

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202191922 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.11.15

(51) Int. Cl. C07K 14/705 (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.01.10

(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

(31) 62/791,591; 62/886,235; 62/936,223;
62/946,631

(72) Изобретатель:
Чичирелли Майкл, Катшелл Нил С.,
Демопулос Грегори А., Гаитанарис
Джордж А., Гэвин Марк А., Грагеров
Александр, Литтл Томас Л., Онраст
Рене (US)

(32) 2019.01.11; 2019.08.13; 2019.11.15;
2019.12.11

(33) US

(86) PCT/US2020/013183

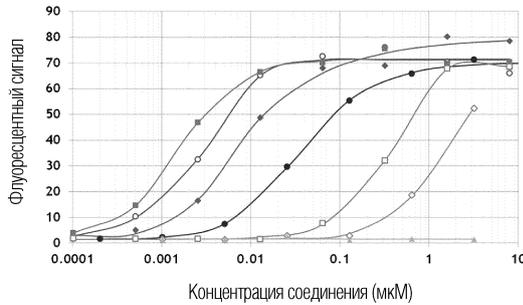
(87) WO 2020/146795 2020.07.16

(71) Заявитель:
ОМЕРОС КОРПОРЕЙШН (US)

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

(57) Настоящее изобретение относится к соединениям, композициям и способам для лечения различных заболеваний и/или состояний, связанных с сопряженным с G белком рецептором 174 (например, злокачественных опухолей).

Кривые зависимости ответа от дозы для стандартных соединений против рецептора CHRМ1



Соединение	Опубликованная активность (мкМ)
◆ Пропантелин	0.2
○ Атропин	0.5
■ Скополамин	1.0
● Пирензепин	5.0
□ ННС10	16.0
◇ Гимбацин	60 - 120
▲ Носитель	

A1

202191922

202191922

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-569609EA/050

СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По настоящей заявке испрашивается приоритет Предварительной патентной заявки США номер 62/791591, поданной 11 января 2019 г., Предварительной патентной заявки США номер 62/886235, поданной 13 августа 2019 г., Предварительной патентной заявки США номер 62/936223, поданной 15 ноября 2019 г., и Предварительной патентной заявки США номер 62/946631, поданной 11 декабря 2019 г. Полное содержание каждой из вышеуказанных родственных заявок приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

ПОЛОЖЕНИЕ ОТНОСИТЕЛЬНО СПИСКА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Список последовательностей, ассоциированный с этой заявкой, представлен в текстовом формате вместо бумажной копии, и его содержание, таким образом, включено в описание в качестве ссылки. Наименование текстового файла, содержащего список последовательностей, _____ представляет собой _____
OG_1_0294_US_Sequence_Listing_20200107_ST25.txt. Файл составляет 11 кБ; создан 7 января 2020 г.; и принят через EFS-Web при подаче описания.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к способам и соединениям для лечения злокачественных опухолей посредством введения субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора опосредованной сопряженным с G белком рецептором 174 (GPR174) передачи сигналов, или комбинации ингибитора опосредованной GPR174 передачи сигналов и ингибитора опосредованной АТФ-аденозин-А2аR или -А2bR передачи сигналов (такого как антагонист А2аR и/или антагонист А2bR, или комбинации ингибитора опосредованной GPR174 передачи сигналов и ингибитора ферментного пути, вовлеченного в продукцию аденозина, например, CD38, CD39 и/или CD73 (такого как ингибитор CD73 и/или ингибитор CD38, и/или ингибитор CD39), или ингибитора опосредованной GPR174 передачи сигналов и ослабляющего регуляторную Т-клетку (Т-рег) средства, таким образом, стимуляции иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта-млекопитающего, такого как субъект, страдающий злокачественной опухолью.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Сопряженные с G-белком рецепторы (GPCR) млекопитающих составляют суперсемейство разнообразных белков с сотнями членов. GPCR действуют в качестве рецепторов для множества различных сигналов. Сенсорные GPCR (spuG) представляют собой рецепторы для сенсорных сигналов внешнего происхождения, которые ощущаются как свет различных цветов, запахи, феромоны или вкусы. Большинство других GPCR отвечают на эндогенные сигналы, такие как пептиды, липиды, нейротрансмиттеры или нуклеотиды. GPCR, попадающие в последнюю группу, вовлечены в многочисленные

физиологические процессы, включая регуляцию нейрональной возбудимости, метаболизма, размножения, развития, деления клеток, гормонального гомеостаза и поведения, и подвергаются дифференциальной экспрессии во многих типах клеток в организме.

Лиганды идентифицированы для некоторых GPCR. GPCR, для которых еще не идентифицирован эндогенный или родственный лиганд, известны как орфанные GPCR. На время 2019 г., приблизительно 120 GPCR считали являющимися орфанными GPCR, включая GPR174 (см. «Orphan and other 7TM receptors, IUPHAR/BPS Guide to Pharmacology», accessed on 6/8/2019; Alexander S. et al., Br. J. Pharmacol. 174 Suppl 1:S17-S129, 2017). Из всех продаваемых в настоящее время на рынке лекарственных средств, 30-40% являются модуляторами специфических GPCR. Из приблизительно 240 неорфанных GPCR, более половины подвергают нацеливанию лекарственных средств, продаваемых на рынке или находящихся в настоящее время в клинической разработке (см. Hauser A.S. et al., Nature Reviews Drug Discovery 16(12):829-842, 2017).

Разработка лекарственного средства для нацеливания на специфический GPCR, как правило, требует знания эндогенного лиганда или суррогатного лиганда, т.е., неэндогенной молекулы, которая связывается и функционально взаимодействует со специфическим GPCR, которая может служить в качестве контроля для скрининга и/или в качестве основы для медицинской химии для разработки синтетических молекул лекарственного средства, которые функционально взаимодействуют с этим специфическим GPCR. Принимая во внимание потенциальное использование орфанных GPCR в качестве мишеней для новых лекарственных средств, идентификация лигандов или суррогатных лигандов для орфанных GPCR может ускорять развитие новых лекарственных средств для этих рецепторов. Однако, несмотря на значительные усилия для идентификации таких лигандов, остается большое количество орфанных рецепторов (см., например, Levoye et al., *Drug Discov. Today* 13(1-2):52-8, 2008). Общепринятые мероприятия по скринингу GPCR, как правило, основаны на скрининге для открытия лекарственного средства с использованием как биохимических, так и функциональных анализов, таких как анализы, измеряющих передачу сигналов Ca^{++} в ответ на активацию GPCR. Однако, эти общепринятые способы основаны на присутствии эндогенного лиганда или суррогатного лиганда. При использовании для орфанных GPCR, эти анализы могут идентифицировать только агонисты GPCR. С использованием общепринятой технологии анализа, ни обратные агонисты, ни антагонисты не могут быть идентифицированы, пока агонист не будет доступен. Важно, что многие одобренные FDA лекарственные средства, нацеленные на GPCR, представляют собой функциональные ингибиторы (например, частичные агонисты, обратные агонисты, частичные обратные агонисты или антагонисты). Таким образом, общепринятые способы пропускают детекцию этого общераспространенного и критического класса лигандов GPCR.

GPR174, также известный как FKSG79 и GPCR17, экспрессируется в относительно

небольшом количестве тканей, включая селезенку, тимус, костный мозг и лимфатический узел (Regard et al., *Cell* 135:561-71, 2008; Chu et al., *J Med Genet* 50:479-85, 2013; Sugita et al., *Biochem Biophys Res Commun* 430:190-5, 2013). В лимфоидных тканях, GPR174 экспрессируется до высоких уровней в наивных В- и Т-клетках, особенно в регуляторных Т-клетках (T-reg) (Barnes et al., *J Exp Med* 212:1011-20, 2015).

