

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **029781**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2018.05.31

(21) Номер заявки
201500530

(22) Дата подачи заявки
2009.07.07

(51) Int. Cl. *C07D 271/08* (2006.01)
A61K 31/4245 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 27/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)

(54) 1,2,5-ОКСАДИАЗОЛЫ В КАЧЕСТВЕ ИНГИБИТОРОВ ИНДОЛАМИН-2,3-ДИОКСИГЕНАЗЫ

(31) 61/078,876; 61/150,873

(32) 2008.07.08; 2009.02.09

(33) US

(43) 2015.08.31

(62) 201170161; 2009.07.07

(71) Заявитель:
ИНСАЙТ КОРПОРЕЙШН (US)

(72) Изобретатель:
**Комбс Эндрю П., Юэ Эдди В., Спаркс
Ричард Б., Чжу Вэньюй, Чжоу Цзячэн,
Лин Циянь, Вен Линкай, Юэ Тай-
Юйэнь, Лю Пинли (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) US-A1-2007185165
US-A1-2006258719
WO-A-2008058178
WO-A-2008036652
WO-A-2007075598

(57) Данное изобретение направлено на твердую дозированную форму, подходящую для перорального введения, содержащую 4-({2-[(аминосультфонил)амино]этил}амино)-N-(3-бром-4-фторфенил)-N'-гидрокси-1,2,5-оксадиазол-3-карбоксимидамид или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель, которая является ингибитором индоламин-2,3-диоксигеназы и полезна в лечении рака и других расстройств.

B1**029781****029781****B1**

Область изобретения

Данное изобретение относится к твердой дозированной форме, подходящей для перорального введения, содержащей 4-({2-[(аминосульфонил)амино]этил}амино)-N-(3-бром-4-фторфенил)-N'-гидрокси-1,2,5-оксадиазол-3-карбоксимид, и к способу лечения рака, вирусной инфекции, депрессии, нейродегенеративного расстройства, травмы, возрастной катаракты или отторжения пересаженного органа или аутоиммунного расстройства.

Уровень техники

Триптофан (Trp) представляет собой неотъемлемую аминокислоту, необходимую для биосинтеза белков, ниацина и нейромедиатора 5-гидрокситриптамина (серотонин). Фермент индоламин-2,3-диоксигеназа (также известный как INDO или IDO) катализирует первую, ограничивающую скорость стадию разложения L-триптофана до N-формилкинурина. В человеческих клетках, истощение Trp в результате действия IDO - это очевидный противомикробный эффекторный механизм, индуцируемый гамма-интерфероном (IFN- γ). Стимуляция IFN- γ индуцирует активацию IDO, что ведет к истощению Trp, таким образом останавливая рост Trp-зависимых внутриклеточных патогенов, таких как *Toxoplasma gondii* и *Chlamydia trachomatis*. Активность IDO также включает антипролиферативное действие на многочисленные опухолевые клетки, и индукция IDO наблюдается *in vivo* в ходе отторжения аллогенных опухолей, указывая на возможную роль данного фермента в процессе отторжения опухоли (Daubener, et al., 1999, Adv. Exp. Med. Biol., 467: 517-24; Taylor, et al., 1991, FASEB J., 5: 2516-22).

Наблюдалось, что клетки HeLa, культивируемые совместно с лимфоцитами периферической крови (PBLs), приобретают ингибирующий иммунитет фенотип путем регуляции активности IDO. Считается, что уменьшение пролиферации PBL при обработке интерлейкином-2 (IL2) является результатом высвобождения IDO клетками опухоли в ответ на секрецию IFN- γ PBL. Данный эффект изменяли обработкой 1-метилтриптофаном (1MT) - специфическим ингибитором IDO. Допускается, что активность IDO в клетках опухоли может служить цели ослабления противоопухолевых реакций (Logan, et al., 2002, Immunology, 105: 478-87).

В последнее время больше внимания уделяется иммунорегулирующей роли истощения Trp. Несколько линий доказательств свидетельствуют, что IDO вовлечен в индукцию иммунной толерантности. Исследования беременности, резистентности опухоли, хронических инфекций и аутоиммунных заболеваний у млекопитающих показали, что клетки, которые экспрессируют IDO, могут подавлять реакции Т-клеток и способствовать толерантности. Ускоренный катаболизм наблюдается при заболеваниях и расстройствах, связанных с иммунной активацией клеток, например, инфекция, злокачественное новообразование, аутоиммунные заболевания и СПИД, а также в ходе беременности. Например, повышенные уровни интерферонов и повышенные уровни метаболитов Trp в моче наблюдаются при аутоиммунных заболеваниях; был выдвинут постулат, что системное или местное истощение Trp, которое возникает при аутоиммунных заболеваниях, возможно, связано с дегенерацией и симптомами истощения при этих заболеваниях. В подтверждение данной гипотезы, высокие уровни IDO наблюдались в клетках, выделенных из синовиального артрита суставов. Уровни интерферонов также повышаются у людей, инфицированных вирусом иммунодефицита (ВИЧ), и повышение уровней интерферона связано с прогнозом ухудшения. Таким образом, допускается, что IDO индуцируется хронической ВИЧ-инфекцией, и, кроме того, его содержание увеличивается при оппортунистических инфекциях, и что хроническая потеря Trp инициирует механизмы, ответственные за кахексию, слабоумие, понос и, возможно, иммуносупрессию у больных СПИДом (Brown, et al., 1991, Adv. Exp. Med. Biol., 294: 425-35). С этой точки зрения, недавно было продемонстрировано, что ингибирование IDO может увеличивать уровни специфических по отношению к вирусу Т-клеток и одновременно уменьшать количество инфицированных вирусом макрофагов на модели ВИЧ у мышей (Portula et al., 2005, Blood, 106: 2382-90).

Считается, что IDO играет роль в процессах угнетения иммунитета, которые предупреждают отторжение эмбриона в матке. Более 40 лет назад наблюдали, что в ходе беременности генетически незрелое оплодотворенное яйцо млекопитающих выживает, невзирая на прогноз иммунологии пересадки ткани (Medawar, 1953, Symp. Soc. Exp. Biol. 7: 320-38). Анатомический отсек матери и утробного плода и антигенная незрелость утробного плода не могут полностью объяснять выживания аллотрансплантированного эмбриона. В последнее время внимание сосредоточено на иммунологической толерантности матери. Поскольку IDO экспрессируется человеческими синцитиотрофобластными клетками, и системная концентрация триптофана снижается на протяжении нормальной беременности, выдвинута гипотеза, что экспрессия IDO в материнско-эмбрионном интерфейсе необходима для предупреждения иммунологического отторжения эмбрионного аллотрансплантата. Чтобы проверить данную гипотезу, беременных мышей (с сингенными или аллогенными утробными плодами) подвергали действию 1MT, и наблюдалось быстрое, индуцируемое Т-клетками отторжение всех аллогенных оплодотворенных яиц. Таким образом, по-видимому, путем катаболизма триптофана оплодотворенное яйцо млекопитающих подавляет активность Т-клеток и защищает себя от отторжения, а блокирование катаболизма триптофана в ходе мышинной беременности позволяет материнским Т-клеткам провоцировать отторжение аллотрансплантированного эмбриона (Munn, et al., 1998, Science, 281: 1191-3).

Последующие доказательства механизма иммунорезистентности опухолей, основанной на разложе-

нии триптофана под действием IDO, полученные в результате наблюдения, что большинство человеческих опухолей конститутивно экспрессируют IDO, и что экспрессия IDO клетками иммуногенной опухоли мышши предупреждает их отторжение предварительно иммунизированными мышами. Такое влияние сопровождается отсутствием аккумуляции специфических Т-клеток в месте опухоли и может быть частично обращено системным лечением мышшей ингибитором IDO, при отсутствии заметной токсичности. Таким образом, это наводит на мысль, что эффективность терапевтической вакцинации больных раком может быть повышена сопутствующим введением ингибитора IDO (Uyttenhove et al., 2003, *Nature Med.*, 9: 1269-74). Также продемонстрировано, что ингибитор IDO, 1-MT, может осуществлять синергетическое действие с химиотерапевтическими средствами с целью уменьшения роста опухолей у мышшей, указывая на то, что ингибирование IDO также может усиливать противоопухолевую активность обычной цитотоксической терапии (Muller et al., 2005, *Nature Med.*, 11: 312-9).

Один из механизмов, которые способствуют отсутствию иммунологической реакции против опухолей, может заключаться в презентации антигенов опухоли толерогенными хозяина APCs. Также описание подмножество экспрессирующих IDO человеческих антиген-презентирующих клеток (APCs), созэкспрессирующих CD123 (IL3RA) и CCR6 и подавляющих пролиферацию Т-клеток. Как зрелые, так и незрелые CD123-положительные дендритные клетки подавляли активность Т-клеток, и такая подавляющая IDO активность блокировалась 1MT (Munn, et al., 2002, *Science*, 297: 1867-70). Также продемонстрировано, что дренирующие опухоль лимфатические узлы у мышшей (TDLNs) содержат подмножество плазмацитоидных дендритных клеток (pDC), которые конститутивно экспрессируют иммуносупрессивные уровни IDO. Несмотря на содержание только 0,5% клеток лимфатического узла, *in vitro* эти pDC мощно подавляют реакции Т-клеток на антигены, презентованные непосредственно pDC, а также доминирующим образом подавляют реакции Т-клеток на антигены третьей стороны, презентованные несупрессорными APCs. В пределах популяции pDC, большая часть опосредствованной функциональным IDO супрессорной активности отделена с новым подмножеством pDC, созэкспрессирующих маркер В-выстилки CD19. Таким образом, выдвинута гипотеза, что опосредствованное IDO угнетение pDCs в TDLNs создает местное микроокружение, которое мощно подавляет противоопухолевые реакции Т-клеток хозяина (Munn, et al., 2004, *J. Clin. Invest.*, 114 (2): 280-90).

IDO разлагает индолный фрагмент триптофана, серотонина и мелатонина, и инициирует выработку нейроактивных и иммунорегулирующих метаболитов, коллективно известных как кинуренины. Путем локального истощения триптофана и увеличения проапоптотических кинуренинов IDO, экспрессирующийся дендритными клетками (DCs), может существенно поражать пролиферацию и выживание Т-клеток. Индукция IDO в DCs может быть распространенным механизмом делеционной толерантности, которой управляют регуляторные Т-клетки. Поскольку можно ожидать, что такие толерогенные реакции действуют при разнообразных физиопатологических состояниях, метаболизм триптофана и продуцирование кинуренина могут представлять критический интерфейс между иммунной и нервной системами (Grohmann, et al., 2003, *Trends Immunol.*, 24: 242-8). При состояниях постоянной иммунной активации, доступность свободного Trp в сыворотке уменьшается и, как результат сниженной выработки серотонина, серотонинергические функции также могут быть нарушены (Wirleitner, et al., 2003, *Curr. Med. Chem.*, 10: 1581-91).

Интересно, что при введении интерферона-α наблюдалась индукция нейропсихиатрических побочных эффектов, таких как депрессивные симптомы и изменения когнитивной функции. Прямое влияние на серотонинергическую нейромедиацию, возможно, способствует таким побочным эффектам. Кроме того, поскольку активация IDO приводит к снижению уровней триптофана, предкурсора серотонина (5-HT), IDO может играть роль в развитии таких нейропсихиатрических побочных эффектов, уменьшая центральный синтез 5-HT. К тому же, метаболиты кинуренинов, например, 3-гидрокскинуренин (3-OH-KYN) и хинолиновая кислота (QUIN) оказывают токсичное действие на функции мозга. 3-OH-KYN может вызывать окислительный стресс, увеличивая выработку реакционноспособных форм кислорода (ROS), и QUIN может вызывать избыточную стимуляцию рецепторов N-метил-D-аспартата (NMDA) в гиппокампе, что приводит к апоптозу и атрофии гиппокампа. Как избыточная выработка ROS, так и атрофия гиппокампа, вызванная избыточной стимуляцией NMDA, связаны с депрессией (Wichers and Maes, 2004, *J. Psychiatry Neurosci.*, 29: 11-17). Таким образом, активность IDO может играть роль в механизме депрессии.

Созданы низкомолекулярные ингибиторы IDO для лечения или предупреждения связанных с IDO заболеваний, таких как описанные выше. Например, оксадиазол и другие гетероциклические ингибиторы IDO раскрыты в патенте США 2006/0258719 и патенте США 2007/0185165. В публикации PCT WO 99/29310 раскрыты способы изменения опосредствованного Т-клетками иммунитета, включающие изменение местных внеклеточных концентраций триптофана и метаболитов триптофана, с применением ингибитора IDO, такого как 1-метил-DL-триптофан, п-(3-бензофурил)-DL-аланин, п-[3-бензо(б) тиенил]-DL-аланин и 6-нитро-L-триптофан (Munn, 1999). В WO 03/087347, также опубликованной как Европейский Патент 1501918, раскрыты способы получения антиген-презентирующих клеток для увеличения или уменьшения толерантности Т-клеток (Munn, 2003). Соединения, которые обладают ингибирующей индолламин-2,3-диоксигеназу (IDO) активностью, дополнительно раскрыты в WO 2004/094409; и публикация

патентной заявки США № 2004/0234623 направлена на способы лечения субъекта с раком или инфекцией путем введения ингибитора индоламин-2,3-диоксигеназы в комбинации с другими схемами лечения.

