и реакцию смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 4 ч. Затем реакцию гасили насыщенным водным раствором NH_4Cl и разбавляли EtOAc . Смесь экстрагировали EtOAc (3×20 мл). Объединенные органические экстракты промывали рассолом, сушили (Na_2SO_4), фильтровали и концентрировали роторным испарением, получая неочищенный продукт. Очистка флэш-хроматографией на диоксиде кремния (0% → 60% EtOAc в гексанах) дала глицинамид в виде желтого масла (0,34 г; выход 77%). ЭРИ-МС $[\text{M}-\text{Woc}+2\text{H}]^+$ для $\text{C}_{26}\text{H}_{39}\text{BN}_5\text{O}_5$, рассчитано 512,4; обнаружено 512,4.

Этап 3. К α -азидобензиловому эфиру (продукту этапа 2) (0,34 г; 0,56 ммоль) в смеси 1:1 безводного этанола (1,5 мл) и этилацетата (1,5 мл) в атмосфере азота добавляли 10% палладий на углероде (115 мг, 0,11 ммоль). Атмосферу заменяли водородом (барботированием раствора в течение 10 мин) и перемешивали под баллоном водорода в течение 3 ч. Атмосферу водорода заменяли N_2 , реакцию смесь осторожно фильтровали через слой целита и затем промывали этанолом (2×5 мл). Объем растворителя уменьшали примерно до 10 мл и фильтровали через шприцевой фильтр с размером пор 0,22 мкм. Растворитель удаляли, чтобы получить неочищенное промежуточное аминокислотное соединение (0,16 г) в виде почти белого твердого вещества. ЭРИ-МС $[\text{M}+\text{H}]^+$ для $\text{C}_{24}\text{H}_{43}\text{BN}_3\text{O}_7$, рассчитано 496,3; обнаружено 496,3.

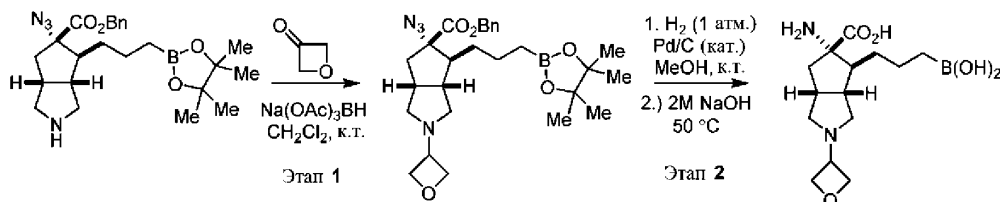
Этап 4. Водный раствор HCl (3,0 мл; 4,0 М) добавляли к промежуточному аминокислотному соединению (продукт этапа 3; 0,16 г; 0,87 ммоль). Реакционный сосуд герметично закрывали, нагревали до 50°C и перемешивали в течение 2 ч. Неочищенный продукт затем непосредственно очищали обращенно-фазовой ВЭЖХ (колонка RediSep C18 Gold, градиент ацетонитрила и воды от 0 до 20%), получая продукт в виде белого твердого вещества. Последующая лиофилизация дала соединение с полностью снятой защитой в виде белого твердого вещества (45 мг, выход 25% за две стадии). ^1H -ЯМР (400 МГц, D_2O) δ 4,01 - 3,82 (m; 2H); 3,71 - 3,57 (m; 2H); 3,52 - 3,34 (m; 2H); 3,30 - 3,10 (m; 1H); 2,92 - 2,71 (m; 1H); 2,67 (m; 1H); 2,10 - 1,96 (m; 1H); 1,77 (dt; $J=13,9$; 7,1 Гц; 1H); 1,61 - 1,25 (m; 4H); 0,78 (t; $J=6,5$ Гц; 2H), ЭРИ-МС $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ для $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{BN}_3\text{O}_4$; рассчитано 296,2; обнаружено 296,1.

Пример 3. (3aR,4S,5S,6aR)-5-амино-2-[(2S)-2-аминопропаноил]-4-[3-(дигидроксисборанил)пропил]октагидроциклопента[с]пиррол-5-карбоновая кислота.