Как описано в настоящем описании, активность GPR174 была ассоциирована с злокачественной опухолью. Принимая во внимание роль, которую GPR174, по-видимому, играет в злокачественной опухоли, является желательным идентифицировать ингибиторы этого рецептора. В данной области существует необходимость в эффективных видах лечения злокачественных опухолей. Способы и композиции, представленные в настоящем описании, нацелены на эти и другие недостатки в данной области.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы настоящего изобретения идентифицировали химические соединения, которые функционально взаимодействуют с GPR174 и ингибируют один или несколько опосредованных GPR174 путей передачи сигналов и, кроме того, имеют охарактеризованный профиль передачи сигналов рецептора GPR174, который включает путь передачи сигналов Gs. Авторы изобретения показали, что репрезентативные ингибирующие GPR174 соединения являются способными уменьшать долю высоко супрессивных регуляторных Т-клеток или «Т-рег» (FoxP3+Helios+) в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC), человека, как описано в примерах 6, 8 и 9. Авторы настоящего изобретения, кроме того, определили, что ингибирование GPR174 стимулирует продукцию IL-2 зависимым от дозы образом в PBMC, как описано в примерах 6-11. Авторы настоящего изобретения определили также, что ингибирование GPR174 уменьшает экспрессию ассоциированного с иммунными лигандами-1 программируемой смерти (PD-L1), экспрессию ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами антигена 4 (CTLA4), экспрессию Т-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM (TIGIT), и экспрессию амфирегулина (AREG), как описано в примере 13 и 14. Таким образом, ингибирующие GPR174 соединения могут быть использованы в качестве лекарственных средств для использования в стимуляции иммунного ответа у субъекта-млекопитающего и могут формировать основу для дополнительных лекарственных средств. На основании этих открытий, настоящее изобретение относится к способам *in vivo* и *in vitro* ингибирования рецептора GPR174 и таким образом, стимуляции иммунного ответа, в частности, у субъекта, страдающего незлокачественной неоплазией или злокачественной неоплазией (т.е., злокачественной опухолью).

Как далее описано в настоящем описании, авторы настоящего изобретения также показали, что комбинированное ингибирование GPR174 и ингибирование рецептора аденозина 2a (A2aR) и/или ингибирование рецептора аденозина 2b (A2bR) приводит к синергической индукции продукции Th1-цитокина (например, IFN- γ , IL-2, TNF и GM-CSF) в PBMC человека, как описано в примерах 15, 18-23, 27 и 29.

Как далее описано в настоящем описании, авторы настоящего изобретения также показали, что рост опухоли карциномы ободочной кишки мыши и рост опухоли меланомы уменьшался у мышей с недостаточностью GPR174, подвергнутых лечению с использованием антитела против GITR (т.е., ослабляющего T-рег средства) по сравнению с мышами дикого типа, как описано в примерах 24 и 25.

Как далее описано в настоящем описании, авторы настоящего изобретения определили, что происходящие из клеток злокачественной опухоли экзосомы стимулируют GPR174, и ингибирование GPR174 в присутствии происходящих из клеток злокачественной опухоли экзосом увеличивает уровни Th1-цитокинов, таким образом, стимулируя и/или усиливая иммунную систему, как описано в примере 26.

В общем, как показано в настоящем описании, GPR174 представляет собой рестрицированный по иммунной системе сопряженный с Gαs GPCR, и PS, экспонированный на липосомах и клеточных мембранах, стимулирует GPR174, поддерживая модель опосредованной активным GPR174 иммуносупрессии в микроокружении опухолей. В условиях, когда присутствуют как PS/lysoPS, так и аденозин, ингибирование обеих осей является необходимым для эффективного восстановления функции T-клетки. Как далее показано в настоящем описании, недостаточность GPR174 усиливает противоопухолевые иммунные ответы у мышей.

Таким образом, в одном аспекте, настоящее изобретение относится к способам и композициям для стимуляции и/или усиления иммунного ответа (например, для лечения злокачественной опухоли) посредством введения субъекту, страдающему от или подверженному риску развития злокачественной опухоли или метастазирования злокачественной опухоли, терапевтически эффективного количества ингибитора опосредованной GPR174 передачи сигналов в форме одиночного средства или необязательно, в комбинации с ингибитором опосредованной АТР-аденозином-А2аR или -А2bR передачи сигналов (таким как антагонист А2аR, антагонист А2bR и/или ингибитор CD73, и/или ингибитор CD38, и/или ингибитор CD39, и/или ослабляющее T-рег средство, или их комбинация), таким образом, стимуляции и/или усиления иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта-млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение субъекту, страдающему злокачественной опухолью, ингибитора GPR174 и антагониста А2аR. В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение субъекту, страдающему злокачественной опухолью, ингибитора GPR174 и антагониста А2bR. В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение субъекту, страдающему злокачественной опухолью, ингибитора GPR174 и антагониста А2аR/А2bR. В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение субъекту, страдающему злокачественной опухолью, ингибитора GPR174 и ингибитора CD73. В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение субъекту, страдающему злокачественной опухолью, ингибитора GPR174 и ингибитора CD38. В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение субъекту,

страдающему злокачественной опухолью, ингибитора GPR174 и ингибитора CD39. В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение субъекту, страдающему злокачественной опухолью, ингибитора GPR174 и ослабляющего Т-рег средства. В некоторых вариантах осуществления, способы включают введение субъекту, страдающему злокачественной опухолью, ингибитора GPR174 и антагониста A2aR, и необязательно, по меньшей мере одного или нескольких из антагониста A2bR, ингибитора CD73, ингибитора CD38, ингибитора CD39 и ослабляющего Т-рег средства. В некоторых вариантах осуществления, антагонист A2aR представляет собой малую молекулу. В некоторых вариантах осуществления, антагонист A2aR представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления, антагонист A2aR представляет собой молекулу на основе пептида или нуклеотида/нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления, антагонист A2bR представляет собой малую молекулу. В некоторых вариантах осуществления, антагонист A2bR представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления, антагонист A2bR представляет собой молекулу на основе пептида или нуклеотида/нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор CD38 представляет собой малую молекулу. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор CD38 представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления, антагонист CD38 представляет собой молекулу на основе пептида или нуклеотида/нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор CD39 представляет собой малую молекулу. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор CD39 представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления, антагонист CD39 представляет собой молекулу на основе пептида или нуклеотида/нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор CD73 представляет собой малую молекулу. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор CD73 представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления, антагонист CD73 представляет собой молекулу на основе пептида или нуклеотида/нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления, ослабляющее Т-рег средство представляет собой малую молекулу. В некоторых вариантах осуществления, ослабляющее Т-рег средство представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления, ослабляющее Т-рег средство представляет собой молекулу на основе пептида или нуклеотида/нуклеиновой кислоты. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор GPR174 представляет собой малую молекулу. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор GPR174 представляет собой антитело. В некоторых вариантах осуществления способа, ингибитор GPR174, и по меньшей мере один или несколько из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и ослабляющего Т-рег средства вводят одновременно (например, совместно вводят отдельно или вместе), или последовательно в любом порядке, при условии, что эффекты первого введенного ингибитора остаются присутствующими на время введения второго (и необязательно третьего) ингибитора или ослабляющего средства.

Как далее описано в настоящем описании в примерах 16 и 17, авторы настоящего изобретения открыли также, что фосфатидилсерин (PS) является агонистом для опосредованной GPR174 передачи сигналов Gs. В примере 17 представлены экспериментальные результаты, показывающие, что апоптотические клетки стимулируют путь GPR174 передачи сигналов Gs в клетках, экспрессирующих GPR174. Как далее описано в примере 16 и показано на ФИГУРАХ 47A-47F, опосредованная PS передача через GPR174 сигналов Gs ингибируется посредством репрезентативных ингибирующих GPR174 соединений 6, 10, 11, 20, 23 и 30, которые принадлежат к различным химическим классам (т.е., группы I, II и IV). Эти данные показывают, что соединения 6, 10, 11, 20, 23 и 30 действуют в качестве антагонистов GPR174 и ингибируют опосредованную PS-липосомой передачу сигналов cAMP. Таким образом, передача сигналов PS-липосомой через GPR174 ингибируется посредством множества ингибирующих GPR174 низкомолекулярных соединений с разнообразными химическими структурами. Соответственно, в одном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к способу ингибирования опосредованной PS активации передачи через GPR174 сигналов Gs в иммуноците, экспрессирующем GPR174, включающему приведение указанного иммуноцита в контакт с ингибитором передачи через GPR174 сигналов Gs, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства. В одном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к способу стимуляции опосредованного T-клетками иммунитета у субъекта, страдающего злокачественной опухолью, включающему введение ингибитора GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, указанному субъекту в количестве, эффективном для стимуляции опосредованного T-клетками иммунитета, как описано в настоящем описании.