В свете экспериментальных данных, которые указывают на роль IDO в угнетении иммунитета, резистентности и/или отторжении опухоли, хронических инфекциях, ВИЧ-инфекции, СПИДе (в частности, его проявлениях, таких как кахексия, слабоумие и понос), аутоиммунных заболеваниях или расстройствах (таких как ревматоидный артрит) и иммунологической толерантности и предотвращении отторжения эмбриона *in utero*, желательными являются терапевтические средства, направленные на угнетение разложения триптофана путем ингибирования активности IDO. Ингибиторы IDO могут применяться для активации Т-клеток и, таким образом, усиления активации Т-клеток, когда Т-клетки угнетены беременностью, злокачественным новообразованием или вирусом, например, ВИЧ. Ингибирование IDO может также быть важной стратегией лечения для пациентов с неврологическими или нейропсихиатрическими заболеваниями или расстройствами, такими как депрессия. Соединения, композиции и способы в данном описании помогают удовлетворить существующую потребность в модуляторах IDO.

Сущность изобретения

В данном изобретении предлагаются, в частности, твердая дозированная форма, подходящая для перорального введения, содержащая 4-({2-[(аминосulфонил)амино]этил}амино)-N-(3-бром-4-фторфенил)-N'-гидрокси-1,2,5-оксадиазол-3-карбоксимид или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

В данном изобретении дополнительно предлагается способ ингибирования иммуносупрессии у пациента, включающий введение указанному пациенту указанной твердой дозированной формы.

В данном изобретении дополнительно предлагается способ лечения рака, вирусной инфекции, депрессии, нейродегенеративного расстройства, травмы, возрастной катаракты, отторжения пересаженного органа или аутоиммунного заболевания у пациента, включающий введение указанному пациенту терапевтически эффективного количества твердой дозированной формы.

Краткое описание фигур

Фиг. 1 демонстрирует пример рентгеноструктурной дифрактограммы, характерной для соединения по изобретению, полученного в примере 1.

Фиг. 2 демонстрирует термограмму DSC, характерную для соединения по изобретению, полученного в примере 1.

Фиг. 3 демонстрирует характеристику данных ТГА соединения по изобретению, полученного в примере 1.

Подробное описание изобретения

В одном из аспектов данного изобретения предлагаются различные твердые формы 4-({2-[(аминосulфонил)амино]этил}амино)-N-(3-бром-4-фторфенил)-N'-гидрокси-1,2,5-оксадиазол-3-карбоксимид (см. пример 1). В некоторых вариантах твердая форма представляет собой кристаллическое твердое вещество. В некоторых вариантах твердая форма является в существенной мере безводной (например, содержит менее чем приблизительно 1% воды, менее чем приблизительно 0,5% воды, менее чем приблизительно 1,5% воды, менее чем приблизительно 2% воды). В некоторых вариантах твердая форма характеризуется температурой плавления или эндотермой DSC, центрированной в интервале от приблизительно 162 до приблизительно 166°C. В некоторых вариантах твердая форма характеризуется температурой плавления или эндотермой DSC, центрированной приблизительно при 164°C. В некоторых вариантах твердая форма демонстрирует в существенной мере такую же термограмму DSC, как показано на фиг. 2. В других вариантах, на РГДЦП твердой формы присутствуют по меньшей мере один, два или три пика, в единицах 2-тета, выбранные из приблизительно 18,4°, приблизительно 18,9°, приблизительно 21,8°, приблизительно 23,9°, приблизительно 29,2° и приблизительно 38,7°. В других вариантах твердая форма демонстрирует в существенной мере такой же характер РГДЦП, как показано на фиг. 1.

В некоторых вариантах твердая форма является в существенной мере очищенной.

Характер РГДЦП отображения (пики) обычно считается "отпечатком пальцев" конкретной кристаллической формы. Хорошо известно, что относительная интенсивность пиков РГДЦП может широко варьировать в зависимости от, среди прочего, техники изготовления образца, распределения размера кристаллов, различных применяемых фильтров, методики монтажа образца и конкретного использованного прибора. В некоторых случаях могут наблюдаться новые пики или существующие пики могут исчезать, в зависимости от вида прибора или установленных параметров. В данном описании, термин "пик" обозначает отображение с относительной высотой/интенсивностью по меньшей мере приблизительно 4% от максимальной высоты/интенсивности пика. Кроме того, инструментальная вариация и другие факторы могут влиять на значение 2-тета. Поэтому отнесения пиков, например, приведенные в данном описании, могут варьировать в пределах приблизительно $\pm 0,2^\circ$ (2-тета), и термин "в существенной мере" в контексте РГАДП в данном описании предназначен охватывать вышеприведенные вариации.

Таким же образом, значения температуры в связи с DSC, ТГА или другими термическими экспериментами могут варьировать в пределах приблизительно $\pm 3^\circ\text{C}$ в зависимости от прибора, конкретных параметров прибора, способа подготовки образцов и т.п. Соответственно, если кристаллическая форма, приведенная в данном описании, демонстрирует термограмму DSC, "в существенной мере такую же",

как показано на любой из фигур, это предусматривает включение данной вариации.

В разных местах данного описания заместители соединений по изобретению, могут быть раскрыты в группах или в интервалах. Конкретно предусматривается, что изобретение включает каждую и любую индивидуальную подкомбинацию членов таких групп и интервалов.

Предусматривается, что соединения по изобретению являются стабильными. В данном описании "стабильный" обозначает соединение, которое является достаточно устойчивым, чтобы выдержать выделение до пригодной степени чистоты из реакционной смеси, и предпочтительно пригодное к введению в рецептуру эффективного терапевтического средства.

Дополнительно предусматривается, что некоторые признаки изобретения, которые с целью ясности описаны в контексте отдельных вариантов, могут также быть приведены в комбинации в одном и том же варианте. С другой стороны, различные признаки изобретения, которые с целью краткости описаны в контексте одного и того же варианта, могут также быть приведены отдельно или в какой-либо подходящей подкомбинации.

Данное изобретение также включает соли соединения, описанного в данном описании. В данном описании "соли" обозначают производные раскрытого соединения, где начальное соединение модифицировано путем превращения существующего кислотного или основного фрагмента в его солевую форму. Примеры солей включают, не ограничиваясь ими, соли минеральных кислот (например, HCl, HBr, H₂SO₄) или органических кислот (например, уксусная кислота, бензойная кислота, трифторуксусная кислота) и основных остатков, таких как амины; соли щелочного металла (например, Li, Na, K, Mg, Ca) или органического основания (например, триалкиламмоний) и кислотных остатков, таких как карбоновые кислоты; и т.п. Соли по данному изобретению могут быть синтезированы из начального соединения, которое содержит основной или кислотный фрагмент, традиционными химическими способами. В целом, такие соли могут быть получены реакцией свободной кислоты или основания указанных соединений со стехиометрическим количеством соответствующего основания или кислоты в воде или в органическом растворителе, или в смеси двух растворителей; в целом, неводные среды, такие как эфир, этилацетат, этанол, изопропанол или ацетонитрил (ACN), являются предпочтительными.

"Фармацевтически приемлемые соли" по данному изобретению включают подмножество "солей", описанных выше, которые представляют собой традиционные нетоксичные соли начального соединения, образованные, например, с нетоксичными неорганическими или органическими кислотами. Перечни пригодных солей можно найти у Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pa., 1985, p. 1418 и Journal of Pharmaceutical Science, 66, 2 (1977), каждая из которых включена в данное описание путем ссылки во всей ее полноте. Фраза "фармацевтически приемлемый" используется в данном описании для обозначения таких соединений, материалов, композиций и/или лекарственных форм, которые являются, в пределах контекста звукового медицинского диагноза, пригодными для применения в контакте с тканями человеческого существа и животных без избыточной токсичности, раздражения, аллергической реакции или другой проблемы или осложнения, с рациональным соотношением пользы/риска.

Методы синтеза

Соединение по данному изобретению может быть получено различными путями, известными специалисту в области органического синтеза. Соединение по данному изобретению может быть синтезировано с применением описанных ниже способов, вместе с синтетическими методами, известными из уровня техники в области синтетической органической химии или их вариаций, как будет понятно специалистам в данной области.

Соединение по данному изобретению может быть получено из легко доступных начальных материалов, с использованием следующих общих способов и методик. Следует понимать, что в случае указания типичных или предпочтительных условий (т.е. температура реакции, длительность реакции, молярное соотношение реагентов, растворители, давление и т.п.) способа получения, могут также быть использованы другие условия процесса, если не указано противоположное. Оптимальные условия реакции могут варьировать для конкретных используемых реагентов или растворителей, но такие условия могут быть определены специалистом в данной области шаблонными методами оптимизации.

Контроль процессов, описанных в данном описании, может быть осуществлен в соответствии с любым пригодным способом, известным из уровня техники. Например, образование продукта может контролироваться спектроскопическими средствами, например, спектроскопия ядерного магнитного резонанса (например, ¹H или ¹³C), спектроскопия в инфракрасной области, спектрофотометрия (например, в видимой или УФ-области) или масс-спектрометрия; или хроматографическими методами, например, высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) или тонкослойная хроматография. Соединения, полученные в ходе реакций, могут быть очищены любым пригодным способом, известным из уровня техники. Например, хроматография ВЭЖХ (среднее давление) на подходящем адсорбенте (например, силикагель, диоксид кремния и т.п.), или препаративная тонкослойная хроматография; дистилляция; сублимация, растирание или перекристаллизация.

Получение соединения может включать введение и удаление защитных групп для различных химических групп. Потребность во введении и удалении защитной группы, а также выбор соответствующих

защитных групп может быть легко осуществлен специалистом в данной области. Химия защитных групп описана, например, в Wuts and Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 4th Ed., John Wiley & Sons: New York, 2006, которая включена в данное описание путем ссылки во всей ее полноте.

Реакции способов, описанных в данном описании, могут осуществляться в подходящих растворителях, которые могут быть легко выбраны специалистом в области органического синтеза. Подходящие растворители могут в существенной мере не реагировать с начальными материалами (реагентами), промежуточными соединениями или продуктами при температурах, при которых осуществляются реакции, т.е. температурах, которые могут варьировать от температуры замерзания растворителя до температуры кипения растворителя. Реакция получения может быть осуществлена в растворителе или смеси более чем одного растворителя. В зависимости от стадии реакции, может быть выбран подходящий растворитель(и) для конкретной указанной стадии реакции. Подходящие растворители включают воду, алканы (например, пентан, гексан, гептан, циклогексан и т.п., или смесь указанных растворителей), ароматические растворители (например, бензол, толуол, ксилен и т.п.), спирты (например, метанол, этанол, изопропанол и т.п.), эфиры (например, диалкиловые эфиры, трет-бутилметилловый эфир (МТБЭ), тетрагидрофуран (ТГФ), диоксан и т.п.), сложные эфиры (например, этилацетат, бутилацетат и т.п.), галогенированные растворители (например, дихлорметан (ДХМ), хлороформ, дихлорэтан, тетрахлорэтан), диметилформамид (ДМФА), диметилсульфоксид (ДМСО), ацетон, ацетонитрил (АСН), гексаметилфосфорамид (ГМФА) и N-метилпирролидон (NMP). Такие растворители могут применяться в водных или безводных формах.

Разделение рацемических смесей соединений может быть осуществлено любым из многочисленных способов, известных из уровня техники. Пример способа включает фракционную перекристаллизацию, с использованием "хиральной разделяющей кислоты", которая представляет собой оптически активную органическую кислоту, образующую соль. Подходящие разделяющие агенты для способов фракционной перекристаллизации представляют собой, например, оптически активные кислоты, например, формы D-и L-винной кислоты, диацетилвинной кислоты, дибензоилвинной кислоты, миндальной кислоты, яблочной кислоты, молочной кислоты или различных оптически активных сульфокамфорных кислот. Разделение рацемических смесей может также быть осуществлено элюацией на колонке, заполненной оптически активным разделяющим агентом (например, динитробензоилфенилглицином). Подходящий состав смеси растворителей для элюации может быть определен специалистом в данной области.

Защитные группы для аминогруппы регулярно применяются в органическом синтезе для предупреждения нежелательных реакций аминогруппы при осуществлении целевого превращения. Защитные группы для аминогруппы позволяют легко осуществить ковалентное присоединение к атому азота, а также селективное отщепление от атома азота. Разнообразные защитные группы для аминогруппы, широко классифицированные как алкоксикарбонил (например, этоксикарбонил, трет-бутоксикарбонил (Boc), бензилоксикарбонил (Cbz), 9-флуоренилметилоксикарбонил (Fmoc) и т.п.), ацил (например, ацетил (Ac), бензоил (Bz) и т.п.), сульфонил (например, метансульфонил, трифторметансульфонил и т.п.), арилалкил (например, бензил, дифенилметил, трифенилметил (тритил и т.п.), алкилалкил (например, аллил, пренил и т.п.), диарилметиленил (например, $(C_6H_5)_2C=N$ и т.п.), и силил (например, трет-бутилдиметилсилил, триизопропилсилил и т.п.), известные специалисту в данной области. Химия защитных групп для аминогруппы описана в Wuts and Greene, *Greene's Protective Groups in Organic Synthesis*, 4th Ed., pp 696-926, John Wiley & Sons: New York, 2006. В некоторых вариантах Pg^1 может представлять собой алкоксикарбонил (например, трет-бутоксикарбонил).