Указанное в заголовке соединение синтезировали, следуя той же экспериментальной методике, которая описана в примере 2. ^1H -ЯМР (400 МГц, D_2O) δ 4,38 - 4,26 (m; 1H); 3,88 - 3,65 (m; 3H); 3,62 - 3,35 (m; 2H); 3,28 - 3,10 (m; 1H); 2,95 - 2,75 (m; 1H); 2,68 (ddd; $J=14,1$; 10,0; 6,3 Гц; 1H); 2,12 - 1,93 (m; 1H); 1,89 - 1,65 (m; 1H); 1,64 - 1,23 (m; 6H); 0,87-0,70 (m; 2H), ЭРИ-МС $[\text{M}-\text{H}_2\text{O}+\text{H}]^+$ для $\text{C}_{14}\text{H}_{25}\text{BN}_3\text{O}_4$; рассчитано 310,1; обнаружено 310,0.

Пример 4. 5-Амино-4-[3-(дигидроксисборанил)пропил]-2-(оксетан-3-ил)октагидроциклопента[с]пиррол-5-карбоновая кислота.

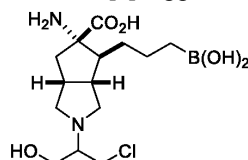


Этап 1. α -Азидобензиловый эфир (0,44 г; 0,77 ммоль) растворяли в CH_2Cl_2 (10 мл) и добавляли 3-оксетанон (55 мг; 0,77 ммоль) с последующим добавлением твердого $\text{Na}(\text{OAc})_3\text{BH}$ (326 мг; 1,54 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, затем гасили насыщенным раствором NaHCO_3 (2×10 мл). Органический слой сушили над MgSO_4 , фильтровали и упаривали, получая сырой продукт, который использовали без дополнительной очистки.

Этап 2. Неочищенный материал с этапа 1 растворяли в MeOH (5 мл), продували N_2 и добавляли 10%

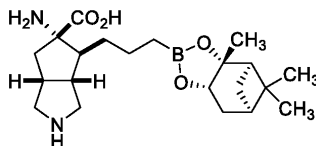
Pd/C (200 мг, 50% влажность). Смесь интенсивно перемешивали в атмосфере H₂ (баллон) в течение 2 ч или до тех пор, пока анализ ЖХ-МС не показал полный расход исходного материала. Реакционную смесь фильтровали, упаривали и остаток перемешивали с 2М NaOH (2 мл) при 50°C в течение 1 ч, затем охлаждали до комнатной температуры и нейтрализовали 1М HCl. Продукт очищали обращенно-фазовой С18-хроматографией (градиент ацетонитрила и воды от 0 до 20%), получая продукт в виде белого твердого вещества (10 мг, 3%). ¹H-ЯМР (400 МГц, D₂O) δ 4,87 - 4,81 (m; 2H); 4,41 - 4,32 (m; 1H); 4,03 - 3,68 (m; 1H); 3,60 - 3,05 (m; 4H); 2,90 - 2,75 (m; 2H); 2,52 - 2,43 (m; 1H); 2,05 - 1,90 (m; 1H); 1,77 - 1,64 (m; 1H); 1,48 - 1,39 (m; 1H); 1,32 - 1,04 (m; 4H); 0,66-0,59 (m; 2H), ЭРИ-МС [M-H₂O+H]⁺ для C₁₄H₂₄BN₂O₄; рассчитано 295,2; обнаружено 295,2.

Пример 5. 5-амино-2-(1-хлор-3-гидроксипропан-2-ил)-4-[3-(дигидроксисборанил)пропил]октагидроциклопента[с]пиррол-5-карбоновая кислота.



Указанное в заголовке соединение синтезировали в соответствии с той же экспериментальной процедурой, которая описана в примере 4, но вместо этого в конечном растворе для снятия защиты использовали 3М раствор HCl. ¹H-ЯМР (400 МГц, D₂O) δ 4,05 - 3,80 (m; 5H); 3,64 - 3,51 (m; 2H); 3,26 - 2,95 (m; 3H); 2,85 - 2,72 (m; 1H); 2,52 - 2,40 (m; 1H); 2,13 - 2,03 (m; 1H); 1,81 - 1,70 (m; 1H); 1,50 - 1,41 (m; 1H); 1,46 - 1,05 (m; 3H); 0,69-0,59 (m; 2H), ЭРИ-МС [M-H₂O+H]⁺ для C₁₄H₂₅BClN₂O₄; рассчитано 331,2; обнаружено 331,2.

Пример 6. 5-Амино-4-{3-[(1R,2R,6S,8R)-2,9,9-триметил-3,5-диокса-4-боратрицикло[6.1.1.0^{2,6}]декан-4-ил]пропил}октагидроциклопента[с]пиррол-5-карбоновая кислота.