В другом варианте осуществления, настоящее изобретение относится к способу усиления противоопухолевого иммунного ответа у субъекта, которого в настоящее время подвергают или подвергали лечению с использованием по меньшей мере одного из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, включающему введение эффективного количества ингибитора GPR174 для стимуляции усиленного противоопухолевого иммунного ответа у субъекта, при условии, что использования ингибитора CD73, предпочтительно, избегают в ходе раннего формирования опухоли или в условиях метастазирования, из-за того факта, что может являться предпочтительным наличие CD73, остающегося активным в таких условиях.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способу стимуляции иммунного ответа у нуждающегося в этом пациента-млекопитающего,

включающему введение пациенту-млекопитающему низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, отдельно или в комбинации с ингибитором опосредованной АТФ-аденозин-А2аR или АТФ-аденозин-А2bR передачи сигналов (таким как антагонист А2аR, антагонист А2bR и/или ингибитор CD73, и/или ингибитор CD38, и/или ингибитор CD39) и/или ослабляющим Т-рег средством. В некоторых вариантах осуществления, ингибитор GPR174 ингибирует опосредованную GPR174 передачу сигналов через альфа-субъединицу Gs гетеротримерного G-белка, которая стимулирует зависимый от 3',5'-циклического аденозинмонофосфата (сАМР)-путь. Зависимый от сАМР путь (также обозначенный как передача сигналов Gs или путь Gs) включает синтез вторичного мессенджера сАМР, который, в свою очередь, активирует зависимую от сАМР протеинкиназу (протеинкиназу А или PKA).

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей комбинацию ингибитора передачи сигналов GPR174 и по меньшей мере одного или нескольких из антагониста рецептора аденозина А2А, антагониста рецептора аденозина А2В, ингибитора CD73 и/или ингибитора CD38, и/или ингибитора CD39 и фармацевтически приемлемый носитель.

В одном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей комбинацию ингибитора передачи сигналов GPR174 и ослабляющего Т-рег средства, и фармацевтически приемлемый носитель.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитор GPR174 представляет собой низкомолекулярный ингибитор, представляющий собой обратный агонист передачи сигналов GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, низкомолекулярный ингибитор представляет собой антагонист передачи сигналов GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, низкомолекулярный ингибитор ингибирует зависимую от фосфатидилсерина (PS) или лизофосфатидилсерина (LysoPS), или пепдуцина активацию передачи сигналов GPR174 в клетке, экспрессирующей GPR174, по меньшей мере на 25%.

В некоторых вариантах осуществления, стимулированный иммунный ответ включает опосредованный Т-клетками иммунный ответ.

В некоторых вариантах осуществления, опосредованный Т-клетками иммунный ответ включает супрессию активности, дифференцировки, роста и/или пролиферации Т-рег. В некоторых вариантах осуществления, опосредованный Т-клетками иммунный ответ включает стимуляцию активности, дифференцировки, роста и/или пролиферации Т-эффектора. В некоторых вариантах осуществления, опосредованный Т-клетками иммунный ответ включает стимуляцию активности, дифференцировки, роста и/или пролиферации Th1-клетки. В некоторых вариантах осуществления, опосредованный Т-клетками иммунный ответ включает супрессию активности, дифференцировки, роста и/или пролиферации Th17-клетки. В одном варианте осуществления, опосредованный Т-

клетками иммунный ответ включает предпочтительный рост и активацию эффекторных Т-клеток, по сравнению с регуляторными Т-клетками, получая в результате относительное уменьшение частоты, распространенности и/или функции регуляторных Т-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, стимулированный иммунный ответ включает уменьшение экспрессии ассоциированного с иммуноцитами или злокачественными клетками лиганда 1 программируемой смерти (PD-L1) или экспрессии ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами антигена 4 (CTLA4), или экспрессии Т-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM (TIGIT), или экспрессии амфирегулина (AREG).

В некоторых вариантах осуществления, стимулированный иммунный ответ включает опосредованный NK-клетками иммунный ответ. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере часть Т-клеток или NK-клеток экспрессируют GPR174. В некоторых вариантах осуществления, опосредованный NK-клетками иммунный ответ включает стимуляцию функции, активности, дифференцировки, роста и/или пролиферации NK-клеток.

В некоторых вариантах осуществления, стимулированный иммунный ответ и/или усиленный иммунный ответ включает увеличение продукции Th1-цитокина в присутствии происходящих из клеток злокачественной опухоли экзосом.

В некоторых вариантах осуществления, пациент страдает неоплазией или является носителем неоплазии, не узнаваемой организмом как собственная. В некоторых вариантах осуществления, неоплазия представляет собой незлокачественную неоплазию, такую как незлокачественная опухоль. В некоторых вариантах осуществления, неоплазия представляет собой злокачественную опухоль. В некоторых вариантах осуществления, неоплазия (либо злокачественная, либо незлокачественная опухоль) содержит инфильтрат Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, клетки опухолей разрушаются посредством иммунного ответа, стимулированного посредством ингибирующего GPR174 соединения, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего Т-рег средства.

В некоторых вариантах осуществления, пациент представляет собой пациента с злокачественной опухолью. В некоторых вариантах осуществления, пациент-млекопитающее представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль клеток крови. В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль является такой, как описано в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, по меньшей мере часть клеток злокачественных опухолей экспрессируют GPR174. В некоторых вариантах осуществления, GPR174 имеет 90% или большую идентичность последовательности с SEQ ID NO:1.

В некоторых вариантах осуществления, активность, дифференцировку, пролиферацию и/или рост Т-клеток стимулируют в популяции моноклеарных клеток периферической крови (РВМС), приведенных в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174 либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего Т-рег средства, по сравнению с контрольной популяцией РВМС, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, фракция FoxP3⁺Helios⁺ Т-клеток (регуляторных Т-клеток) уменьшена по меньшей мере на 20% в популяции РВМС, приведенных в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего Т-рег средства, по сравнению с контрольной популяцией РВМС, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, уровень сАМР уменьшен по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 75% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего Т-рег средства, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, активность протеинкиназы А (РКА) уменьшена по меньшей мере на 20% в клетках, экспрессирующих GPR174, приведенных в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего Т-рег средства, по сравнению с контрольной клеткой, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, активность РКА уменьшена по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 75% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего Т-рег средства, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, продукция одного или нескольких из IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-6 и IL-10 увеличена по меньшей мере на 20% в моноклеарных клетках

периферической крови (PBMC), приведенных в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174, по сравнению с контрольными клетками, не приведенными в контакт с низкомолекулярным ингибитором.

В некоторых вариантах осуществления, продукция одного или нескольких из IL-2, IFN- γ , TNF- α и GM-CSF увеличена по меньшей мере на 20% в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC), приведенных в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174 в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с контрольными клетками, не приведенными в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, продукция IL-17A уменьшена по меньшей мере на 20% в PBMC, приведенных в контакт с низкомолекулярным ингибитором, по сравнению с контрольными клетками, не приведенными в контакт с низкомолекулярным ингибитором.

В некоторых вариантах осуществления, продукция одного или нескольких цитокинов уменьшена по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 80% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, по сравнению с популяцией PBMC, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, продукция IL-17A уменьшена по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 80% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, по сравнению с популяцией PBMC, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, продукция одного или нескольких цитокинов увеличена по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 80% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, по сравнению с популяцией PBMC, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, цитокин выбран из IL-2, IFN- γ , TNF, IL-6 и IL-10.

В некоторых вариантах осуществления, продукция одного или нескольких цитокинов увеличена по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 80% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора GPR174 в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с контрольными клетками, не приведенными в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174. В некоторых вариантах осуществления, цитокин представляет собой цитокин T-клетки-помощника типа 1 (Th1), выбранный из IL-2, IFN- γ , TNF, и GM-CSF.

В некоторых вариантах осуществления, продукция одного или нескольких цитокинов увеличена по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 500% или по меньшей мере на 1000% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с популяцией PBMC, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, цитокин выбран из IL-2, IFN- γ , TNF и GM-CSF. В некоторых вариантах осуществления, продукция одного или нескольких из IL-2, IFN- γ , TNF или GM-CSF увеличена по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 500% или по меньшей мере на 1000% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с популяцией PBMC, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, продукция IL-2 увеличена по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 500% или по меньшей мере на 1000% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с популяцией PBMC, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, продукция IFN- γ увеличена по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100% или по меньшей мере на 500% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с популяцией PBMC, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, продукция TNF- α увеличена по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100% или по меньшей мере на 500% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с популяцией PBMC, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, продукция GM-CSF увеличена по меньшей

мере на 50%, по меньшей мере на 100% или по меньшей мере на 500% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с популяцией PBMC, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, продукция одного или нескольких цитокинов не подвергается модуляции и не увеличивается или не уменьшается более чем на 20% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, по сравнению с популяцией PBMC, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, цитокин или цитокины выбраны из группы, состоящей из: IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-17F, IL-21 и IL-22.