Защитные группы для аминогруппы, описанные выше, могут быть подходящим образом удалены с использованием многочисленных доступных реагентов для удаления защитной группы с аминогруппы, которые являются специфическими для разных групп, упомянутых выше, без воздействия на другие целевые фрагменты соединения. Группа трет-бутоксикарбонил может быть отщеплена (например, гидролизом) от атома азота, например, обработкой кислотой (например, трифторуксусной кислотой, толуолсульфоновой кислотой, хлористо-водородной кислотой и т.п.); комбинацией реагентов (например, смесь хлорангидрида уксусной кислоты и метанола), которая, как известно, образует кислоту; или кислотой Льюиса (например, $BF_3 \cdot Et_2O$). Группа бензилоксикарбонил может быть отщеплена (например, гидрогенолизом) от атома азота, например, обработкой водородом и катализатором (например, палладий на угле). В некоторых вариантах реагент для удаления защитной группы с аминогруппы может быть трифторуксусной кислотой. В некоторых вариантах реагент для удаления защитной группы с аминогруппы содержит трифторуксусную кислоту и >0,5 об.% воды, например, >1,0 об.% воды, >1,5 об.% воды, >2,0 об.% воды, от приблизительно 2% до приблизительно 10 об.% воды, от приблизительно 10% до приблизительно 20 об.% воды или от приблизительно 20% до приблизительно 50 об.% воды. В некоторых вариантах реагент для удаления защитной группы с аминогруппы может быть смесью трифторуксусной кислоты и воды в объемном соотношении приблизительно 98:2. В некоторых вариантах реагент для удаления защитной группы с аминогруппы может быть хлористо-водородной кислотой, необязательно в растворителе (например, вода, ТГФ или диоксан). В таких вариантах хлористо-водородная кислота может быть прибавлена в концентрации приблизительно 4 н, например, приблизительно 1 н, приблизительно 2 н, приблизительно 3 н, приблизительно 5 н, приблизительно 6 н, приблизительно 7 н, приблизительно 8 н, прибли-

тельно 9 н или приблизительно 10 н. В некоторых вариантах удаление защитной группы можно осуществлять в спирте (например, изопропанол). В некоторых вариантах Стадию М (схема 1) можно осуществлять при температуре от приблизительно -10°C до приблизительно 60°C, например, от приблизительно -10°C до приблизительно 0°C, от приблизительно 0°C до приблизительно 25°C, от приблизительно 25°C до приблизительно 45°C или от приблизительно 45°C до приблизительно 60°C.

Защита амидоксима в форме оксадиазолоната может быть подходящей для предупреждения побочных реакций гидроксильной группы или амидоксима в целом. Основание может быть органическим основанием, например, ациклическим амином (например, триэтиламин, диизопропилэтиламин (ДИПЭА) и т.п.) или циклическим амином (например, пирролидин, пиперидин и т.п.); или неорганическим основанием, например, щелочью (например, NaOH, LiOH, KOH, Mg(OH)₂ и т.п.). Основание может быть сделано доступным в форме смолы (например, Amberlite® и т.п.). В некоторых других вариантах основание может присутствовать в форме раствора в воде, например, приблизительно 2 н раствора (например, приблизительно 0,5 н раствора, приблизительно 1 н раствора, приблизительно 1,5 н раствора, приблизительно 2,5 н раствора, от приблизительно 3 н до приблизительно 5 н раствора, от приблизительно 5 н до приблизительно 10 н раствора). В некоторых вариантах основание представляет собой гидроксид щелочного металла (например, гидроксид натрия). В некоторых вариантах основание может представлять собой 2 н раствор NaOH в воде. В некоторых вариантах растворитель может быть метанолом или тетрагидрофураном (ТГФ). В некоторых вариантах Стадию N (схема 1) можно осуществлять при температуре от приблизительно -10°C до приблизительно 60°C, например, от приблизительно -10°C до приблизительно 0°C, от приблизительно 0°C до приблизительно 25°C, от приблизительно 25°C до приблизительно 45°C или от приблизительно 45°C до приблизительно 60°C.

Способы применения

Соединение по изобретению могут ингибировать активность фермента индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO). Например, соединение по изобретению могут быть применены для ингибирования активности IDO в клетке или в организме индивидуума, который нуждается в модуляции фермента, путем введения ингибирующего количества соединения по изобретению.

В данном изобретении дополнительно предлагаются способы ингибирования разложения триптофана в системе, содержащей клетки, которые экспрессируют IDO, например, в ткани, живом организме или культуре клеток. В некоторых вариантах данного изобретения предлагаются способы изменения (например, увеличения) внеклеточных уровней триптофана у млекопитающего путем введения эффективного количества соединения или композиции, предложенной в данном описании. Способы измерения уровней триптофана и разложения триптофана шаблонно известны из уровня техники.

В данном изобретении дополнительно предлагаются способы ингибирования иммуносупрессии, например, опосредствованной IDO иммуносупрессии у больного путем введения больному эффективного количества соединения или композиции, заявленной в данном изобретении. Опосредствованная IDO иммуносупрессия связана, например, с различными видами рака, ростом опухоли, метастазом, вирусной инфекцией, репликацией вируса и т.п.

В данном изобретении дополнительно предлагаются способы лечения заболеваний, связанных с активностью или экспрессией, в том числе аномальной активностью и/или избыточной экспрессией IDO у индивидуума (например, больного) путем введения индивидууму, который нуждается в таком лечении, терапевтически эффективного количества или дозы соединения по данному изобретению или его фармацевтической композиции. Примеры заболеваний могут включать любое заболевание, расстройство или состояние, которое прямо или косвенно связано с экспрессией или активностью фермента IDO, например, избыточной экспрессией или аномальной активностью. Связанное с IDO заболевание может также включать какое-либо заболевание, расстройство или состояние, которое может быть предупреждено, облегчено или излечено путем модуляции активности фермента. Примеры связанных с IDO заболеваний включают рак, вирусную инфекцию, например, ВИЧ-инфекцию, инфекцию вирусом гепатита С, депрессию, нейродегенеративные расстройства, например, болезнь Альцгеймера и болезнь Хантингтона, травму, возрастную катаракту, пересадку органа (например, отторжение пересаженного органа), и аутоиммунные заболевания, в том числе астму, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, аллергическое воспаление, воспалительное заболевание кишечника, псориаз и красную системную волчанку. Примеры разных видов рака, которые поддаются лечению способами по данному изобретению, включают рак ободочной и прямой кишки, поджелудочной железы, молочной железы, предстательной железы, легкого, мозга, яичника, шейки матки, яичка, почки, головы и шеи, лимфому, лейкоз, меланому и т.п. Соединение по изобретению могут также быть пригодными для лечения ожирения и ишемии.

В данном описании термин "клетка" обозначает клетку, которая находится *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. В некоторых вариантах клетка *ex vivo* может быть частью образца ткани, полученного из организма, например, млекопитающего. В некоторых вариантах клетка *in vivo* может быть клеткой в культуре клеток. В некоторых вариантах клетка *in vivo* представляет собой клетку, живущую в организме, например, млекопитающего.

В данном описании термин "обеспечение контакта" ("контакт") обозначает сочетание указанных фрагментов в системе *in vitro* или в системе *in vivo*. Например, "контакт" фермента IDO с соединением

по изобретению включает введение соединения по данному изобретению индивидууму или больному, например, человеку, организм которого содержит IDO, а также, например, введение соединения по изобретению в образец, содержащий клеточный или очищенный препарат, который содержит фермент IDO.

В данном описании термины "индивидуум" или "больной" ("пациент") употребляются равнозначным образом и обозначают любое животное, в том числе млекопитающих, предпочтительно мышей, крыс, других грызунов, кроликов, собак, кошек, свиней, крупный рогатый скот, овец, коней или приматов, и, наиболее предпочтительно, человека.

В данном описании фраза "терапевтически эффективное количество" обозначает количество активного соединения или фармацевтического средства, которое вызывает биологический или медицинский ответ в ткани, системе, организме животного, индивидууму или человека, предусмотренный исследователем, ветеринаром, врачом или другим клиническим специалистом.

В данном описании термин "лечение" обозначает: 1) профилактику заболевания; например, профилактику заболевания, состояния или расстройства у индивидуума, который может быть склонным к заболеванию, состоянию или расстройству, но еще не испытывает или у которого не проявляется патология или симптомы заболевания; 2) подавление заболевания; например, подавление заболевания, состояния или расстройства у индивидуума, который испытывает или у которого проявляется патология или симптомы заболевания, состояния или расстройства (т.е. остановка последующего развития патологии и/или симптомов заболевания); или 3) улучшение состояния при заболевании; например, облегчение заболевания, состояния или расстройства у индивидуума, который испытывает или у которого проявляется патология или симптомы заболевания, состояния или расстройства (т.е. обращение патологии и/или симптомов).

Комбинированная терапия

Одно или больше дополнительных фармацевтических средств или способов лечения, таких как, например, противовирусные агенты, химиотерапевтические средства или другие противораковые средства, средства для усиления иммунитета, иммуносупрессанты, излучение, противоопухолевые и противовирусные вакцины, терапия цитокинами (например, IL2, GM-CSF и т.п.), и/или ингибиторы тирозинкиназы могут применяться в комбинации с соединениями по данному изобретению для лечения связанных с IDO заболеваний, расстройств или состояний. Средства могут быть объединены с данными соединениями в однодозовой лекарственной форме, или средства могут быть введены одновременно или последовательно в виде отдельных лекарственных форм.

Подходящие противовирусные агенты, предусмотренные для применения в комбинации с соединениями по данному изобретению, могут включать нуклеозидные и нуклеотидные ингибиторы обратной транскриптазы (НИОТ), ненуклеозидные ингибиторы обратной транскриптазы (ННИОТ), ингибиторы протеазы и другие противовирусные лекарственные средства.

Примеры пригодных НИОТ включают зидовудин (AZT); диданозин (ddI); зальцитабин (ddC); ставудин (d4T); ламивудин (3TC); абакавир (1592U89); адефовир дипивоксил [бис-(POM)-PMEA]; лобукавир (BMS-180194); BCH-10652; эмитрицитабин [(-)-FTC]; бета-L-FD4 (также носит название бета-L-D4C и бета-L-2',3'-дифторокси-5-фторцитиден); ДАФД, ((-)-бета-D-2,6-диамино-пурина диоксолан); и лоденозин (FddA). Типичные подходящие ННИОТ включают невирапин (BI-RG-587); делавирдин (BNAF, U-90152); эфавиренц (DMP-266); PNU-142721; AG-1549; MKC-442 (1-(этоксиметил)-5-(1-метилэтил)-6-(фенилметил)-2,4(1H,3H)-пиримидиндион); и (+)-каланолд А (NSC-675451) и В. Типичные подходящие ингибиторы протеазы включают саквинавир (Ro 31-8959); ритонавир (ABT-538); индинавир (MK-639); нелфинавир (AG-1343); ампренавир (141W94); лазинавир (BMS-234475); DMP-450; BMS-2322623; ABT-378; и AG-1 549. Другие противовирусные агенты включают гидроксимочевину, рибавирин, IL-2, IL-12, пентафузид и Yissum Project № 11607.

Подходящие химиотерапевтические и другие противораковые средства включают, например, алкилирующие средства (в том числе, не ограничиваясь ими, ипритный азот, производные этиленимина, алкилсульфонаты, производные нитрозомочевины и триазены), например, ипритный урацил, хлорметин, циклофосфамид (CytoxanTM), ифосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, пипоброман, триэтилен-меламин, триэтилендиотфосфорамин, бусульфан, кармустин, ломустин, стрептозоцин, дакарбазин и темозоломид.

При лечении меланомы, подходящие средства для применения в комбинации с соединениями по данному изобретению включают: дакарбазин (DTIC), необязательно, вместе с другими химиотерапевтическими лекарственными средствами, например, кармустином (BCNU) и цисплатином; "Дартмутскую схему", которая состоит из DTIC, BCNU, цисплатина и тамоксифена; комбинацию цисплатина, винбластина и DTIC; или темозоломид. В лечении меланомы соединения по изобретению также могут быть объединены с иммунотерапевтическими лекарственными средствами, в том числе цитокинами, например, интерфероном альфа, интерлейкином 2 и фактором некроза опухоли (ФНП).

При лечении меланомы соединения по изобретению также могут применяться в комбинации с терапией вакцинами. Вакцины против меланомы определенным образом подобны противовирусным вакцинам, которые применяются для предупреждения заболеваний, вызванных вирусами, таких как полиомиелит, корь и свинка. Ослабленные клетки меланомы или части клеток меланомы под названием антигены могут быть введены инъекционно больному с целью стимуляции иммунной системы организма для

уничтожения клеток меланомы.