К примеру 1 (60 мг; 0,18 ммоль) в безводном ацетонитриле (6 мл) добавляли (1R,2R,3S,5R)-(-) пинандиол (46,5 мг; 0,27 ммоль; 1,5 эквив.). Эту смесь обрабатывали ультразвуком в течение 10 мин, добавляли мешалку, нагревали до 80°C в течение 2,5 ч, затем удаляли растворитель. Полученный остаток растирали с диэтиловым эфиром (3×4 мл), фильтровали, и твердое вещество сушили в высоком вакууме в течение 12 ч. Бороновой кислоты пинандиолового эфира бисгидрохлорид (40 мг) получали в виде почти белого твердого вещества. ¹H-ЯМР (400 МГц, D₂O) δ 4,41 (d; J=8,7 Гц; 1H); 3,60 - 3,40 (m; 2H); 3,39 - 3,12 (m; 3H); 2,92 (s; 1H); 2,70 - 2,60 (m; 1H); 2,46 - 2,33 (m; 2H); 2,25 (s; 1H); 2,13 - 1,68 (m; 3H); 1,86 - 1,70 (m; 1H); 1,60 (s; 1H); 1,52 - 1,13 (m; 8H); 0,98 (d; J=10,7 Гц; 1H); 0,93 - 0,70 (m; 6H), ЭРИ-МС [M+H]⁺ для C₂₁H₃₆BN₂O₄; рассчитано 391,3; обнаружено 391,2.

Аналитические методы.

ЖХ: Agilent 1100 series; масс-спектрометр: Agilent G6120BA, одноквадрупольный.

Метод ЖХ-МС: колонка ЖХ-МС Waters XSelect® HSS C18 3,5 мкм (2,1×75 мм), 35°C, скорость потока 0,9 мл/мин, 2,5-минутный градиент от 0 до 100% В с 0,5-минутной промывкой при 100% В; А=0,1% муравьиной кислоты/5% ацетонитрила/94,9% воды; В=0,1% муравьиной кислоты/5% воды/94,9% ацетонитрила.

Флэш-колонка: ISCO Rf⁺.

ВЭЖХ с обращенной фазой: ISCO-EZ; колонка: Kinetex 5 мкм EVO C18 100 А; 250×21,2 мм (Phenomenex).

Измерение активности соединения с помощью ферментативного анализа, связанного с аргиназой, с использованием рекомбинантных ARG1 и ARG2 человека

Очищенные рекомбинантные ARG1 и ARG2 человека получали в 50 мМ бисина, pH 8,5; 100 мкМ MnCl₂, 20% глицерина и 1 мМ DTT (дителиотреитола) при конечной концентрации исходного раствора 14,4 мкМ и 7,56 мкМ, соответственно. 2,5 нМ ARG1 или ARG2 инкубировали с различными концентрациями соединений в 10 мМ фосфате натрия, pH 7,4; 0,1 мМ MnCl₂ и 2,5% DMSO (диметилсульфоксида) в общем объеме 40 мкл в 384-луночном микропланшете (Corning™ #3640) при температуре 37°C в течение 1 ч. Ферментативную реакцию аргиназы инициировали добавлением 10 мкл 4 мМ L-аргинина, предварительно инкубированного в 10 мМ фосфате натрия, pH 7,4, и 0,1 мМ MnCl₂ при 37°C, в смесь фермента и соединения, что давало конечные условия реакции: 2 нМ ARG1 или ARG2 и 0,8 мМ L-аргинина в 10 мМ фосфате натрия, pH 7,4; 0,1 мМ MnCl₂ и 2% DMSO с различными концентрациями соединений. После 2 ч инкубации при 37°C ферментативную реакцию аргиназы останавливали переносом 10 мкл реакционной смеси в 10 мкл смеси для обнаружения (204 мкМ аминокислоты-2-бороно-6-гексановой кислоты; 0,25 мкл смеси