В некоторых вариантах осуществления, продукция одного или нескольких цитокинов уменьшена по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 80% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором. В некоторых вариантах осуществления, продукция IL-17A уменьшена по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 80% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором.

В некоторых вариантах осуществления, продукция одного или нескольких цитокинов увеличена по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 500% или по меньшей мере на 1000% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174. В некоторых вариантах осуществления, продукция одного или нескольких из IL-2, IFN- γ , TNF или GM-CSF увеличена по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 500% или по меньшей мере на 1000% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174. В некоторых вариантах осуществления, продукция IL-2 увеличена по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 500% или по меньшей мере на 1000% в клетке,

экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174. В некоторых вариантах осуществления, продукция IFN- γ увеличена по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100% или по меньшей мере на 500% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174. В некоторых вариантах осуществления, продукция TNF- α увеличена по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100% или по меньшей мере на 500% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, продукция одного или нескольких из IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-17F, IL-21 и IL-22 не подвергается модуляции и не увеличивается или не уменьшается более чем на 20% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором. В некоторых вариантах осуществления, пациент имеет одну или несколько опухоль(опухолей), которые могут содержать или могут не содержать инфильтрующие регуляторные T-клетки.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способу ингибирования уровня cAMP в клетке, экспрессирующей GPR174, включающему приведение клетки в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства.

В некоторых вариантах осуществления, уровень cAMP уменьшен по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 75% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора

CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, приведение в контакт осуществляют *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления, приведение в контакт осуществляют *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления, приведение в контакт осуществляют *ex vivo*.

В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой иммуноцит. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой Т-клетку или НК-клетку. В некоторых вариантах осуществления, стимулируют активность, дифференцировку, рост и/или пролиферацию НК-клетки или Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой клетку человека. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой клетку тимуса, лимфатического узла, селезенки, костного мозга или РМБС.

В некоторых вариантах осуществления, GPR174 имеет 90% или большую идентичность последовательности, например, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% с SEQ ID NO:1. В некоторых вариантах осуществления, GPR174 имеет последовательность, указанную как SEQ ID NO:1.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способу модуляции уровня одного или нескольких цитокинов в РВМС, включающему приведение РВМС в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства.

В некоторых вариантах осуществления, приведение в контакт осуществляют *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления, приведение в контакт осуществляют *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления, приведение в контакт осуществляют *ex vivo*.

В некоторых вариантах осуществления, РВМС содержат иммуноциты. В некоторых вариантах осуществления, иммуноциты содержат Т-клетки или НК-клетки. В некоторых вариантах осуществления, стимулируют активность, дифференцировку, рост и/или пролиферацию НК-клеток или Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления, РВМС содержат клетки млекопитающих. В некоторых вариантах осуществления, РВМС содержат клетки человека.

В некоторых вариантах осуществления, GPR174 имеет 90% или большую идентичность последовательности с SEQ ID NO:1.

В некоторых вариантах осуществления, цитокин выбран из IL-2, IFN- γ , TNF, GM-CSF, IL-6, IL-17A, IL-10, IL-4, IL-5, IL-9, IL-12, IL-13, IL-17F, IL-21 и IL-22. В некоторых вариантах осуществления, уровень одного или нескольких цитокинов увеличен. В некоторых вариантах осуществления, уровень одного или нескольких цитокинов,

выбранных из группы, состоящей из IL-2, IFN- γ , TNF и GM-CSF, увеличен. В некоторых вариантах осуществления, уровень одного или нескольких цитокинов уменьшен. В некоторых вариантах осуществления, уровень одного или нескольких цитокинов не подвергается модуляции.

В некоторых вариантах осуществления, уровень одного или нескольких цитокинов уменьшен по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 80% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, по сравнению с популяцией PBMC, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, уровень IL-17A уменьшен по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 80% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, по сравнению с популяцией PBMC, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, уровень одного или нескольких цитокинов увеличен по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50%, или по меньшей мере на 80% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с популяцией PBMC, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, цитокин выбран из IL-2, IFN- γ , TNF и GM-CSF.

В некоторых вариантах осуществления, уровень одного или нескольких цитокинов увеличен по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 500% или по меньшей мере на 1000% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с популяцией PBMC, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, цитокин выбран из IL-2, IFN- γ , TNF и GM-CSF. В некоторых вариантах осуществления, уровень одного или нескольких из IL-2, IFN- γ , TNF- α или GM-CSF увеличен по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 500% или по меньшей мере на 1000% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с популяцией PBMC, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, уровень IL-2 увеличен по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 500% или по меньшей мере на 1000% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с популяцией PBMC, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, уровень IFN- γ увеличен по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100% или по меньшей мере на 500% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с популяцией PBMC, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, уровень TNF- α увеличен по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100% или по меньшей мере на 500% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с популяцией PBMC, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, уровень одного или нескольких цитокинов не подвергается модуляции и не увеличивается или не уменьшается более чем на 20% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, по сравнению с популяцией PBMC, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, цитокин или цитокины выбраны из группы, состоящей из: IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-17F, IL-21 и IL-22.

В некоторых вариантах осуществления, уровень одного или нескольких цитокинов уменьшен по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 80% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором. В некоторых вариантах осуществления, уровень IL-17A уменьшен по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 80% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором.

В некоторых вариантах осуществления, уровень одного или нескольких цитокинов увеличен по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100%, по

меньшей мере на 500% или по меньшей мере на 1000% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174. В некоторых вариантах осуществления, уровень одного или нескольких из IL-2, IFN- γ , TNF или GM-CSF увеличен по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 500% или по меньшей мере на 1000% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, уровень IL-2 увеличен по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 500% или по меньшей мере на 1000% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, уровень IFN- γ увеличен по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100% или по меньшей мере на 500% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, уровень TNF (также обозначенного как «TNF- α ») увеличен по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100% или по меньшей мере на 500% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, уровень одного или нескольких из IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-17F, IL-21 и IL-22 не подвергается модуляции и не увеличивается или не уменьшается более чем на 20% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей низкомолекулярный ингибитор передачи сигналов GPR174 и фармацевтически приемлемый наполнитель.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей низкомолекулярный ингибитор передачи сигналов GPR174 в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39 и/или ингибитора CD73 и фармацевтически приемлемый наполнитель.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей низкомолекулярный ингибитор передачи сигналов GPR174 в комбинации с антагонистом A2aR и фармацевтически приемлемый наполнитель.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей низкомолекулярный ингибитор передачи сигналов GPR174 в комбинации с антагонистом A2bR и фармацевтически приемлемый наполнитель.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей низкомолекулярный ингибитор передачи сигналов GPR174 в комбинации с антагонистом A2aR и антагонистом A2bR и фармацевтически приемлемый наполнитель.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей низкомолекулярный ингибитор передачи сигналов GPR174 в комбинации с ослабляющим T-рег средством и фармацевтически приемлемый наполнитель.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей низкомолекулярный ингибитор GPR174 и по меньшей мере один из (i) антагониста A2aR и/или антагониста A2bR; и (ii) по меньшей мере одного ингибитора CD73 и/или ингибитора CD38, и/или ингибитора CD39. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтическая композиция дополнительно содержит ослабляющее T-рег средство.

В некоторых вариантах осуществления, низкомолекулярный ингибитор GPR174 не содержит алкильную цепь, содержащую 10 или более атомов С. В некоторых вариантах осуществления, низкомолекулярный ингибитор GPR174 не представляет собой пептидин,

LysoPS, PS или соединение, описанное в Публикации Патента США No. 2015/0361119. В некоторых вариантах осуществления, низкомолекулярный ингибитор имеет молекулярную массу от приблизительно 50 Да до приблизительно 2500 Да. В некоторых вариантах осуществления, низкомолекулярный ингибитор имеет молекулярную массу от приблизительно 50 до 800 Да, например, от приблизительно 100 Да до приблизительно 800 Да.