Меланому, распространенность которой ограничена руками или ногами, также можно лечить комбинацией средств, в том числе одного или больше соединений по изобретению, с применением техники гипертермической перфузии изолированной конечности. Этот протокол лечения позволяет временно изолировать кровообращение в пораженной конечности от остальной части организма и осуществить инъекционное введение высоких доз химиотерапевтических препаратов в артерию, снабжающую конечность, таким образом обеспечивая высокие дозы для участка опухоли без влияния указанных доз на внутренние органы, что могло бы вызвать тяжелые побочные реакции. В целом, жидкость нагревают до 102-104°F. Мелфалан представляет собой лекарственное средство, которое чаще всего применяют в данной методике химиотерапии. Он может быть введен с другим средством, которое носит название фактора некроза опухоли (ФНО) (см. раздел относительно цитокинов).

Подходящие химиотерапевтические или другие противораковые средства включают, например, антиметаболиты (в том числе, не ограничиваясь ими, антагонисты фолиевой кислоты, аналоги пиримидина, аналоги пурина и ингибиторы аденозиндеаминазы), например, метотрексат, 5-фторурацил, флоксурин, цитарабин, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, флу达拉бина фосфат, пентостатин и гемцитабин.

Подходящие химиотерапевтические или другие противораковые средства дополнительно включают, например, некоторые природные продукты и их производные (например, алкалоиды барвинка, противоопухолевые антибиотики, ферменты, лимфокины и эпиподофиллотоксины), например, винбластин, винкристин, виндезин, блеомицин, дактиномицин, даунорубин, доксорубин, эпирубин, идарубин, ара-С, паклитаксел (Таксол™), митрамицин, дезоксикоформицин, митомицин-С, L-аспарагиназу, интерфероны (особенно IFN-α), этопозид и тенипозид.

Другие цитотоксические средства включают навельбин, СРТ-11, анастрозол, летрозол, капецитабин, релоксафин, циклофосфамид, ифосфамид и дролоксафин.

Также пригодными являются цитотоксические средства, например, эпиподофиллотоксин; антинеопластический фермент; ингибитор топоизомеразы; прокарбазин; митоксантрон; координационные комплексы платины, например, цисплатин и карбоплатин; модификаторы биологического ответа; ингибиторы роста; антигормональные терапевтические средства; лейковорин; тегафур; и гемопоэтические факторы роста.

Другое противораковое средство(а) включает терапевтические антитела, например, трастузумаб (Герцептин), антитела к костимулирующим молекулам, например, CTLA-4, 4-1BB и PD-1, или антитела к цитокину (IL-10, TGF-β и т.п.).

Другие противораковые средства также включают блокирующие миграцию иммунных клеток, например, антагонисты рецепторов хемокинов, в том числе CCR2 и CCR4.

Другие противораковые средства также включают усиливающие иммунную систему, например, адьюванты или адаптивный перенос Т-клеток.

Противораковые вакцины включают дендритные клетки, синтетические пептиды, ДНК вакцины и рекомбинантные вирусы.

Способы безопасного и эффективного введения большинства указанных химиотерапевтических средств известны специалистам в данной области. Кроме того, их введение описано в стандартной литературе. Например, введение многих химиотерапевтических средств описано в "Physicians' Desk Reference" (PDR, например, издание 1996 г., Medical Economics Company, Montvale, NJ), которая включена в данное описание путем ссылки во всей ее полноте.

Фармацевтические композиции и лекарственные формы

Для получения твердых композиций, например, таблеток, основной активный ингредиент смешивают с фармацевтическим вспомогательным веществом для образования твердой композиции премикса, содержащей гомогенную смесь соединения по данному изобретению. Если считать указанные композиции премикса гомогенными, активный ингредиент обычно диспергирован равномерно в композиции таким образом, что композиция может быть легко разделена на одинаково эффективные единицы лекарственной формы, например, таблетки, пилюли и капсулы. Такой твердый премикс далее разделяют на единицы лекарственной формы описанного выше типа, содержащие, например, от 0,1 до приблизительно 500 мг активного ингредиента по данному изобретению.

Таблетки или пилюли по данному изобретению могут быть покрыты покрытиями или в другой способ изготовлены таким образом, чтобы получить лекарственную форму, обеспечивающую преимущество пролонгированного действия. Например, таблетка или пилюля может включать внутреннюю дозу и внешний компонент дозы, где последний присутствует в форме оболочки над первым. Два компонента могут быть разделены кишечнорастворимым слоем, который служит для защиты от разложения в желудке и позволяет прохождение внутреннего компонента в неповрежденном виде в двенадцатиперстную кишку или его замедленное высвобождение. Различные материалы могут применяться для такого кишечнорастворимого слоя или покрытия, среди таких материалов целый ряд полимерных кислот и смесей полимерных кислот с такими материалами как шеллак, цетиловый спирт и ацетат целлюлозы.

Терапевтические дозы соединения по данному изобретению могут варьировать в соответствии, на-

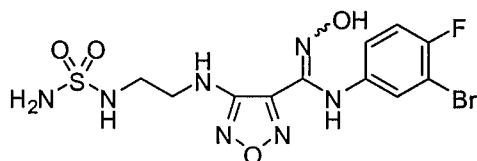
пример, с конкретным показанием, для которого назначено лечение, способом введения соединения, состоянием здоровья и патологическим состоянием больного и решением врача. Доля или концентрация соединения по изобретению в фармацевтической композиции может варьировать в зависимости от целого ряда факторов, в том числе дозировки, химических свойств (например, гидрофобность) и способа введения. Например, соединение по изобретению могут быть предоставлены в водном буферизованном физиологическом растворе, содержащем от приблизительно 0,1 до приблизительно 10% мас./об. соединения для парентерального введения. Некоторые типичные интервалы дозы составляют от приблизительно 1 мг/кг до приблизительно 1 г/кг массы тела в сутки. В некоторых вариантах интервал дозы составляет от приблизительно 0,01 мг/кг до приблизительно 100 мг/кг массы тела в сутки. Вероятно, дозы будут зависеть от таких переменных, как вид и степень прогрессирования заболевания или расстройства, общее состояние здоровья конкретного пациента, относительная биологическая эффективность выбранного соединения, состав вспомогательных веществ и способ введения. Эффективные дозы могут быть экстраполированы на базе кривых "доза-реакция", полученных в результате исследований *in vitro* или на животных моделях.

Соединение по изобретению может также быть введено в комбинации с одним или больше дополнительных активных ингредиентов, которые могут включать какое-либо фармацевтическое средство, например, противовирусные средства, вакцины, антитела, средства для усиления иммунитета, иммуносупрессанты, противовоспалительные средства и т.п.

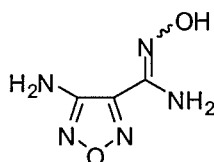
Примеры

Пример 1

4-({2-[(Аминосульфонил)амино]этил}амино)-N-(3-бром-4-фторфенил)-N'-гидрокси-1,2,5-оксадиазол-3-карбоксимидаид

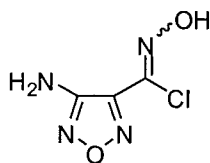


Стадия А. 4-Амино-N'-гидрокси-1,2,5-оксадиазол-3-карбоксимидаид



Малононитрил [Aldrich, продукт № M1407] (320,5 г, 5 моль) добавляют к воде (7 л) нагревают до 45°C и перемешивают в течение 5 мин. Полученный раствор охлаждают на ледяной бане и добавляют натрия нитрит (380 г, 5,5 моль). Когда температура достигает 10°C, добавляют 6 н раствор хлористоводородной кислоты (55 мл). Происходит умеренно экзотермическая реакция, и температура достигает 16°C. После 15 мин охлаждающую баню удаляют и реакционную смесь перемешивают в течение 1,5 ч при 16-18°C. Реакционную смесь охлаждают до 13°C и добавляют 50% водный раствор гидроксиламина (990 г, 15 моль) в виде одной порции. Температуру увеличивают до 26°C. После окончания экзотермической реакции охлаждающую баню удаляют и перемешивание продолжают в течение 1 ч при 26-27°C, затем реакционную смесь медленно нагревают до кипения с обратным холодильником. Кипячение с обратным холодильником продолжают в течение 2 ч и затем реакционную смесь охлаждают в течение ночи. Реакционную смесь перемешивают на ледяной бане и добавляют порциями 6 н раствор хлористоводородной кислоты (800 мл) в течение 40 мин до достижения pH 7,0. Перемешивание продолжают на ледяной бане при 5°C. Остаток собирают фильтрованием, тщательно промывают водой и сушат под вакуумом (50°C) с получением целевого продукта (644 г, 90%). ЖХМС для C₃H₆N₃O₂ (M+H)⁺: соотношение массы к заряду = 144,0. ¹³C ЯМР (75 МГц, CD₃OD): δ 156,0, 145,9, 141,3.

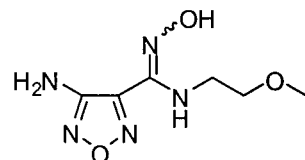
Стадия В. 4-Амино-N-гидрокси-1,2,5-оксадиазол-3-карбоксимидаид хлорид



4-Амино-N'-гидрокси-1,2,5-оксадиазол-3-карбоксимидаид (422 г, 2,95 моль) добавляют к смеси воды (5,9 л), уксусной кислоты (3 л) и 6 н раствору хлористоводородной кислоты (1,475 л, 3 экв.) и суспензию перемешивают при 42-45°C до полного растворения. Добавляют натрия хлорид (518 г, 3 экв.) и раствор перемешивают на бане, которая содержит смесь лед/вода/метанол. Добавляют раствор натрия нитрита (199,5 г, 0,98 экв.) в воде (700 мл) в течение 3,5 ч, поддерживая температуру ниже 0°C. После

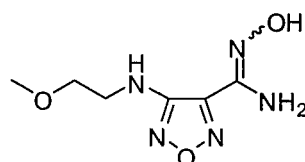
окончания добавления перемешивание продолжают на ледяной бане в течение 1,5 ч и затем реакционную смесь нагревают до 15°C. Осадок собирают фильтрованием, тщательно промывают водой, помещают в этилацетат (3,4 л), обрабатывают безводным натрия сульфатом (500 г) и перемешивают в течение 1 ч. Суспензию фильтруют сквозь натрия сульфат (200 г) и фильтрат упаривают на роторном вращающемся испарителе. Остаток растворяют в метил трет-бутиловом эфире (5,5 л), обрабатывают углем (40 г), перемешивают в течение 40 мин и фильтруют сквозь бромиллитерит. Растворитель удаляют с помощью роторного испарителя, и полученный продукт сушат под вакуумом (45°C) с получением целевого продукта (256 г, 53,4%). ЖХМС для $C_3H_4ClN_4O_2$ ($M+H$)⁺: соотношение массы к заряду = 162,9. ¹³C ЯМР (100 МГц, CD₃OD): δ 155,8, 143,4, 129,7.

Стадия С. 4-Амино-N'-гидрокси-N-(2-метоксиэтил)-1,2,5-оксадиазол-3-карбоксимидаид



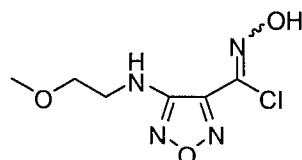
4-Амино-N-гидрокси-1, 2, 5-оксадиазол-3-карбоксимидаидхлорид (200,0 г, 1,23 моль) смешивают с этилацетатом (1,2 л). При 0-5°C 2-метоксиэтиламин [Aldrich, продукт № 143693] (119,0 мл, 1,35 моль) добавляют в виде одной порции при перемешивании. Температуру реакционной смеси увеличивают до 41°C. Реакционную смесь охлаждают до 0-5°C. Добавляют триэтиламин (258 мл, 1,84 моль). После перемешивания в течение 5 мин, ЖХМС показывает завершение реакции. Реакционную смесь промывают водой (500 мл) и рассолом (500 мл), сушат над натрия сульфатом и упаривают с получением целевого продукта (294 г, 119%) в виде темного неочищенного масла. ЖХМС для $C_6H_{12}N_5O_3$ ($M+H$)⁺: соотношение массы к заряду = 202,3. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 10,65 (с, 1H), 6,27 (с, 2H), 6,10 (т, J=6,5 Гц, 1H), 3,50 (м, 2H), 3,35 (д, J=5,8 Гц, 2H), 3,08 (с, 3H).

Стадия D. N'-Гидрокси-4-[(2-метоксиэтил)амино]-1,2,5-оксадиазол-3-карбоксимидаид



4-Амино-N'-гидрокси-N-(2-метоксиэтил)-1,2,5-оксадиазол-3-карбоксимидаид (248,0 г, 1,23 моль) смешивают с водой (1 л). Добавляют калия гидроксид (210 г, 3,7 моль). Реакционную смесь кипятят с обратным холодильником при 100°C, выдерживая при этой температуре в течение ночи (15 ч). Данные ТСХ с использованием 50% раствора этилацетата (содержащего 1% аммония гидроксида) в гексане показывают завершение реакции (для продукта Rf=0,6, для исходного материала Rf=0,5). ЖХМС также показывает завершение реакции. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры и экстрагируют этилацетатом (3×1 л). Объединенные растворы этилацетата сушат над натрия сульфатом и упаривают с получением целевого продукта (201 г, 81%) в виде неочищенного твердого вещества практически белого цвета. ЖХМС для $C_6H_{12}N_5O_3$ ($M+H$)⁺: соотношение массы к заряду = 202,3. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 10,54 (с, 1H), 6,22 (с, 2H), 6,15 (т, J=5,8 Гц, 1H), 3,45 (т, J=5,3 Гц, 2H), 3,35 (м, 2H), 3,22 (с, 3H).