ферментов аргиназы; 0,25 мкл проявителя аргиназы; 0,25 мкл аргиназа-превращающего фермента в буфере для анализа аргиназы из набора для колориметрического анализа аргиназной активности, BioVision Inc. №K755-100) в прозрачном 384-луночном микропланшете (Greiner №781801). Планшет немедленно помещали в ридер для планшетов (многорежимный ридер микропланшетов Synergy™ Neo2) для отслеживания поглощения при 570 нм при 37°C. Значения абсорбции через 12 ~ 20 мин использовали для расчета активности соединения. Значение холостой пробы DMSO (минимум ингибирования=100% активности) использовали в качестве отрицательного контроля. Положительный контроль устанавливали путем добавления 8 мкл смеси фермента и DMSO в 10 мкл смеси для обнаружения с последующим добавлением 2 мкл L-аргинина (максимальное ингибирование=0% активности). Для расчета процентной активности использовали уравнение 1. Абсорбция_{570 нм} - это значение при данной концентрации соединения:

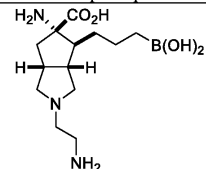
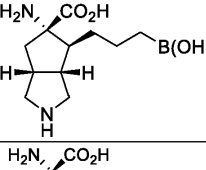
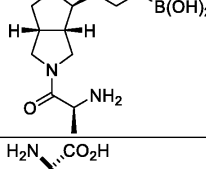
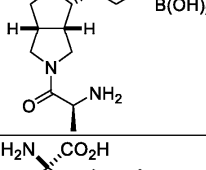
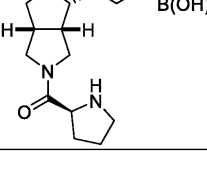
$\text{Активность, \%} = \frac{\text{Абсорбция}_{570 \text{ нм}} - \text{МАКСИМУМ}}{\text{МИНИМУМ} - \text{МАКСИМУМ}} \times 100$	Уравнение 1
---	-------------

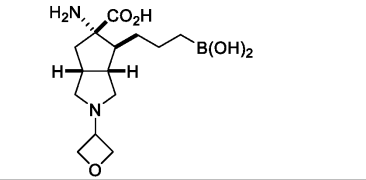
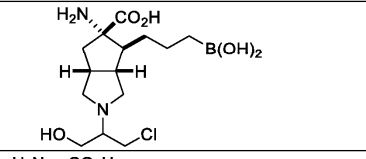
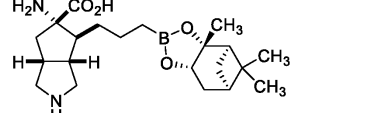
Концентрацию соединения, которая приводила к потере 50% активности фермента (IC₅₀), рассчитывали с помощью GraphPad Prism с использованием уравнения 2, где N - коэффициент Хилла:

$\text{Активность, \%} = \text{Нижняя точка} + \frac{\text{Верхняя точка} - \text{Нижняя точка}}{1 + \left(\frac{[I]}{IC_{50}}\right)^N}$	Уравнение 2
---	-------------

Был проведен встречный скрининг для выявления любого ингибирования связанных ферментов тестируемыми соединениями. 10 мкл 0,26 мМ мочевины с различными концентрациями соединений в 10 мМ фосфате натрия, pH 7,4; 0,1 мМ MnCl₂ и 2% DMSO добавляли в 10 мкл смеси для обнаружения вместо смеси для ферментативной реакции аргиназы. Поглощение контролировали при 570 нм, как описано выше. Значения холостой пробы без субстрата (без мочевины; максимальное ингибирование=0% активности) и холостого опыта DMSO (минимальное ингибирование=100% активности) использовали в качестве положительного и отрицательного контролей, соответственно. Ожидается, что кривая доза-ответ будет плоской для соединений, которые не ингибируют никакие связывающие ферменты. Отсутствие активности при анализе селективности и специфичности использовали для подтверждения того, что результаты точно отражают значения IC₅₀ для ARG1 и ARG2.

Специфические примеры (эффективность: ингибирование аргиназы 1 IC₅₀:
+ означает >1 мкМ, ++ означает от 100 нМ до 1 мкМ, +++ означает <100 нМ)

Пример	Активность
	++
	+++
	++
	++
	++

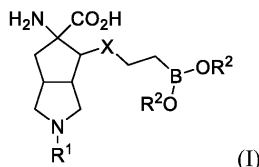
	++
	+++
	++

В настоящем изобретении описаны конкретные варианты осуществления этого изобретения, включая лучший известный изобретателям способ осуществления изобретения. После прочтения вышеизложенного описания вариации раскрытых вариантов осуществления могут стать очевидными для специалистов в данной области техники, и ожидается, что специалисты в данной области техники могут использовать такие вариации при необходимости. Соответственно, предполагается, что изобретение будет применяться на практике иначе, чем конкретно описано в настоящем изобретении, и что изобретение включает все модификации и эквиваленты предмета, изложенного в прилагаемой формуле изобретения, как разрешено применимым законодательством. Далее любая комбинация вышеописанных элементов во всех их возможных вариантах охватывается изобретением, если иное не указано здесь или иначе явно противоречит контексту.