В некоторых вариантах осуществления, низкомолекулярный ингибитор изменяет клеточное распределение рекомбинантного полипептида GPR174, модифицированного для включения сигнала ядерной локализации, по сравнению с клеточным распределением рекомбинантного полипептида GPR174 в отсутствие ингибитора. В некоторых вариантах осуществления, низкомолекулярный ингибитор конкурентно связывается с GPR174 по сравнению с любым из соединений 1-59. В некоторых вариантах осуществления, низкомолекулярный ингибитор имеет EC_{50} для GPR174 менее чем 15 мкМ, как определено посредством анализа клеточного перераспределения (CRA). CRA подробно описан в настоящем описании под заголовком «способы скрининга». В некоторых вариантах осуществления, низкомолекулярный ингибитор конкурентно связывается с GPR174 по сравнению с любым из соединений 1-59 и это приводит к измененной кажущейся аффинности связывания соединения для GPR174 когда клетку, экспрессирующую GPR174, приводят в контакт с соединением и низкомолекулярным ингибитором в одно и то же время по сравнению с аффинностью связывания соединения для GPR174 отдельно. В некоторых вариантах осуществления, низкомолекулярный ингибитор вызывает различие в ингибирующей активности любого из эталонных соединений 1-59 в анализе опосредованной GPR174 передачи сигналов, при тестировании в присутствии указанного эталонного соединения, по сравнению с ингибирующей активностью эталонного соединения отдельно. В некоторых вариантах осуществления, низкомолекулярный ингибитор связывается аллостерически с GPR174 по сравнению с любым из соединений 1-59. В некоторых вариантах осуществления, низкомолекулярный ингибитор является специфическим для GPR174, по сравнению с одним или несколькими GPCR в эталонной панели GPCR, как описано в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, низкомолекулярный ингибитор является специфическим для GPR174, по сравнению с P2Y10. В некоторых вариантах осуществления, низкомолекулярный ингибитор является специфическим для GPR174, по сравнению с GPR34. В некоторых вариантах осуществления, низкомолекулярный ингибитор ингибирует путь передачи сигналов Gs.

В некоторых вариантах осуществления, активность, дифференцировку, пролиферацию и/или рост Т-клеток стимулируют в популяции мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего Т-рег средства, по сравнению с контрольной популяцией PBMC,

не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, субпопуляция регуляторных Т-клеток уменьшена в популяции PBMC, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего Т-рег средства, по сравнению с контрольной популяцией PBMC, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, доля FoxP3⁺Helios⁺ Т-клеток (регуляторных Т-клеток) уменьшена по меньшей мере на 20% в популяции PBMC, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего Т-рег средства, по сравнению с контрольной популяцией PBMC, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, уровень cAMP уменьшен по меньшей мере на 20% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего Т-рег средства, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, уровень cAMP уменьшен по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 75% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего Т-рег средства, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, активность PKA уменьшена по меньшей мере на 20% в клетках, экспрессирующих GPR174, приведенных в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего Т-рег средства, по сравнению с контрольной клеткой, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, активность PKA уменьшена по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 75% в клетке,

экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, уровень одного или нескольких цитокинов подвергается модуляции в PBMC, приведенных в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с контрольными клетками, не приведенными в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, уровень одного или нескольких из IL-2, IFN- γ , TNF и GM-CSF увеличен по меньшей мере на 20% в PBMC, приведенных в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с контрольными клетками, не приведенными в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, уровень IL-17A уменьшен по меньшей мере на 20% в PBMC, приведенных в контакт с низкомолекулярным ингибитором, по сравнению с контрольными клетками, не приведенными в контакт с низкомолекулярным ингибитором.

В некоторых вариантах осуществления, уровень одного или нескольких цитокинов уменьшен по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 80% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, по сравнению с популяцией PBMC, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, уровень IL-17A уменьшен по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 80% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, по сравнению с популяцией PBMC, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, уровень одного или нескольких цитокинов увеличен по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50%, или по меньшей мере на 80% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с популяцией PBMC,

не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, цитокин выбран из IL-2, IFN- γ , TNF и GM-CSF.

В некоторых вариантах осуществления, уровень одного или нескольких цитокинов увеличен по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 500% или по меньшей мере на 1000% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с популяцией PBMC, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, цитокин выбран из IL-2, IFN- γ , TNF и GM-CSF. В некоторых вариантах осуществления, уровень одного или нескольких из IL-2, IFN- γ , TNF или GM-CSF увеличен по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 500% или по меньшей мере на 1000% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с популяцией PBMC, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, уровень IL-2 увеличен по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 500% или по меньшей мере на 1000% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с популяцией PBMC, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, уровень IFN- γ увеличен по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100% или по меньшей мере на 500% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с популяцией PBMC, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, уровень TNF- α увеличен по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100% или по меньшей мере на 500% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с популяцией PBMC, не подвергнутой

воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, уровень одного или нескольких цитокинов не подвергается модуляции и не увеличивается или не уменьшается более чем на 20% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, по сравнению с популяцией PBMC, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, цитокин или цитокины выбраны из группы, состоящей из: IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-17F, IL-21 и IL-22.

В некоторых вариантах осуществления, уровень одного или нескольких цитокинов уменьшен по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 80% в иммуноците, приведенном в контакт с низкомолекулярным ингибитором, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором. В некоторых вариантах осуществления, уровень IL-17A уменьшен по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 80% в иммуноците, приведенном в контакт с низкомолекулярным ингибитором, по сравнению с контрольной клеткой, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором

В некоторых вариантах осуществления, уровень одного или нескольких цитокинов увеличен по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 500% или по меньшей мере на 1000% в иммуноците, приведенном в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с контрольной клеткой, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174. В некоторых вариантах осуществления, уровень одного или нескольких из IL-2, IFN- γ , TNF или GM-CSF увеличена по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 500% или по меньшей мере на 1000% в иммуноците, приведенном в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с контрольной клеткой, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, уровень IL-2 увеличен по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 500% или по меньшей мере на 1000% в иммуноците, приведенном в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с контрольной клеткой, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174. В некоторых

вариантах осуществления, уровень IFN- γ увеличен по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100% или по меньшей мере на 500% в иммуноците, приведенном в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с контрольной клеткой, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174. В некоторых вариантах осуществления, уровень TNF- α увеличен по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100% или по меньшей мере на 500% в иммуноците, приведенном в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с контрольной клеткой, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, уровень одного или нескольких из IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-17F, IL-21 и IL 22 не подвергается модуляции и не увеличивается или не уменьшается более чем на 20% в иммуноците, приведенном в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, по сравнению с контрольной клеткой, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором.

В некоторых вариантах осуществления, низкомолекулярный ингибитор уменьшает индуцированную лигандом интернализацию рецептора GPR174 в клетках, экспрессирующих GPR174, по сравнению с контрольными клетками, не приведенными в контакт с низкомолекулярным ингибитором.

В некоторых вариантах осуществления, интернализация рецептора уменьшена по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 80% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором. В некоторых вариантах осуществления, интернализация рецептора уменьшена на 1-99% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором. В некоторых вариантах осуществления, интернализация рецептора уменьшена на 1-20%, 20-40%, 40-60%, 60-80% или 80-99% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором.

В некоторых вариантах осуществления, привлечение β -аррестина уменьшено по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50% или по меньшей

мере на 80% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором. В некоторых вариантах осуществления, привлечение β -аррестина уменьшено на 1-99% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором. В некоторых вариантах осуществления, привлечение β -аррестина уменьшено на 1-20%, на 20-40%, 40-60%, 60-80% или на 80-99% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к композиции, содержащей низкомолекулярный ингибитор GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, и клетку, экспрессирующую GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой клетку млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой клетку человека. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой иммуноцит. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой T-клетку. В некоторых вариантах осуществления, T-клетка представляет собой наивную T-клетку. В некоторых вариантах осуществления, T-клетка представляет собой регуляторную T-клетку. В некоторых вариантах осуществления, T-клетка представляет собой эффекторную T-клетку. В некоторых вариантах осуществления, клетка представляет собой клетку тимуса, лимфатического узла, селезенки, костного мозга или PMBC. В некоторых вариантах осуществления, уровень cAMP уменьшен по меньшей мере на 20% в композиции, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174. В некоторых вариантах осуществления, активность PKA уменьшена по меньшей мере на 20% в композиции, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174. В некоторых вариантах осуществления, уровень одного или нескольких цитокинов подвергается модуляции в композиции, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, уровень cAMP уменьшен по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 75% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним

из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, активность PKA уменьшена по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 75% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к композиции, содержащей низкомолекулярный ингибитор передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, и популяцию клеток, где по меньшей мере часть популяции клеток экспрессирует GPR174, и где по меньшей мере часть популяции клеток, экспрессирующих GPR174, содержит T-клетки.