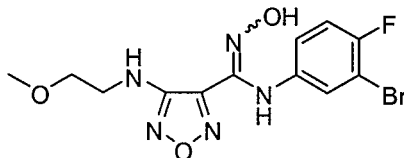
Стадия E. N-Гидрокси-4-[(2-метоксиэтил)амино]-1,2,5-оксадиазол-3-карбоксимидаид хлорид



При комнатной температуре N'-гидрокси-4-[(2-метоксиэтил)амино]-1,2,5-оксадиазол-3-карбоксимидаид (50,0 г, 0,226 моль) растворяют в 6,0 М водном растворе хлористо-водородной кислоты (250 мл, 1,5 моль). Добавляют натрия хлорид (39,5 г, 0,676 моль) с последующим добавлением воды (250 мл) и этилацетата (250 мл). При 3-5°C предварительно подготовленный водный раствор (100 мл) натрия нитрита (15,0 г, 0,217 моль) медленно добавляют в течение 1 ч. Реакционную смесь перемешивают при 3-8°C, выдерживая при этой температуре в течение 2 ч и затем при комнатной температуре в течение уик-энда. ЖХМС показывает завершение реакции. Реакционную смесь экстрагируют этилацетатом (2×200 мл). Объединенные растворы этилацетата сушат над натрия сульфатом и упаривают с получением целевого продукта (49,9 г, 126%) в виде неочищенного твердого вещества белого цвета. ЖХМС для $C_6H_{10}ClN_4O_3$ ($M+H$)⁺: соотношение массы к заряду = 221,0. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 13,43 (с, 1H), 5,85 (т, J=5,6 Гц, 1H), 3,50 (т, J=5,6 Гц, 2H), 3,37 (д, J=10,8, 5,6 Гц, 2H), 3,25 (с, 3H).

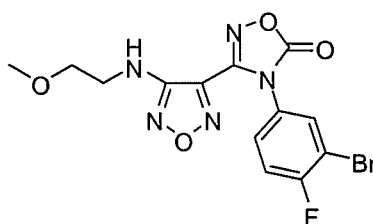
Стадия F. N-(3-Бром-4-фторфенил)-N'-гидрокси-4-[(2-метоксиэтил)амино]-1,2,5-оксадиазол-3-кар-

боксимидамид



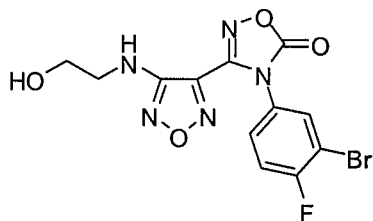
N-Гидрокси-4-[(2-метоксиэтил)амино]-1,2,5-оксадиазол-3-карбоксимидоилхлорид (46,0 г, 0,208 моль) смешивают с водой (300 мл). Смесь нагревают до 60°C. Добавляют 3-бром-4-фторанилин [Oakwood products, продукт № 013091] (43,6 г, 0,229 моль) и перемешивают в течение 10 мин. Добавляют нагретый раствор (300 мл воды) натрия бикарбоната (26,3 г, 0,313 моль) в течение 15 мин. Реакционную смесь перемешивают при 60°C, выдерживая при этой температуре в течение 20 мин. ЖХМС показывает завершение реакции. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры и экстрагируют этилацетатом (2×300 мл). Объединенные растворы этилацетата сушат над натрия сульфатом и упаривают с получением целевого продукта (76,1 г, 98%) в виде неочищенного твердого вещества коричневого цвета. ЖХМС для $C_{12}H_{14}BrFN_5O_3$ ($M+H$)⁺: соотношение массы к заряду = 374,0, 376,0. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 11,55 (с, 1H), 8,85 (с, 1H), 7,16 (т, J=8,8 Гц, 1H), 7,08 (дд, J=6,1, 2,7 Гц, 1H), 6,75 (м, 1H), 6,14 (т, J=5,8 Гц, 1H), 3,48 (т, J=5,2 Гц, 2H), 3,35 (дд, J=10,8, 5,6 Гц, 2H), 3,22 (с, 3H).

Стадия G. 4-(3-Бром-4-фторфенил)-3-{4-[(2-метоксиэтил)амино]-1,2,5-оксадиазол-3-ил}-1,2,4-оксадиазол-5(4H)-он



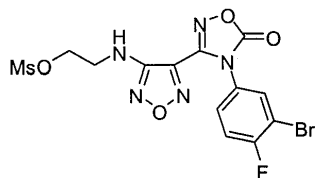
Смесь N-(3-бром-4-фторфенил)-N'-гидрокси-4-[(2-метоксиэтил)амино]-1,2,5-оксадиазол-3-карбоксимидамида (76,5 г, 0,204 моль), 1,1'-карбонилдидиимидазола (49,7 г, 0,307 моль) и этилацетата (720 мл) нагревают до 60°C и перемешивают в течение 20 мин. ЖХМС показывает завершение реакции. Реакционную смесь охлаждают до комнатной температуры, промывают 1 н раствором HCl (2×750 мл), сушат над натрия сульфатом и упаривают с получением целевого продукта (80,4 г, 98%) в виде неочищенного твердого вещества коричневого цвета. ЖХМС для $C_{13}H_{12}BrFN_5O_4$ ($M+H$)⁺: соотношение массы к заряду = 400,0, 402,0. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 7,94 (т, J=8,2 Гц, 1H), 7,72 (дд, J=9,1, 2,3 Гц, 1H), 7,42 (м, 1H), 6,42 (т, J=5,7 Гц, 1H), 3,46 (т, J=5,4 Гц, 2H), 3,36 (т, J=5,8 Гц, 2H), 3,26 (с, 3H).

Стадия H. 4-(3-Бром-4-фторфенил)-3-{4-[(2-гидроксиэтил)амино]-1,2,5-оксадиазол-3-ил}-1,2,4-оксадиазол-5(4H)-он



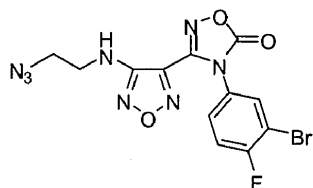
4-(3-Бром-4-фторфенил)-3-{4-[(2-метоксиэтил)амино]-1,2,5-оксадиазол-3-ил}-1,2,4-оксадиазол-5(4H)-он (78,4 г, 0,196 моль) растворяют в дихлорметане (600 мл). При -67°C добавляют бора трибромид (37 мл, 0,392 моль) в течение 15 мин. Реакционную смесь нагревают до -10°C в течение 30 мин. ЖХМС показывает завершение реакции. Реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1 ч. При 0-5°C реакционную смесь медленно гасят насыщенным раствором натрия бикарбоната (1,5 л) в течение 30 мин. Температуру реакционной смеси повышают до 25°C. Реакционную смесь экстрагируют этилацетатом (2×500 мл, органическая фракция, которая экстрагируется первой, - на дне, и органическая фракция, которая экстрагируется второй, - сверху). Объединенные органические фракции сушат над натрия сульфатом и упаривают с получением целевого продукта (75 г, 99%) в виде неочищенного твердого вещества коричневого цвета. ЖХМС для $C_{12}H_{10}BrFN_5O_4$ ($M+H$)⁺: соотношение массы к заряду = 386,0, 388,0. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 8,08 (дд, J=6,2, 2,5 Гц, 1H), 7,70 (м, 1H), 7,68 (т, J=8,7 Гц, 1H), 6,33 (т, J=5,6 Гц, 1H), 4,85 (т, J=5,0 Гц, 1H), 3,56 (дд, J=10,6, 5,6 Гц, 2H), 3,29 (дд, J=11,5, 5,9 Гц, 2H).

Стадия I. 2-({4-[4-(3-Бром-4-фторфенил)-5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил]-1,2,5-оксадиазол-3-ил}амино)этилметансульфонат



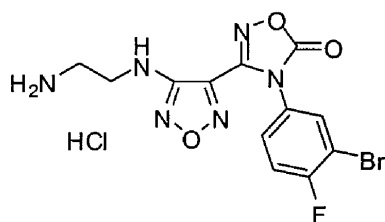
К раствору 4-(3-бром-4-фторфенил)-3-{4-[(2-гидроксиэтил)амино]-1,2,5-оксадиазол-3-ил}-1,2,4-оксадиазол-5(4Н)-она (1,5 кг, 3,9 моль, содержит также некоторое количество бромсодержащего соединения) в этилацетате (12 л) добавляют метансульфонилхлорид (185 мл, 2,4 моль) по каплям в течение 1 ч при комнатной температуре. Триэтиламин (32,5 мл, 2,3 моль) добавляют по каплям в течение 45 мин, во время чего температуру реакционной смеси повышают до 35°C. По прохождении 2 ч реакционную смесь промывают водой (5 л), раствором соли (1 л), сушат над натрия сульфатом, объединяют еще с тремя объемами такой же реакционной смеси и растворители удаляют под вакуумом с получением целевого продукта (7600 г, количественный выход) в виде твердого вещества рыжевато-коричневого цвета. ЖХМС для $C_{13}H_{11}BrFN_5O_6SNa$ ($M+Na$)⁺: соотношение массы к заряду = 485,9, 487,9. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 8,08 (дд, J=6,2, 2,5 Гц, 1H), 7,72 (м, 1H), 7,58 (т, J=8,7 Гц, 1H), 6,75 (т, J=5,9 Гц, 1H), 4,36 (т, J=5,3 Гц, 2H), 3,58 (дд, J=11,2, 5,6 Гц, 2H), 3,18 (с, 3H).

Стадия J. 3-{4-[(2-Азидоэтил)амино]-1,2,5-оксадиазол-3-ил}-4-(3-бром-4-фторфенил)-1,2,4-оксадиазол-5(4Н)-он



К раствору 2-({4-[4-(3-бром-4-фторфенил)-5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил]-1,2,5-оксадиазол-3-ил}амино)этил метансульфоната (2,13 кг, 4,6 моль, который содержит также некоторое количество бромсодержащего соединения) в диметилформамиде (4 л) при перемешивании в 22 л колбе добавляют натрия азид (380 г, 5,84 моль). Реакционную смесь нагревают до 50°C, выдерживая при этой температуре в течение 6 ч, выливают в смесь лед/вода (8л) и экстрагируют смесью этилацетат/гептан (20 л, 1:1). Органическую фракцию промывают водой (5 л) и раствором соли (5л) и растворители удаляют под вакуумом с получением целевого продукта (1464 г, 77%) в виде твердого вещества рыжевато-коричневого цвета. ЖХМС для $C_{12}H_8BrFN_8O_3Na$ ($M+Na$)⁺: соотношение массы к заряду = 433,0, 435,0. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 8,08 (дд, J=6,2, 2,5 Гц, 1H), 7,72 (м, 1H), 7,58 (т, J=8,7 Гц, 1H), 6,75 (т, J=5,7 Гц, 1H), 3,54 (т, J=5,3 Гц, 2H), 3,45 (дд, J=11,1, 5,2 Гц, 2H).

Стадия K. 3-{4-[(2-Аминоэтил)амино]-1,2,5-оксадиазол-3-ил}-4-(3-бром-4-фторфенил)-1,2,4-оксадиазол-5(4Н)-он гидрохлорид

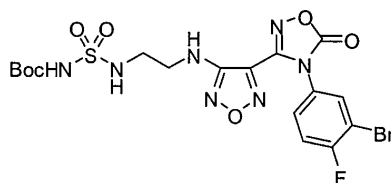


Натрия йодид (1080 г, 7,2 моль) добавляют к 3-{4-[(2-азидоэтил)амино]-1,2,5-оксадиазол-3-ил}-4-(3-бром-4-фторфенил)-1,2,4-оксадиазол-5(4Н)-он (500 г, 1,22 моль) в метаноле (6 л). Смесь перемешивают в течение 30 мин, и в ходе этого периода происходит умеренное выделение тепла. Добавляют по каплям хлортриметилсилан (930 мл, 7,33 моль) в виде раствора в метаноле (1 л) с такой скоростью, чтобы температура не превышала 35°C, и реакционную смесь перемешивают в течение 3,5 ч при комнатной температуре. Реакционную смесь нейтрализуют 33 мас.% раствором натрия тиосульфата пентагидрата в воде (~1,5 л), разбавляют водой (4 л) и pH доводят до 9 осторожным добавлением твердого калия карбоната (250 г добавляют маленькими порциями: наблюдается образование пены). Добавляют ди-трет-бутилдикарбонат (318 г, 1,45 моль) и реакционную смесь перемешивают при комнатной температуре. Дополнительное количество калия карбоната (200 г) добавляют порциями по 50 г в течение 4 ч, чтобы убедиться, что pH составляет приблизительно или выше 9. После перемешивания при комнатной температуре в течение ночи, твердое вещество фильтруют, растирают с водой (2 л) и затем с МТБЭ (1,5 л). Всего осуществляют 11 таких циклов (5,5 кг, 13,38 моль). Объединенные твердые вещества растирают со смесью ТГФ/дихлорметан (24 л, 1:1, 4 цикла в колбе роторного испарителя объемом 20 л, 50°C, 1 ч), фильтруют и промывают дихлорметаном (по 3 л каждый цикл) с получением твердого вещества практически белого цвета. Неочищенный материал растворяют при 55°C тетрагидрофураном (5 мл/г), обраба-

тывают обесцвечивающим углем (2 мас.%) и силикагелем (2 мас.%) и фильтруют в горячем состоянии сквозь брουνмиллерит с получением продукта в виде твердого вещества практически белого цвета (5122 г). Объединенные фильтраты МТБЭ, ТГФ и дихлорметан упаривают под вакуумом и хроматографируют (2 кг силикагеля, гептан с градиентом 0-100% этилацетата, 30 л) с получением дополнительной порции продукта (262 г). Объединенные твердые вещества сушат до получения требуемой массы в конвекционной печи (5385 г, 83%).