Все публикации, заявки на патенты, номера доступа и другие ссылки, цитируемые в данном описании, включены в настоящее описание посредством ссылки, как если бы каждая отдельная публикация или заявка на патент была специально и индивидуально указана для включения в качестве ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I)



или его фармацевтически приемлемая соль, где

X представляет собой CH₂;

R¹ является элементом, выбранным из группы, состоящей из H, X^a-NH₂, -C(O)-X^a-NH₂ и R^c, при этом

X^a представляет собой C₁₋₄ алкилен, который является незамещенным; и

R^c представляет собой четырех-шестичленное насыщенное гетероциклическое кольцо, имеющее вершину кольца, которая означает O; или представляет собой C₁₋₆ алкил, который замещен одним-тремя заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из галогена, гидроксила и amino; или

R¹ является натуральной аминокислотой, выбранной из группы, состоящей из аланина и пролина; и каждый R² представляет собой H.

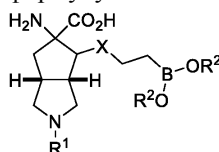
2. Соединение по п.1 или его фармацевтически приемлемая соль, где

R¹ является элементом, выбранным из группы, состоящей из H, -X^a-NH₂ и -C(O)-X^a-NH₂;

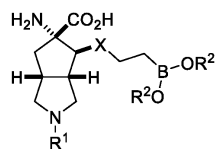
где X^a представляет собой C₁₋₄ алкилен, который является незамещенным; или

R¹ является натуральной аминокислотой, выбранной из группы, состоящей из аланина и пролина.

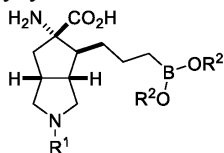
3. Соединение по п.1 или 2, имеющее формулу



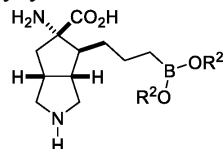
4. Соединение по п.3, имеющее формулу



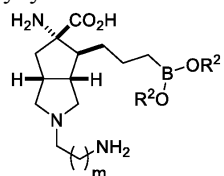
5. Соединение по п.4, имеющее формулу



6. Соединение по п.5, имеющее формулу

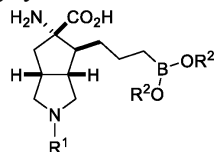


7. Соединение по п.5, имеющее формулу



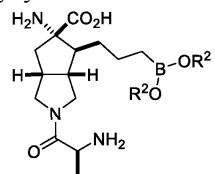
где m равно 1, 2 или 3.

8. Соединение по п.1, имеющее формулу

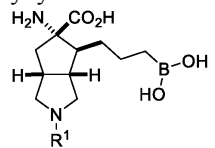


где R¹ представляет собой натуральную аминокислоту, выбранную из группы, состоящей из аланина и пролина.

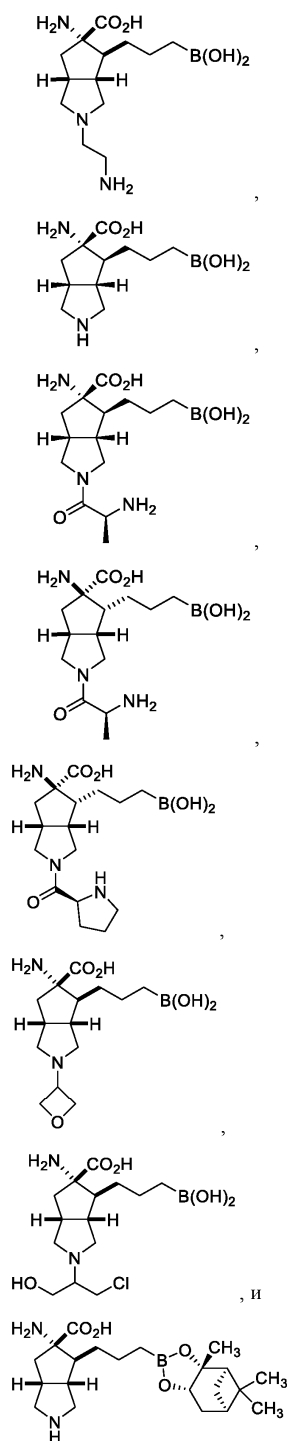
9. Соединение по п.8, имеющее формулу



10. Соединение по п.5, имеющее формулу



11. Соединение, выбранное из группы, состоящей из:



или его фармацевтически приемлемая соль.