В некоторых вариантах осуществления, где популяция клеток содержит клетки злокачественных опухолей. В некоторых вариантах осуществления, популяция T-клеток содержит регуляторные T-клетки. В некоторых вариантах осуществления, популяция T-клеток содержит эффекторные T-клетки.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу ингибирования опосредованного GPR174 пути передачи сигналов (например, пути передачи сигналов Gs) в клетке. Способ включает стадию приведения клетки в контакт с выделенным соединением, предварительно определенным как функционально взаимодействующее с GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, где клетка включает опосредованный GPR174 путь передачи сигналов и экспрессирует GPR174 (например, полипептид GPR174) и выделенное соединение ингибирует способность GPR174 модулировать опосредованный GPR174 путь передачи сигналов, таким образом, ингибируя опосредованный GPR174 путь передачи сигналов в клетке. В конкретных вариантах осуществления, соединение является способным к функциональному взаимодействию с GPR174 человека, имеющим последовательность, указанную как SEQ ID NO:1, или природным вариантом GPR174, имеющим по меньшей мере 90% идентичность с SEQ ID NO:1. В конкретных вариантах осуществления, выделенное соединение является способным изменять клеточное распределение рекомбинантного полипептида GPR174 (например, GPR174 человека,

имеющего последовательность из SEQ ID NO:1), модифицированного для изменения клеточного распределения, по сравнению с клеточным распределением рекомбинантного полипептида GPR174 в отсутствие соединения. В некоторых вариантах осуществления, клетку приводят в контакт *in vivo* у субъекта, страдающего заболеванием, таким как злокачественная опухоль.

В родственном аспекте, настоящее изобретение относится к способу ингибирования опосредованного GPR174 пути передачи сигналов в клетке посредством (i) предоставления выделенного соединения, предварительно определенного как функционально взаимодействующее с GPR174 человека и ингибирующее опосредованный GPR174 путь передачи сигналов в клетках, экспрессирующих GPR174; и (ii) приведения клетки, экспрессирующей GPR174, в контакт с указанным выделенным соединением, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, таким образом, ингибирования опосредованного GPR174 пути передачи сигналов в клетке. В некоторых вариантах осуществления, клетка экспрессирует GPR174 человека, имеющий последовательность, указанную как SEQ ID NO:1 или природный вариант GPR174, имеющий по меньшей мере 90% идентичность с SEQ ID NO:1 (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичность с SEQ ID NO:1, и подлежащий ингибированию опосредованного GPR174 пути передачи сигналов в клетках, экспрессирующих GPR174. В некоторых вариантах осуществления, способ включает приведение клетки, экспрессирующей GPR174 человека, в контакт с выделенным соединением, предварительно определенным как функционально взаимодействующее с GPR174 человека, имеющим последовательность, указанную как SEQ ID NO:1, или природным вариантом GPR174, имеющим по меньшей мере 90% (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичность с SEQ ID NO:1, и ингибирующее опосредованный GPR174 путь передачи сигналов в клетках, экспрессирующих GPR174. В некоторых вариантах осуществления, стадия (i) включает проведение по меньшей мере одного анализа для измерения функционального взаимодействия указанного соединения с GPR174 перед приведением клетки в контакт в соответствии со стадией (ii).

В любом аспекте, соединение, необязательно, конкурентно связывается с такой же областью GPR174, как любое из соединений 1-59, представленных ниже.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу использования низкомолекулярного химического соединения для ингибирования опосредованного GPR174 пути передачи сигналов в клетке, где указанный способ включает стадии

(a) предоставления низкомолекулярного химического соединения, которое функционально взаимодействует с GPR174 и ингибирует опосредованный GPR174 путь передачи сигналов Gs в клетках, экспрессирующих GPR174, где соединение характеризуется по меньшей мере одним из следующих критериев:

(i) указанное соединение имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из формулы I, II, III, IV, V и VI (или (I), (II), (III), (IV), (V), (Va) или (VI)); или

(ii) указанное соединение изменяет аффинность связывания любого из эталонных соединений 1-59 (как указано в таблице 1) с GPR174; или

(iii) указанное соединение вызывает различие в ингибирующей активности любого из эталонных соединений 1-59 (как указано в таблице 1), в анализе опосредованного GPR174 пути передачи сигналов, при тестировании в присутствии эталонного соединения, по сравнению с ингибирующей активностью эталонного соединения отдельно; и

(b) приведения клетки, экспрессирующей GPR174, включающей опосредованный GPR174 путь передачи сигналов Gs, в контакт с соединением, в соответствии со стадией (a), либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, таким образом, ингибирования опосредованного GPR174 пути передачи сигналов в клетке.

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способу применения низкомолекулярного химического соединения для ингибирования опосредованного GPR174 пути передачи сигналов в клетке, где указанный способ включает стадии

(a) предоставления низкомолекулярного химического соединения, которое функционально взаимодействует с GPR174 и ингибирует опосредованный GPR174 путь передачи сигналов Gs в клетках, экспрессирующих GPR174, где соединение характеризуется по меньшей мере одним из следующих критериев:

(i) указанное соединение имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из формулы I, II, III, IV, V и VI (или (I), (II), (III), (IV), (V), (Va) или (VI)); или

(ii) указанное соединение изменяет кажущуюся аффинность связывания любого из эталонных соединений 1-59 (как указано в таблице 1) для GPR174; или

(iii) указанное соединение вызывает различие в ингибирующей активности любого из эталонных соединений 1-59 (как указано в таблице 1), в анализе опосредованного GPR174 пути передачи сигналов, при тестировании в присутствии указанного эталонного соединения, по сравнению с ингибирующей активностью эталонного соединения отдельно; и

(b) приведения клетки, экспрессирующей GPR174, включающей опосредованный GPR174 путь передачи сигналов Gs, в контакт с соединением, в соответствии со стадией (a), либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, таким образом, ингибирования опосредованного GPR174 пути передачи сигналов в клетке.

В некоторых вариантах осуществления, соединение изменяет аффинность связывания любого из соединений, описанных в настоящем описании (например, любого из эталонных соединений 1-59 из таблицы 1). В конкретных вариантах осуществления,

соединение уменьшает (т.е., ингибирует) аффинность связывания любого из эталонных соединений 1-59 с GPR174. В конкретных вариантах осуществления, соединение конкурентно уменьшает (т.е., конкурентно ингибирует) аффинность связывания любого из эталонных соединений 1-59 с GPR174. В альтернативных вариантах осуществления, соединение увеличивает аффинность связывания любого из эталонных соединений 1-59 с GPR174. В одном варианте осуществления, указанное соединение имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из формул I-VI. В одном варианте осуществления, указанное соединение ингибирует зависимость от лизофосфатидилсерина (LysoPS) активацию рецептора GPR174 в указанной клетке. В одном варианте осуществления, указанное соединение ингибирует зависимость от лизофосфатидилсерина (LysoPS) активацию рецептора GPR174 в указанной клетке.

В одном варианте осуществления, указанное соединение ингибирует зависимость от фосфатидилсерина (PS) активацию рецептора GPR174 в указанной клетке. Как описано в настоящем описании в примерах 16 и 17, авторы настоящего изобретения открыли, что фосфатидилсерин (PS) является агонистом опосредованной GPR174 передачи сигналов Gs. В примере 17 представлены экспериментальные результаты, показывающие, что апоптотические клетки стимулируют путь передачи через GPR174 сигналов Gs в клетках, экспрессирующих GPR174. Как далее описано в примере 16 и показано на ФИГУРАХ 47A-47F, опосредованную PS передачу через GPR174 сигналов Gs ингибируют посредством репрезентативных ингибирующих GPR174 соединений 6, 10, 11, 20, 23 и 30, принадлежащих к различным химическим классам (т.е., группам I, II и IV). Эти данные показывают, что соединения 6, 10, 11, 20, 23 и 30 действуют в качестве антагонистов GPR174 и ингибируют опосредованную PS-липосомой передачу сигналов cAMP. Таким образом, передачу сигналов PS-липосомой через GPR174 ингибируют посредством множества ингибирующих GPR174 низкомолекулярных соединений с разнообразными химическими структурами.