В колбу объемом 22 л помещают водорода хлорид (4 н раствор в 1,4-диоксане, 4 л, 16 моль). Добавляют порциями трет-бутил-[2-(4-[4-(3-бром-4-фторфенил)-5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил]-1,2,5-оксадиазол-3-ил)аминоэтил]карбамат (2315 г, 4,77 моль) в виде твердого вещества в течение 10 мин. Суспензию перемешивают при комнатной температуре, и она постепенно превращается в густую пасту, которую невозможно перемешивать. После стояния в течение ночи при комнатной температуре, пасту суспендируют в этилацетате (10 л), фильтруют, повторно суспендируют в этилацетате (5 л), фильтруют и сушат до получения требуемой массы, с получением целевого продукта в виде твердого вещества белого цвета (объединяют с продуктами других циклов, использовали 5 кг исходного материала, 4113 г, 95%). ЖХМС для $C_{12}H_{11}BrFN_6O_3$ ($M+H$)⁺: соотношение массы к заряду = 384,9, 386,9. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 8,12 (м, 4H), 7,76 (м, 1 ч), 7,58 (т, J=8,7 Гц, 1 ч), 6,78 (т, J=6,1 Гц, 1 ч), 3,51 (дд, J=11,8, 6,1 Гц, 2H), 3,02 (м, 2H).

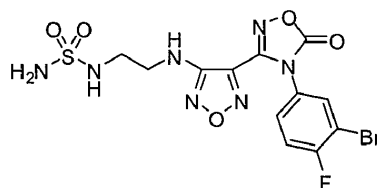
Стадия L. трет-Бутил-([2-(4-[4-(3-бром-4-фторфенил)-5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил]-1,2,5-оксадиазол-3-ил)аминоэтил]амино)сульфонилкарбамат



Круглодонную колбу объемом 5 л помещают хлорсульфонилозиоцианат [Aldrich, продукт № 142662] (149 мл, 1,72 моль) и дихлорметан (1,5 л) и охлаждают с использованием ледяной бани до 2°C. Добавляют по каплям трет-бутанол (162 мл, 1,73 моль) в дихлорметане (200 мл) с такой скоростью, чтобы температура не превысила 10°C. Полученный раствор перемешивают при комнатной температуре в течение 30-60 мин с получением трет-бутил-[хлорсульфонил]карбамата.

В колбу объемом 22 л помещают 3-{4-[(2-аминоэтил)амино]-1,2,5-оксадиазол-3-ил}-4-(3-бром-4-фторфенил)-1,2,4-оксадиазол-5(4H)-она гидрохлорид (661 г, 1,57 моль) и 8,5 л дихлорметана. После охлаждения до -15°C на бане лед/соль, добавляют раствор трет-бутил [хлорсульфонил]карбамата (полученный, как описано выше) с такой скоростью, чтобы температура не превысила -10°C (вреда добавления 7 мин). После перемешивания в течение 10 мин, добавляют триэтиламин (1085 мл, 7,78 моль) с такой скоростью, чтобы температура не превысила 5°C (время добавления 10 мин). Охлаждающую баню удаляют, реакционную смесь нагревают до 10°C, делят на две порции и нейтрализуют 10% конц. раствором HCl (4,5 л каждая порция). Каждую порцию переносят в делительную лейку объемом 50 л и разбавляют этилацетатом до образования раствора твердого вещества белого цвета (~25 л). Слои разделяют и органическую фракцию промывают водой (5 л), раствором соли (5 л) и растворители удаляют под вакуумом с получением твердого вещества практически белого цвета. Твердое вещество растирают с МТБЭ (2×1,5 л) и сушат до получения требуемой массы с получением твердого вещества белого цвета. Таким же образом обрабатывают общее количество исходного материала 4113 г (5409 г, 98 %). ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-d₆): δ 10,90 (с, 1H), 8,08 (дд, J=6,2, 2,5 Гц, 1H), 7,72 (м, 1H), 7,59 (т, J=8, 6 Гц, 1H), 6,58 (т, J=5,7 Гц, 1H), 3,38 (дд, J=12,7, 6,2 Гц, 2H), 3,10 (дд, J=12,1, 5,9 Гц, 2H), 1,41 (с, 9H).

Стадия M. N-[2-(4-[4-(3-Бром-4-фторфенил)-5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил]-1,2,5-оксадиазол-3-ил)амино)этил]сульфамид



В колбу объемом 22 л, содержащую смесь трифторуксусная кислота/вода (8,9 л, 98:2), порциями добавляют трет-бутил ([2-(4-[4-(3-бром-4-фторфенил)-5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил]-1,2,5-оксадиазол-3-ил)аминоэтил]амино)сульфонилкарбамат (1931 г, 3,42 моль) в течение 10 мин. Полученную смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 1,5 ч, растворители удаляют под вакуумом и перегоняют дихлорметаном (2 л). Полученное твердое вещество обрабатывают второй раз новой смесью трифторуксусная кислота/вода (8,9 л, 98:2), нагревают в течение 1 ч до 40-50°C, растворители удаляют под вакуумом и перегоняют дихлорметаном (3×2 л). Полученное твердое вещество белого цвета

сушат под вакуумом при 50°C, выдерживая при этой температуре в течение ночи. Всего таким способом было обработано 5409 г (4990 г, количественный выход). ЖХМС для $C_{12}H_{12}BrFN_7O_5S$ ($M+H$)⁺: соотношение массы к заряду = 463,9, 465,9. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 8,08 (дд, J=6,2, 2,5 Гц, 1H), 7,72 (м, 1H), 7,59 (т, J=8,7 Гц, 1H), 6,67 (т, J=5,9 Гц, 1H), 6,52 (т, J=6, 0 Гц, 1H), 3,38 (дд, J=12,7, 6,3 Гц, 2H), 3,11 (дд, J=12,3, 6,3 Гц).

Стадия N. 4-(2-((Аминосульфонил)амино)этил)амино)-N-(3-бром-4-фторфенил)-N'-гидрокси-1,2,5-оксадиазол-3-карбоксимидамид

К неочищенной смеси N-[2-({4-[4-(3-бром-4-фторфенил)-5-оксо-4,5-дигидро-1,2,4-оксадиазол-3-ил]-1,2,5-оксадиазол-3-ил}амино)этил]сульфамида (2,4 моль), содержащей остаточное количество трифторуксусной кислоты, при перемешивании в колбу объемом 22 л добавляют ТГФ (5 л). Полученный раствор охлаждают до 0°C с использованием ледяной бани, добавляют 2 н раствор NaOH (4 л) с такой скоростью, чтобы температура не превысила 10°C. После перемешивания при комнатной температуре в течение 3 ч (ЖХМС показывает отсутствие исходного материала), pH доводят до 3-4 концентрированием HCl (~500 мл). ТГФ удаляют под вакуумом и полученную смесь экстрагируют этилацетатом (15 л). Органическую фракцию промывают водой (5 л), раствором соли (5 л) и растворители удаляют под вакуумом с получением твердого вещества. Твердое вещество растирают с МТБЭ (2×2 л), объединяют с тремя другими реакционными смесями такого же объема и сушат в течение ночи в конвекционной печи с получением твердого вещества белого цвета (3535 г). Твердое вещество перекристаллизируют (3×22 л колба, смесь вода/этанол, 2:1, 14,1 л каждая колба) и сушат в конвекционной печи при температуре 50°C до получения требуемой массы названного в заголовке соединения в виде твердого вещества практически белого цвета (3290 г, 78%). ЖХМС для $C_{11}H_{14}BrFN_7O_4S$ ($M+H$)⁺: соотношение массы к заряду = 437,9, 439,9. ¹H ЯМР (400 МГц, ДМСО-d₆): δ 11,51 (с, 1H), 8,90 (с, 1H), 7,17 (т, J=8,8 Гц, 1H), 7,11 (дд, J=6,1, 2,7 Гц, 1H), 6,76 (м, 1H), 6,71 (т, J=6,0 Гц, 1H), 6,59 (с, 2 H), 6,23 (т, J=6,1 Гц, 1H), 3,35 (дд, J=10,9, 7,0 Гц, 2H), 3,10 (дд, J=12,1, 6,2 Гц, 2H).

Конечный продукт представляет собой безводное кристаллическое твердое вещество. Определенное содержание воды меньше 0,1% титрования по методу Карла Фишера. Получены данные рентгеноструктурного анализа порошка (РГАП) (дифрактометр для порошков Rigaku MiniFlex; Cu при 1,054056 Å с фильтром КВ; начальный угол = 3, угол остановки = 45, отбор образца = 0,02, скорость сканирования = 2) и представлены на фиг. 1. Перечень 2-тета пиков приведен в табл. 1 ниже. Интервал температуры плавления твердого вещества определен на приборе Mettler Toledo Differential Scanning Calorimetry (DSC, DSC) 822. Образец нагревали от 40°C до 240°C со скоростью нагревания 10°C на мин. Термограмма DSC (фиг. 2) демонстрирует T_{onset} при 162,7°C и T_{peak} при 163,8°C. Термогравиметрический анализ (ТГА, TGA) (фиг. 3) показывает потери в массе 0,3% при нагревании от 20°C до 150°C при скорости нагревания 10°C/мин с использованием прибора TA Q500.

Таблица 1

2-Тета	Высота	Н, %
3,9	74	1,1
7,2	119	1,8
13,4	180	2,8
14,0	150	2,3
15,9	85	1,3
18,4	903	13,9
18,9	1469	22,7
21,3	519	8
21,8	6472	100

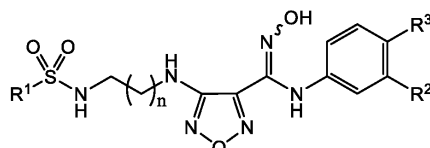
22,7	516	8
23,9	2515	38,9
24,8	804	12,4
25,3	182	2,8
27,4	476	7,4
28,6	354	5,5
29,2	1767	27,3
29,9	266	4,1
30,6	773	11,9
31,2	379	5,8
31,6	291	4,5
32,7	144	2,2
33,5	221	3,4
36,4	469	7,2
37,6	152	2,3
38,7	1381	21,3
41,0	153	2,4
42,1	382	5,9
43,6	527	8,1
44,4	1080	16,7

Пример 24

Данные соединений

Физические характеристики и данные биологической активности для соединения из примера 1 представлены в табл. 2 ниже. Данные IC₅₀ получены в результате анализа, описанного в примере А.

Таблица 2



Пример №	R ¹	R ²	R ³	n	IDO IC ₅₀ (нМ)	МС [M+H]
1	NH ₂	Br	F	1	<200	

Пример 26

Данные ЯМР

Данные ¹H ЯМР (спектрометр Varian Inova 500, спектрометр Mercury 400 или спектрометр Varian (или Mercury) 300) для соединения из примера 1 представлены в табл. 4 ниже.

Таблица 4

Пример №	Растворитель	МГц	Спектры ¹ H ЯМР
1	DMCO-d ₆	400	δ 11,5 (с, 1H), 8,89 (с, 1H), 7,17 (дд, J=8,8, 8,6 Гц, 1H), 7,09 (дд, J=6,1, 2,7 Гц, 1H), 6,76-6,72 (м, 1H), 6,56 (дд, J=6,1, 6,1 Гц, 1H), 6,51 (с, 2H), 6,17 (дд, J=5,9, 5,9 Гц, 1H), 3,27-3,21 (м, 2H), 2,94-2,88 (м, 2H), 1,78-1,71 (м, 2H)

Пример А. Анализ человеческого фермента индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO)

Человеческую индоламин-2,3-диоксигеназу (IDO) с N-концевой меткой His экспрессируют в E. coli и очищают до гомогенного состояния. IDO катализирует окислительное расщепление пиррольного кольца индольного ядра триптофана с образованием N'-формилкинурина. Анализы осуществляют при комнатной температуре, как описано в литературе, с использованием 95 нМ IDO и 2 мМ D-Trp в присутствии 20 мМ аскорбата, 5 мМ метиленового синего и 0,2 мг/мл каталазы в 50 мМ калий-фосфатном буфере

(рН 6,5). Начальные скорости реакции регистрируют, непрерывно измеряя рост оптической плотности на длине волны 321 нм за счет образования N'-формилкинурина (см. Sono, M., et al., 1980, J. Biol. Chem. 255, 1339-1345).