12. Фармацевтическая композиция, включающая соединение по любому из пп.1-11, или его фармацевтически приемлемую соль, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

13. Способ лечения заболевания, расстройства или состояния, опосредованного по меньшей мере частично ARG1 (аргиназой I), ARG2 (аргиназой II) или как ARG1, так и ARG2, включающий введение терапевтически эффективного количества соединения по любому из пп.1-11, или его фармацевтически приемлемой соли субъекту, нуждающемуся в этом.

14. Способ по п.13, где указанное заболевание, расстройство или состояние опосредовано по меньшей мере частично ARG1.

15. Способ по п.13, где указанное заболевание, нарушение или состояние опосредовано по меньшей мере частично ARG2.

16. Способ по п.13, в котором указанное заболевание, расстройство или состояние опосредовано по меньшей мере частично ARG1 и ARG2.

17. Способ по любому из пп.14-16, где указанное соединение вводят в количестве, эффективном для замедления, остановки или регрессии опосредованной аргиназой иммуносупрессии.

18. Способ по любому из пп.14-16, где указанное заболевание, нарушение или состояние представляет собой рак.

19. Способ по п.18, где указанный рак представляет собой рак простаты, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак поджелудочной железы, рак шейки матки, рак желудка, рак эндометрия, опухоль головного мозга, рак печени, рак мочевого пузыря, рак яичника, рак яичка, рак головы, рак шеи, рак кожи (включая меланому и базальную карциному), опухоль мезотелиальной оболочки, гемобластозы (включая лимфому и лейкоз), рак пищевода, рак молочной железы, опухоль мышцы, опухоль соединительной ткани, рак легкого (включая мелкоклеточную карциному и немелкоклеточную карциному легкого), рак надпочечника, рак щитовидной железы, рак почки или рак кости; или представляет собой колоректальный рак, рак головы и шеи, глиобластому, мезотелиому, почечно-клеточную карциному, рак желудка, саркому (включая саркому Капоши), хориокарциному, базально-клеточную карциному кожи и семиному яичка.

20. Способ по п.19, где указанный рак выбран из группы, состоящей из меланомы, колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака простаты, рака легкого, лейкоза, опухоли головного мозга, лимфомы, рака яичника, саркомы Капоши, почечно-клеточной карциномы, рака головы и шеи, и рака пищевода.

21. Способ по любому из пп.14-16, где указанное заболевание, нарушение или состояние представляет собой иммунозависимое заболевание, нарушение или состояние.

22. Способ по п.21, в котором указанное иммунозависимое заболевание, нарушение или состояние выбрано из группы, состоящей из ревматоидного артрита, почечной недостаточности, волчанки, астмы, псориаза, колита, панкреатита, аллергии, фиброза, анемии, фибромиалгии, болезни Альцгеймера, застойной сердечной недостаточности, инсульта, стеноза аортального клапана, артериосклероза, остеопороза, болезни Паркинсона, инфекций, болезни Крона, язвенного колита, аллергического контактного дерматита и других экзем, системного склероза и рассеянного склероза.

23. Комбинация, включающая соединение по любому из пп.1-11, или его фармацевтически приемлемую соль, и по меньшей мере одно дополнительное средство терапии.

24. Комбинация по п.23, где указанное по меньшей мере одно дополнительное средство терапии представляет собой химиотерапевтический агент, иммуномодулирующий и/или модулирующий воспаление агент, или облучение.

25. Комбинация по п.23, где указанный по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор иммунной контрольной точки.

26. Комбинация по п.25, где указанный ингибитор иммунной контрольной точки блокирует активность по меньшей мере одного из PD1 (белок 1 запрограммированной гибели клеток); PDL1 (лиганд PD1); BTLA (аттенюатор В- и Т-лимфоцитов), LAG3 (ген активации лимфоцитов 3), TIM3 (белок 3 Т-клеточной мембраны), TIGIT (Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM), CTLA4 (антиген 4, связанный с цитотоксическими Т-лимфоцитами) или члена семейства В7, содержащего мембраносвязанный лиганд, который связывается с ко-стимулирующими или ко-ингибирующими рецепторами, выбранными из группы, состоящей из В7-1, В7-2, В7-Н1 (PD-L1), В7-DC (PD-L2), В7-Н2 (ICOS-L), В7-Н3, В7-Н4, В7-Н5 (VISTA) и В7-Н6.