Как описано в настоящем описании, внеклеточный PS является высоко обогащенным в микроокружении опухолей и обнаружен на поверхности клеток опухолей, так же как эндотелиальных клеток кровеносных сосудов, проникающих в солидные опухоли. Кроме того, апоптотические нейтрофилы и активированные тромбоциты, которые и те, и другие экспонируют PS, также привлекаются к солидным опухолям (см. A.K and Rao D.A., *Blood* 120:4667-4668, 2012; Schlesinger, M., *Journal of Hematology and Oncology* (11) 125, 2018; Treffers L.W. et al., *Immunological Reviews* vol 273: 312-328, 2016; и Gregory A. D. and Houghton A. M., *Cancer Research* Vol 71 (7): 2411-6, 2011). Таким образом, высокие концентрации PS считаются главным источником опосредованной опухолью иммуносупрессии и могут играть роль в устойчивости к иммунотерапевтическим средствам против злокачественных опухолей, таким как ингибиторы контрольных точек.

Соответственно, экспериментальные результаты, описанные в примерах 16 и 17, обеспечивают поддержку способа стимуляции опосредованного T-клетками иммунитета у

субъекта, страдающего злокачественной опухолью, включающего введение ингибитора GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, указанному субъекту в количестве, эффективном для стимуляции опосредованного T-клетками иммунитета, как описано в настоящем описании.

Как далее описано в настоящем описании, авторы настоящего изобретения определили, что происходящие из клеток злокачественной опухоли экзосомы стимулируют GPR174, и ингибирование GPR174 в присутствии происходящих из клеток злокачественной опухоли экзосом увеличивает уровни Th1-цитокинов до большей степени, чем в присутствии PS-липосом, как описано в примере 26. Соответственно, в одном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к способу стимуляции и/или усиления иммунного ответа у субъекта-млекопитающего, страдающего от или подверженного риску развития злокачественной опухоли или метастазирования злокачественной опухоли, включающему:

(a) определение присутствия происходящих из клеток злокачественной опухоли экзосомы(экзосом), экспрессирующих фосфатидилсерин (PS), в образце, полученном от указанного субъекта-млекопитающего; и

(b) введение терапевтически эффективного количества ингибитора GPR174 указанному субъекту.

В некоторых вариантах осуществления, ингибитор GPR174 представляет собой малую молекулу, которая ингибирует опосредованную PS иммуносупрессию. В некоторых вариантах осуществления, образец представляет собой ткань, клетку или экстракт клеток, или жидкость, выбранную из группы, состоящей из крови, сыворотки, плазмы, мокроты, мочи, слюны и слез. В некоторых вариантах осуществления, стадия (a) включает приведение указанного образца или экстракта экзосомы, полученного из указанного образца, в контакт с связывающим PS средством и таким образом, определение присутствия указанной происходящей из клеток злокачественной опухоли экзосомы. Поскольку поверхностные мембраны экзосом отражают плазматическую мембрану их родительских клеток, экзосомы из клеток опухолей характеризуются наличием фосфатидилсерина (PS) на своей поверхности, в отличие от экзосом из нормальных клеток. Иллюстративные связывающие PS средства включают, например, антитело против PS или любое другое связывающее PS средство, например, такое как РКС, белок S, фактор VII, фактор III и другие известные связывающие PS средства. Связывающее PS средство можно метить поддающейся детекции меткой, такой как радиоактивный изотоп, колориметрическая метка, флуоресцентная метка, магнитно-резонансная метка, фермент, аффинный лиганд или люминесцентная метка. Экзосомы можно выделять из образца, полученного от субъекта, различными способами, например, такими как избирательная преципитация, аффинная очистка, или посредством дифференциального центрифугирования в

соответствии с известными способами (см., например, Zhang Y. et al., Mol Cell 39:133-144, 2010). В некоторых вариантах осуществления, стадия (а) включает количественное определение количества происходящих из клеток злокачественной опухоли экзосом в образце, полученном от субъекта. В некоторых вариантах осуществления, способ включает определение того, имеет или нет субъект количество происходящих из клеток злокачественной опухоли экзосом выше порога, показательного для присутствия злокачественной опухоли (т.е., одной или нескольких опухолей). Как правило, нормальные свободные от опухолей индивидуумы имеют не поддающиеся детекции уровни PS-экзосом в неконцентрированном образце. В отличие от этого, для пациентов с опухолями, как правило, показывают значения выше 100 пг/50 мкл образца в неконцентрированном образце. Таким образом, значения более 50 пг/50 мкл плазмы (или сыворотки) являются показательными для злокачественного новообразования (т.е., злокачественной опухоли или одной или нескольких опухолей).

Известно, что экспрессирующие PS экзосомы высвобождаются из клеток опухолей, и циркулирующие экзосомы из положительной по PS опухоли можно детектировать в биологических жидкостях, таких как кровь и моча. В некоторых вариантах осуществления, указанная происходящая из клетки злокачественной опухоли экзосома(экзосомы), экспрессирующая PS, происходит из клетки рака легкого, клетки рака поджелудочной железы, клетки рака яичника, клетки рака молочной железы, клетки рака ободочной кишки, клетки рака почки, клетки рака печени, клетки рака кожи, клетки злокачественной опухоли мозга, клетки рака головы и шеи, или клетки рака щитовидной железы, или любого другого типа клеток злокачественных опухолей, описанных в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает введение указанному субъекту по меньшей мере одного из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства.

В некоторых вариантах осуществления, ингибирующее GPR174 соединение изменяет кажущуюся аффинность связывания любого из соединений, описанных в настоящем описании (например, любого из эталонных соединений 1-59 из таблицы 1) для GPR174. В конкретных вариантах осуществления, соединение уменьшает кажущуюся аффинность связывания любого из эталонных соединений 1-59 для GPR174. В конкретных вариантах осуществления, соединение конкурентно связывается с GPR174 и уменьшает кажущуюся аффинность связывания любого из эталонных соединений 1-59 для GPR174. В альтернативных вариантах осуществления, соединение аллостерически связывается с GPR174 и уменьшает кажущуюся аффинность связывания любого из эталонных соединений 1-59 для GPR174. В альтернативных вариантах осуществления, соединение увеличивает кажущуюся аффинность связывания любого из эталонных соединений 1-59 для GPR174. В одном варианте осуществления, указанное соединение имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из формул I-VI. В одном варианте осуществления, указанное соединение ингибирует зависимую от лизофосфатидилсерина (LysoPS)

активацию рецептора GPR174 в указанной клетке. В одном варианте осуществления, указанное соединение ингибирует зависимую от PS активацию рецептора GPR174 в указанной клетке.

Клетка, экспрессирующая GPR174, может представлять собой эукариотическую клетку, такую как клетка млекопитающего (например, клетка человека). Клетка может находиться в млекопитающем (например, человеке, нечеловекообразном примате, грызуне, собаке, кошачьем, лошадином, свином или бычьем). В некоторых вариантах осуществления, клетку приводят в контакт *in vitro*. В некоторых вариантах осуществления, клетка находится в млекопитающем, и ее приводят в контакт *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления, клетка, экспрессирующая GPR174, представляет собой иммунцит, такой как Т-клетка. В конкретных вариантах осуществления, млекопитающее (например, человек) может являться страдающим от или подверженным риску развития злокачественной опухоли.