Пример Б. Определение ингибирующей активности в клеточном анализе индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO)/кинурина с использованием клеток HeLa

Клетки HeLa (#CCL-2) были получены от Американской Коллекции типичных культур ткани (ATCC, Manassas, VA), их шаблононо содержат в минимальной эссенциальной среде (Игла), содержащей 2 мМ L-глутамина, и осуществляют коррекцию сбалансированного солевого раствора Эрла до концентрации 1,5 г/л натрия бикарбоната, 0,1 мМ заменимых аминокислот, 1 мМ натрия пирувата и 10% сыворотки телячьего эмбриона (все от Invitrogen). Клетки содержат при температуре 37°C в увлажненном инкубаторе, содержащем 5% CO₂. Анализ осуществляют, как указано ниже. Клетки HeLa высевают на 96-луночные планшеты для культивирования с плотностью 5×10³/лунку и культивируют на протяжении ночи. На следующий день IFN-γ (конечная концентрация 50 нг/мл) и серийные разведения соединений (в общем объеме 200 мл питательной среды) добавляют к клеткам. Через 48 ч инкубации, 140 мл супернатанта из каждой лунки переносят на новые 96-луночные планшеты. 10 мл 6,1 н раствора трихлоруксусной кислоты (#T0699, Sigma) смешивают с содержимым каждой лунки и инкубируют при 50°C на протяжении 30 мин для гидролиза N-формилкинурина, образованного под действием индоламин-2,3-диоксигеназы, до кинурина. Реакционную смесь далее центрифугируют на протяжении 10 минут при 2500 об/мин для удаления осадка. 100 мл супернатанта из каждой лунки переносят на другие 96-луночные планшеты и смешивают с 100 мл 2% (мас./об.) п-диметиламинобензальдегида (#15647-7, Sigma-Aldrich) в уксусной кислоте. Оптическую плотность в результате желтого цвета кинурина измеряют на длине волны 480 нм с использованием устройства для считывания микропланшетов SPECTRA-max 250 (Molecular Devices). L-Кинурин (#K8625, Sigma) используют как стандартный образец. Стандартные растворы (240; 120; 60; 30; 15; 7,5; 3,75; 1,87 мМ) готовят в 100 мл питательной среды и смешивают с равным объемом 2% (мас./об.) п-диметиламинобензальдегида. Определяют процент ингибирования для отдельных концентраций, и вычисляют средние значения для двойных повторений. Данные были проанализированы с применением нелинейной регрессии для получения значений IC₅₀ (Prism Graphpad). См. Takikawa O. et al., 1988, J. Biol. Chem., 263(4): 2041-8.

Пример В. Определение влияния ингибиторов IDO на пролиферацию Т-клеток, подавляемую дендритными клетками, экспрессирующими IDO

Моноциты получают лейкофerezом из моноядерных клеток периферической крови человека. Далее моноциты высевают с плотностью 1×10⁶ клеток/лунку в 96-луночные планшеты, используя среду RPMI 1640 с добавлением 10% сыворотки телячьего эмбриона и 2 мМ L-глутамина (все от Invitrogen). Прикрепленные клетки содержат на планшете после культивирования в течение ночи при температуре 37°C. Прикрепленные моноциты далее стимулируют на протяжении 5-7 дней с помощью 100 нг/мл GM-CSF (#300-03, PeproTech) и 250 нг/мл IL-4 (#200-04, PeproTech), с последующей активацией 5 мкг/мл липополисахарида Salmonella typhimurium (#437650, Sigma) и 50 нг/мл IFN-γ (#285-IF, R&D Systems) на протяжении дополнительных 2 дней для индукции созревания дендритных клеток.

После активации дендритных клеток, среду заменяют на полную среду RPMI 1640 с добавлением 100-200 Ед IL-2 (#CYT-209, ProSpec-Tany TechnoGene) и 100 нг/мл анти-CD3 антитела (#555336, Pharmingen), Т-клеток (2-3×10⁵ клеток/лунку) и серийных разведений соединений IDO. После инкубации еще на протяжении 2 дней пролиферацию Т-клеток измеряют анализом инкорпорации BrdU с помощью колориметрического набора ELISA для определения пролиферации клеток в соответствии с инструкцией производителя (#1647229, Roche Molecular Biochemicals). Клетки непрерывно культивируют на протяжении 16-18 ч в присутствии 10 мМ раствора метки BrdU. Далее, среду с меткой удаляют, 200 мл FixDenat/лунку добавляют к клеткам и инкубируют на протяжении 30 мин при комнатной температуре. Раствор FixDenat удаляют, и добавляют 100 мл/лунку рабочего раствора конъюгата анти-BRDU антитела/POD. Реакцию осуществляют на протяжении 90 мин при комнатной температуре. Конъюгированное антитело далее удаляют, и клетки трижды споласкивают 200 мл/лунку раствора для промывания. В конце добавляют 100 мл/лунку раствора субстрата, и результаты считывают с помощью прибора для считывания микропланшетов (Spectra Max PLUS, Molecular Devices) в ходе развития окрашивания. Множественные значения в разных точках времени получают для гарантии того, что данные находятся в пределах линейного интервала. Данные были шаблононо получены в результате повторяемых экспериментов, и были включены соответствующие средства контроля. См. Terness P, et al. 2002, J. Exp. Med., 196(4): 447-57; и Hwu, P. et al. 2000, J. Immunol., 164(7): 3596-9.

Пример Г. Тестирование in vivo ингибиторов IDO на предмет противоопухолевой активности

Противоопухолевая эффективность in vivo может быть проверена с применением модифицированных протоколов аллотрансплантата/ксенотрансплантата опухоли. Например, в литературе описано, что эффект ингибирования IDO может быть синергетическим с цитотоксической химиотерапией у иммунокомпетентных мышей (Muller, A.J., et al. 2005, Nat. Med. 11:312-319). Было показано, что такой синергизм зависит от Т-клеток, путем сравнения синергетического действия исследуемого ингибитора IDO на

мышинных моделях ксенотрансплантата опухолей (например, B16 и родственные варианты, CT-26, LLC), выращенных в организме сингенных иммунокомпетентных мышей, с действием, наблюдающимся у сингенных мышей, которых лечат нейтрализующими анти-CD4 антителами, или таких же опухолей, выращенных у иммуноскомпрометированных мышей (например, nu/nu).

Концепция дифференциального противоопухолевого действия у иммунокомпетентных против иммуноскомпрометированных мышей также может позволять проверку исследуемых ингибиторов IDO как монотерапии. Например, опухоли LLC хорошо растут у сингенной породы хозяев, C57B1/6. Однако, если таких мышей лечат ингибитором IDO 1-MT (по сравнению с плацебо), образование опухолей заметно замедляется, показывая, что ингибирование IDO задерживает рост (Friberg, M., et al. 2002, *Int. J. Cancer* 101:151-155). Следуя данной логике, можно исследовать эффективность ингибирования IDO на модели ксенотрансплантата опухоли LLC, выращенной у иммунокомпетентных мышей C57B1/6, и сравнивать с влиянием ингибиторов IDO на рост опухоли LLC у голых или SCID мышей (или мышей C57B1/6, которые получают антитела, нейтрализующие активность Т-клеток). Поскольку эффект уменьшения опосредствованной опухолью иммуносупрессорной активности IDO, вероятно, будет различаться в зависимости от иммуногенного потенциала разных моделей опухоли, генетические модификации могут быть осуществлены в клетках опухоли, чтобы увеличить их иммуногенный потенциал. Например, экспрессия GM-CSF в клетках B16.F10 увеличивает их иммуногенный потенциал (Dranoff, G., et al. 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 90:3539-3543). Таким образом, в некоторых моделях опухолей (например, B16.F10) можно генерировать [поли]клоны, которые экспрессируют иммуностимулирующие белки, такие как GM-CSF, и проверять тормозящее рост влияние ингибиторов IDO против опухолей, образованных из таких опухолевых клеток как у иммунокомпетентных, так и иммуноскомпрометированных мышей.

Третья магистраль для оценки эффективности ингибиторов IDO *in vivo* заключается в использовании "доиммунизационных" мышинных моделей аллотрансплантата опухоли. В таких моделях иммунокомпетентных мышей сенсibilизируют к специфическому антигену или антигенам опухоли, чтобы имитировать терапевтическую противоопухолевую вакцинацию. Это обуславливает опосредствованную иммунной системой противоопухолевую реакцию у мышей при последующей нагрузке линиями клеток мышинных опухолей (содержащих опухолевые антигены, сходные с примененными для иммунизации) в экспериментах с использованием ксенотрансплантатов. Показано, что экспрессия IDO подавляет противоопухолевую реакцию и позволяет ксенотрансплантатам расти быстрее. Важно, что рост опухолей в данной модели тормозится ингибитором IDO 1-MT (Uyttenhove, C. et al. 2003, *Nat. Med.* 9:1269-1274). Данная модель является особенно привлекательной, поскольку активность IDO позволяет рост опухоли P815, и, таким образом, специфическое ингибирование IDO должно тормозить рост. Наконец, терапевтическая иммунизация может быть использована для оценки влияния ингибиторов IDO *in vivo*. Например, это продемонстрировано с использованием клеток B16-BL6, при нагрузке мышей Blk/6 внутривенной инъекцией клеток опухоли, с последующим лечением хорошо описанным иммуногенным пептидом (например, TRP-2), который экспрессируется клетками опухоли (Ji, et al., 2005, *J. Immunol.* 175: 1456-63). Важно, что модификаторы иммунной системы, такие как анти-CTL-4 антитело, могут улучшать реакцию на такую терапевтическую иммунизацию. Влияние ингибиторов IDO может быть оценено подобным образом - иммунизацией опухолевым пептидом с или без ингибитора IDO. Эффективность оценивают по продолжительности жизни животных (период до возникновения заболевания) или по измерению метастазов опухоли в легких и/или других органах в определенной точке времени.

В любой/всех из вышеупомянутых моделей также может быть возможным непосредственное и/или не прямое измерение количества и/или активности реагирующих на опухоль иммунных клеток. Способы измерения количества и/или активности реагирующих на опухоль иммунных клеток хорошо описаны и могут выполняться с применением способов, известных специалистам в данной области (Current Protocols in Immunology, Vol. 4, Coligan, J.E. et al.; Immunotherapy of Cancer, Human Press, 2006, Disis, M.L. и процитированные в ней ссылки). Концептуально, уменьшение иммуносупрессорного влияния IDO может приводить к увеличению количества или реакционной способности специфических по отношению к опухоли иммунных клеток. Кроме того, ингибирование IDO может дополнительно увеличивать количество или реакционную способность реагирующих на опухоль иммунных клеток при сочетании с другим видом лечения, например химиотерапевтическими средствами и/или иммуномодуляторами (например, анти-CTLA4 антитело).

Все эксперименты с применением аллотрансплантатов могут выполняться с применением стандартных методов работы с опухолями (рассмотрены в Corbett, et al., In Cancer Drug Discovery and Development: Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval, 2nd Ed. Teicher, B.A. and Andrews, P.A., Humana Press Inc.: Totowa, NJ, 2004). Клонирование и введение генов (например, IDO, GM-CSF) в линии опухолевых клеток может быть осуществлено с применением способов, известных специалистам в данной области (рассмотрены в Sambrook, J. and Russel, D., Molecular Cloning: A laboratory Manual (3rd edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY, 2001).

Пример Д. Проверка *in vivo* ингибиторов IDO на модели энцефалита, вызванного вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ-1)

1. Выделение клеток и инфицирование вирусом

Моноциты и лейкоциты периферической крови могут быть получены центробежным сцеживанием пакетов для лейкофереза, полученных от серонегативных относительно ВИЧ-1, ВИЧ-2 и гепатита В доноров. Моноциты культивируют в суспензионной культуре с использованием колб Teflon в модифицированной Дульбекко среде Игла (МДСИ, Sigma-Aldrich) с добавлением 10% пула человеческой сыворотки, инактивированной нагреванием, 1% глутамина, 50 мг/мл гентамицина, 10 мг/мл ципрофлоксацина (Sigma) и 1000 Ед рекомбинантного человеческого колоннестимулирующего макрофагального фактора с высокой степенью чистоты. Через 7 дней культивирования, MDM инфицируют ВИЧ-1_{ADA} с кратностью инфекции 0,01.