27. Комбинация по п.26, где указанный ингибитор иммунной контрольной точки блокирует активность PD1 или PDL1.

28. Комбинация по п.27, дополнительно содержащая дополнительный терапевтический агент, блокирующий активность TIGIT.

29. Комбинация по п.28, где указанный дополнительный терапевтический агент блокирует активность TIGIT путем активации его лиганда.

30. Комбинация по п.25, где указанный ингибитор иммунной контрольной точки блокирует активность TIGIT.

31. Комбинация по п.30, где указанный ингибитор иммунной контрольной точки блокирует активность TIGIT путем активации его лиганда.

32. Комбинация по любому из пп.25-31, дополнительно содержащая ингибитор A2R.

33. Комбинация по любому из пп.25-32, дополнительно содержащая ингибитор CD73.

34. Комбинация по любому из пп.25-31, дополнительно содержащая химиотерапевтический агент.

35. Комбинация по п.34, где указанный химиотерапевтический агент включает химиотерапевтический агент на основе платины или антрациклина.

36. Комбинация по любому из пп.25-35, дополнительно включающая облучение.

37. Комбинация по п.23, где указанный по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент.

38. Комбинация по п.37, где указанный химиотерапевтический агент включает химиотерапевтический агент на основе платины или антрациклина.

39. Комбинация по п.38, дополнительно включающая облучение.

40. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение указанному субъекту эффективного количества соединения по любому из пп.1-11, или его фармацевтически приемлемой соли, и по меньшей

мере одного дополнительного терапевтического агента.

41. Способ по п.40, где указанный по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент представляет собой химиотерапевтический агент, иммуномодулирующий и/или модулирующий воспаление агент, или облучение.

42. Способ по п.40, где указанный по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент представляет собой ингибитор иммунной контрольной точки.

43. Способ по п.42, где указанный ингибитор иммунной контрольной точки блокирует активность по меньшей мере одного из PD1 (белок 1 запрограммированной гибели клеток); PDL1 (лиганд PD1); BTLA (аттенюатор В- и Т-лимфоцитов), LAG3 (ген активации лимфоцитов 3), TIM3 (белок 3 Т-клеточной мембраны), TIGIT (Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM), CTLA4 (антиген 4, связанный с цитотоксическими Т-лимфоцитами) или члена семейства В7, содержащего мембраносвязанный лиганд, который связывается с ко-стимулирующими или ко-ингибирующими рецепторами, выбранными из группы, состоящей из В7-1, В7-2, В7-Н1 (PD-L1), В7-DC (PD-L2), В7-Н2 (ICOS-L), В7-Н3, В7-Н4, В7-Н5 (VISTA) и В7-Н6.

44. Способ по п.43, где указанный ингибитор иммунной контрольной точки блокирует активность PD1 или PDL1.

45. Способ по п.44, дополнительно включающий дополнительный терапевтический агент, блокирующий активность TIGIT.

46. Способ по п.45, где указанный дополнительный терапевтический агент блокирует активность TIGIT путем активации его лиганда.

47. Способ по п.42, где указанный ингибитор иммунной контрольной точки блокирует активность TIGIT.

48. Способ по п.47, где указанный ингибитор иммунной контрольной точки блокирует активность TIGIT путем активации его лиганда.

49. Способ по любому из пп.42-48, дополнительно включающий ингибитор A2R.

50. Способ по любому из пп.42-49, дополнительно включающий ингибитор CD73.

51. Способ по любому из пп.42-48, дополнительно включающий химиотерапевтический агент.

52. Способ по п.51, где указанный химиотерапевтический агент включает химиотерапевтический агент на основе платины или антрациклина.

53. Способ по п.52, дополнительно включающий облучение.

54. Способ по любому из пп.40-53, где указанное соединение и указанный по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент вводят в комбинации.

55. Способ по любому из пп.40-53, где указанное соединение и указанный по меньшей мере один дополнительный терапевтический агент вводят последовательно.

56. Способ по любому из пп.40-53, где указанные периоды лечения для введения указанного соединения и указанного по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента перекрываются.