2. Мыши Hu-PBL-NOD/SCID HIVE

Мыши-самцы NOD/C.B-17 SCID возрастом 4 недели могут быть приобретены (Jackson Laboratory). Животных содержат в стерильных клетках микроизолятора в свободных от патогенов условиях. Всем животным вводят инъекционным способом интраперитонеально крысиние анти-CD122 (0,25 мг/мышь) за 3 дня перед пересадкой PBL, и дважды вводят кроличьи асиало-GM1 антитела (0,2 мг/мышь) (Wako) за 1 день перед и через 3 дня после инъекции PBL (20×10^6 клеток/мышь). Инфицированные ВИЧ-1_{ADA} MDM (3×10^5 клеток в 10 мл) вводят инъекционным способом интракраниально через 8 дней после восстановления PBL, что дает мышам hu-PBL-NOD/SCID HIVE. Немедленно после интракраниальной инъекции инфицированные ВИЧ-1 MDM имплантируют мышам hu-PBL-NOD/SCID HIVE подкожно с контролем (растворитель) или гранулами соединения (замедленное высвобождение на протяжении 14 или 28 дней, Innovative Research). Начальные эксперименты разработаны таким образом, чтобы подтвердить индукцию специфического для вируса CTL у животных hu PBL-NOD/SCID HIVE, которых лечат соединениями IDO. Это подтверждают окрашиванием тетрамера и нейропатологическими анализами элиминации MDM из ткани мозга.

Далее эксперимент разработан таким образом, чтобы проанализировать восстановление лимфоцитов человека, гуморальные иммунные реакции и невропатологические изменения. В этих экспериментах у животных берут образцы крови на 7-й день и забивают на 14-й и 21-й дни после интракраниальной инъекции MDM человека. Кровь собирают в пробирки, содержащие ЭДТА и используют для проточной цитометрии, а плазму используют для выявления ВИЧ-1 p24 с помощью ELISA (Beckman Coulter™). Специфические антитела против ВИЧ-1 найдены методом Вестерн-блоттинга согласно инструкциям производителя (набор Western blot HIV-1 Cambridge Biotech, Calypte Biomedical). Подобное количество специфических антител против вируса найдено у контрольных и леченых соединением животных. Всего три независимых эксперимента могут быть выполнены с применением трех разных доноров человеческих лейкоцитов.

3. FACSscan периферической крови и селезенки мышей hu PBL-NOD/SCID HIVE

Двухцветный анализ FACS может выполняться на периферической крови на неделях 1-3 и на спленоцитах на неделях 2 и 3 после интракраниальной инъекции человеческих MDM. Клетки инкубируют с конъюгированными с флуорохромом моноклональными антителами (mAb) против человеческих CD4, CD8, CD56, CD3, IFN- γ (eBioscience) на протяжении 30 мин при температуре 4°C. Для оценки клеточной иммунной реакции, внутриклеточное окрашивание IFN- γ осуществляют в комбинации с античеловеческим CD8 и конъюгированным с FITC анти-мышинным CD45, чтобы исключить мышинные клетки. Для определения Ag-специфического CTL, окрашивание конъюгированного с аллофикоцианином тетрамера для ВИЧ-1GAG (p17 (aa77-85) SLYNTVATL, SL-9) и ВИЧ-1POL [(aa476-485) ILKEPVHGV, IL-9] выполняется на стимулированных фитогемагглютинином/интерлейкином-2 (PHA/IL-2) спленоцитах. Клетки окрашивают в соответствии с рекомендацией NIH/National Institute of Allergy and Infectious Disease, National Tetramer Core Facilities. Данные проанализированные с помощью FACS Calibur™ с применением программного обеспечения CellQuest (система иммуноцитометрии Becton Dickinson).

4. Гистопатологические анализы и анализы изображений Ткань мозга собирают через 14 и 21 день после интракраниальной инъекции MDM, фиксируют в 4% буферизованном фосфатом растворе параформальдегиде и монтируют в парафине или замораживают при -80°C для более позднего использования. Коронарные секции монтируемых блоков вырезают для идентификации места инъекции. Для каждой мыши, 30-100 (толщина 5 мкм) серийных секций вырезают из места инъекции человеческих MDM, и 3-7 срезов (с промежутком 10 секций) анализируют. Секции мозга депарафинизируют с помощью ксилена и гидратируют в градиентах спиртов. Иммуногистохимическое окрашивание выполняют в соответствии с основным непрямым протоколом, применяя демаскирование антигена нагреванием до 95°C в 0,01 моль/л цитратном буфере на протяжении 30 мин для демаскирования антигена. Для идентификации человеческих клеток в мозге мыши, применяют mAb против виментина (1:50, клон 3B4, Dako Corporation), которые позволяют идентифицировать все человеческие лейкоциты. Человеческие лимфоциты MDM и CD8+ обнаруживают с помощью антител против CD68 (разведение 1:50, клон KP 1) и CD8 (разведение 1:50, клон 144B) соответственно. Инфицированные вирусом клетки метят mAb против ВИЧ-1 p24 (1:10, клон Kal-1, все от Dako). Реакционноспособные мышинные клетки микроглии обнаруживают с помощью антитела Iba-1 (1:500, Wako). Экспрессию человеческого IDO (huIDO) визуализируют с помощью Ab,

полученных из Департамента фармакологии клетки,

Центрального исследовательского института Аспирантуры в области медицины, Университета Хоккайдо, Саппоро, Япония. Первичные антитела обнаруживают с помощью соответствующих биотинилированных вторичных антител и визуализируют с помощью комплексов авидин-биотин (набор Vectastain Elite ABC, Vector Laboratories) и пероксидазы хрена (HRP), сочетанной с полимером декстрана (Envision, Dako). Иммуноокрашенные секции противоположно окрашивают гематоксилином Mayer. Секции, из которых первичное антитело удалено или инкорпорирован иррелевантный изотип IgG, служат средствами контроля. Два независимых наблюдателя вслепую пересчитывают количества лимфоцитов CD8+, CD68+ MDM и клеток p24+ ВИЧ-1 в каждой секции от каждой мыши. Осмотр с помощью светового микроскопа выполняют с использованием микроскопа Nikon Eclipse 800 (Nikon Instruments Inc.). Полуколичественный анализ Iba1 (процент области, занятой иммуноокрашиванием) получают путем анализа изображения (Image-Pro® Plus, Media Cybernetics) с помощью компьютера, как описано выше.

5. Статистический анализ

Данные могут быть проанализированы с применением Prism (Graph Pad) с t-тестом Стьюдента для сравнения и ANOVA. Значение $P < 0,05$ считалось значимым.

6. Ссылка

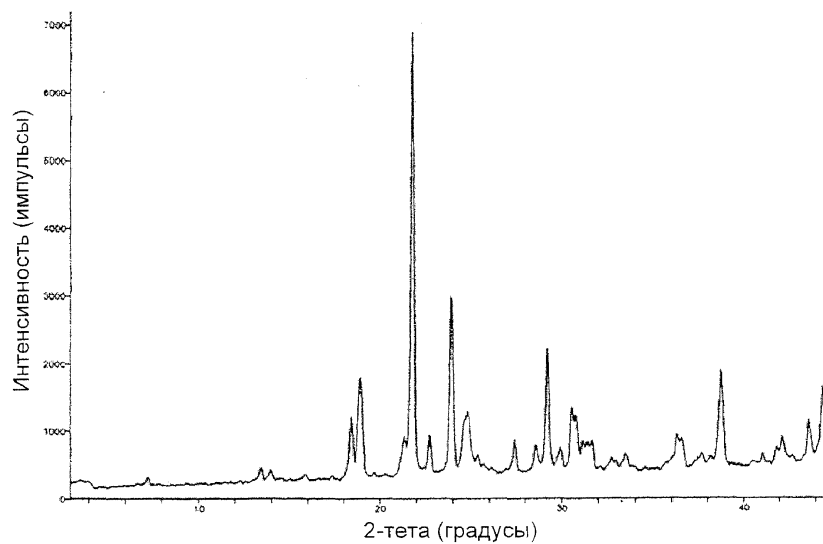
Poluektova L.Y., Munn D.H., Persidsky B., and Gendelman H.E. (2002). Generation of cytotoxic T cells against virus-infected human brain macrophages in a murine model of HIV-1 encephalitis. *J. Immunol.* 168(8):3941-9.

Различные модификации изобретения в дополнение к описанным в данном описании будут очевидными для специалистов в данной области на базе вышеизложенного описания. Предусматривается, что такие модификации также находятся в пределах контекста приложенной формулы изобретения. Каждая ссылка, в том числе все патенты, патентные заявки и публикации, процитированные в данной заявке, включены в данное описание путем ссылки во всей их полноте.

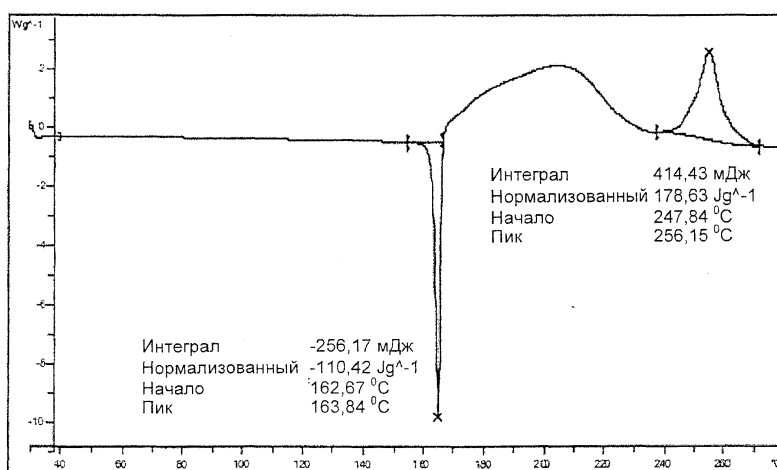
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Твердая дозированная форма, подходящая для перорального введения, содержащая 4-({2-[(аминосulьфонил)амино]этил}амино)-N-(3-бром-4-фторфенил)-N'-гидроксид-1,2,5-оксадиазол-3-карбоксимид или его фармацевтически приемлемую соль и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.
2. Твердая дозированная форма по п.1, где дозированная форма находится в единичной дозированной форме.
3. Твердая дозированная форма по п.1, где единичная дозированная форма представляет собой таблетку.
4. Твердая дозированная форма по любому из пп.1-3, где количество 4-({2-[(аминосulьфонил)амино]этил}амино)-N-(3-бром-4-фторфенил)-N'-гидроксид-1,2,5-оксадиазол-3-карбоксимидов в дозированной форме составляет от 0,1 до 500 мг.
5. Способ ингибирования иммуносупрессии у пациента, включающий введение указанному пациенту твердой дозированной формы по любому из пп.1-4.
6. Способ лечения рака, вирусной инфекции, депрессии, нейродегенеративного расстройства, травмы, возрастной катаракты или отторжения пересаженного органа или аутоиммунного расстройства у пациента, включающий введение указанному пациенту твердой дозированной формы по любому из пп.1-4.
7. Способ по п.6, где рак выбирают из рака яичников, рака молочной железы, меланомы, рака прямой кишки, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака легких, рака мозга, рака шейки матки, рака яичка, рака почки, рака головы и шеи, лимфомы и лейкемии.
8. Способ по п.6, где рак представляет собой рак яичников.
9. Способ по п.6, где рак представляет собой рак молочной железы.
10. Способ по п.6, где рак представляет собой меланому.
11. Способ по любому из пп.6-10, дополнительно включающий введение указанному пациенту противовирусного средства, химиотерапевтического средства, иммуносупрессанта, радиационное облучение, введение противоопухолевой вакцины, противовирусной вакцины, терапию цитокином или ингибитором тирозинкиназы.
12. Способ по п.11, где указанная терапия цитокином включает IL-2.
13. Способ по п.11, где указанное химиотерапевтическое средство представляет собой цитотоксическое средство.
14. Способ по любому из пп.6-10, дополнительно включающий введение указанному пациенту противораковой вакцины.
15. Способ по любому из пп.6-10, дополнительно включающий введение указанному пациенту анти-CTL-4 антитела.
16. Способ по любому из пп.6-10, дополнительно включающий введение указанному пациенту ан-

ти-PD-1-антитела.

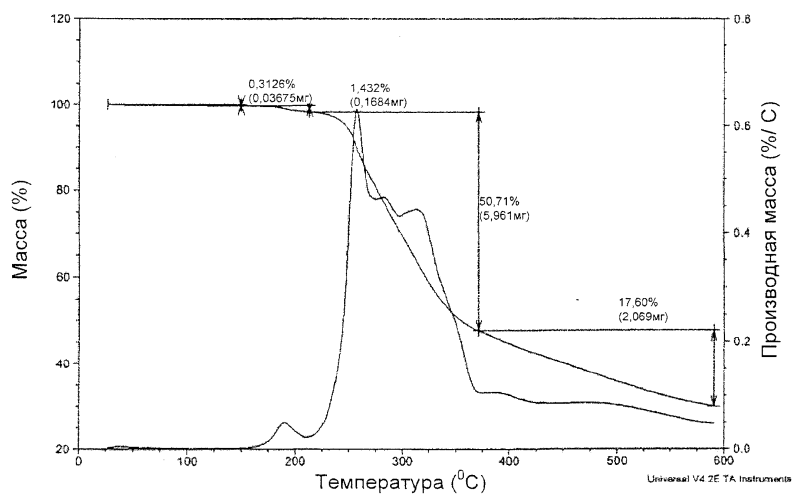


Фиг. 1



Фиг. 2

ТГА



Фиг. 3



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2