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к соединению для использования в лечении злокачественной опухоли, отличающемуся тем, что соединение взаимодействует с GPR174 для ингибирования опосредованного GPR174 пути передачи сигналов (например, пути передачи сигналов Gs), где ингибирующее GPR174 соединение используют для лечения злокачественной опухоли, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего Т-рег средства. В конкретных вариантах осуществления, это ингибирующее GPR174 соединение отличается тем, что также имеет способность изменять клеточное распределение рекомбинантного полипептида GPR174, модифицированного для включения сигнала ядерной локализации, по сравнению с клеточным распределением рекомбинантного полипептида GPR174 в отсутствие соединения. В некоторых вариантах осуществления, способ включает приведение клетки злокачественной опухоли, экспрессирующей GPR174, и/или иммунцита, экспрессирующего GPR174, в контакт с выделенным соединением, предварительно определенным как функционально взаимодействующее с GPR174 и ингибирующее опосредованный GPR174 путь передачи сигналов, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего Т-рег средства. В некоторых вариантах осуществления, способ включает приведение иммунцита экспрессирующего GPR174, такого как Т-клетка, в контакт с соединением, которое ингибирует опосредованный GPR174 путь передачи сигналов, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего Т-рег средства. В некоторых вариантах осуществления, способ включает проведение по меньшей мере одного анализа для измерения функционального взаимодействия указанного соединения с GPR174 до введения указанного соединения субъекту. В другом аспекте,

настоящее изобретение относится к соединению для использования в лечении опухоли у пациента, страдающего злокачественной опухолью, отличающемуся тем, что соединение взаимодействует с GPR174 для ингибирования опосредованного GPR174 пути передачи сигналов (например, пути передачи сигналов Gs), либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства. В конкретных вариантах осуществления, это ингибирующее GPR174 соединение отличается тем, что также имеет способность изменять клеточное распределение рекомбинантного полипептида GPR174, модифицированного для включения сигнала ядерной локализации, по сравнению с клеточным распределением рекомбинантного полипептида GPR174 в отсутствие соединения. В некоторых вариантах осуществления, опухоль содержит инфильтрацию регуляторных T-клеток (T-рег). В некоторых вариантах осуществления, опухоль, включающая инфильтрацию T-рег, представляет собой опухоль солидного органа. В некоторых вариантах осуществления, опухоль присутствует у субъекта, страдающего от злокачественной опухоли, выбранной из группы, состоящей из рака молочной железы, легкого (такого как мелкоклеточный рак легкого или немелкоклеточный рак легкого), колоректального рака, рака шейки матки, почки, яичника, меланомы, рака поджелудочной железы, печеночноклеточного рака, рака желудка, глиобластомы, глиомы, рака мочевого пузыря, миеломы (такой как множественная миелома), рака предстательной железы, щитовидной железы, яичка и пищевода. В некоторых вариантах осуществления, способ включает проведение по меньшей мере одного анализа для измерения функционального взаимодействия указанного соединения с GPR174 до введения указанного соединения субъекту

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способу лечения или предотвращения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом субъекта. Способ включает введение субъекту соединения, которое связывает и ингибирует рецептор GPR174, таким образом, ингибирование опосредованного GPR174 пути передачи сигналов, где ингибирование опосредованного GPR174 пути передачи сигналов с использованием ингибирующего GPR174 средства, необязательно, в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, приводит к лечению или предотвращению злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение субъекту выделенного соединения, предварительно определенного как функционально взаимодействующее с GPR174 и ингибирующее опосредованный GPR174 путь передачи сигналов, где ингибирование пути передачи сигналов приводит к лечению злокачественной опухоли. В некоторых вариантах осуществления, указанное ингибирующее GPR174 соединение характеризуется по меньшей мере одним из следующих критериев:

- (i) указанное соединение имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из

формул I-VI;

(ii) указанное соединение изменяет аффинность связывания любого из эталонных соединений 1-59 (как указано в таблице 1) с GPR174; и/или

(iii) указанное соединение вызывает различие в ингибирующей активности любого из эталонных соединений 1-59 (как указано в таблице 1), в анализе опосредованного GPR174 пути передачи сигналов, при тестировании в присутствии указанного эталонного соединения, по сравнению с ингибирующей активностью эталонного соединения отдельно. В некоторых вариантах осуществления, указанное соединение ингибирует зависимую от LysoPS активацию рецептора GPR174 у указанного субъекта. В некоторых вариантах осуществления, указанное соединение ингибирует зависимую от PS активацию рецептора GPR174 у указанного субъекта. В некоторых вариантах осуществления, указанное ингибирующее GPR174 соединение характеризуется по меньшей мере одним из следующих критериев:

(i) указанное соединение имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из формул I-VI;

(ii) указанное соединение изменяет кажущуюся аффинность связывания любого из эталонных соединений 1-59 (как указано в таблице 1) для GPR174; и/или

(iii) указанное соединение вызывает различие в ингибирующей активности любого из эталонных соединений 1-59 (как указано в таблице 1) в анализе опосредованного GPR174 пути передачи сигналов, при тестировании в присутствии указанного эталонного соединения, по сравнению с ингибирующей активностью эталонного соединения отдельно. В некоторых вариантах осуществления, указанное соединение ингибирует зависимую от LysoPS или зависимую от PS активацию рецептора GPR174 у указанного субъекта. В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу стимуляции опосредованного Т-клетками иммунитета у субъекта, страдающего злокачественной опухолью включающему введение субъекту низкомолекулярного соединения, предварительно определенного как ингибирующее опосредованный GPR174 путь передачи сигналов, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39 и/или ингибитора CD73. В некоторых вариантах осуществления, соединение ингибирует опосредованную GPR174 передачу сигналов в регуляторной Т-клетке, таким образом, ингибируя рост и/или пролиферацию и/или ингибируя активность регуляторной Т-клетки. В некоторых вариантах осуществления, соединение ингибирует опосредованную GPR174 передачу сигналов в эффекторной Т-клетке, таким образом, стимулируя рост и/или пролиферацию, и/или цитотоксическую активность в эффекторной Т-клетке. В некоторых вариантах осуществления, субъект страдает от опухоли, включающей регуляторные Т-клетки, и ингибирование GPR174 ингибирует и/или супрессирует рост и/или пролиферацию регуляторных Т-клеток. В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов, клетка находится в млекопитающем, и указанное млекопитающее страдает от или

подвержено риску развития злокачественной опухоли.

В некоторых вариантах осуществления, субъект страдает от или является носителем неоплазии, не узнаваемой организмом как собственная. В некоторых вариантах осуществления, неоплазия представляет собой незлокачественную неоплазию. В некоторых вариантах осуществления, неоплазия представляет собой злокачественную неоплазию.

В некоторых вариантах осуществления, субъект страдает от или является носителем, злокачественной неоплазии (т.е., злокачественной опухоли), выбранной из группы, состоящей из: невриномы слухового нерва, рака анального канала (включая карциному *in situ*), плоскоклеточной карциномы, опухоли надпочечника (включая аденому, гиперальдостеронизм, аденокортикальный рак), синдрома Кушинга, доброкачественной параганглиомы, злокачественной опухоли аппендикса (включая опухоли аппендикса, карциноидные опухоли, некарциноидные опухоли аппендикса), рака желчного протока (включая рак внутриспеченочного желчного протока, рак внепеченочного желчного протока, перихиларный рак желчного протока, рак дистального желчного протока), рака желчного пузыря, злокачественной опухоли кости (включая хондросаркому, остеосаркому, злокачественную фиброзную гистиоцитому, фибросаркому, хордому), опухоли мозга (включая краниофарингиому, дермоидные кисты, эпидермоидные опухоли, глиомы, астроцитомы, астроцитомы низкой степени злокачественности, анапластическую астроцитому, эпендимому, глиобластому, олигодендроглиому, гемангиобластому, опухоли шишковидной железы, опухоли гипофиза, саркому, хордому), рака молочной железы (включая лобулярную карциному, трижды отрицательный рак молочной железы, рецидивирующий рак молочной железы, метастазы в мозге), рака мочевого пузыря (включая переходноклеточный рак мочевого пузыря, плоскоклеточную карциному, аденокарциному), злокачественных опухолей неизвестной первичной локализации (CUP), (включая аденокарциному, низкодифференцированную карциному, плоскоклеточную карциному, низкодифференцированную злокачественную неоплазию, нейроэндокринную карциному), рака шейки матки (включая плоскоклеточную карциному, аденокарциному, смешанную карциному), карциноидных опухолей, эмбрионально-клеточных опухолей у детей (включая опухоли желточного мешка, тератому, эмбриональную карциному, полиэмбриому, герминому), опухоли мозга у детей, (включая эпендимому, краниофарингиому, хордому, плеоморфную ксантоастроцитому, менингиому, примитивные нейроэктодермальные опухоли, ганглиоглиому, пинеобластому, эмбрионально-клеточные опухоли, смешанные глиальные и нейрональные опухоли, астроцитому, опухоли хордидного сплетения), лейкозов у детей (включая лимфобластный лейкоз, миелоидный лейкоз), гематологических нарушений у детей (включая анемию Фанкони, анемию Даймонда-Блэкфана, апластическую анемию, анемию Даймонда-Блэкфана, синдром Костманна, нейтропению, тромбоцитопению, гемоглобинопатию, эритроцитоз, гистиоцитарные нарушения, перенасыщение железом, нарушения

свертывания крови и кровотечения), злокачественных опухолей печени у детей (включая гепатобластому, печеночноклеточную карциному), лимфом у детей (включая лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, лимфому Беркитта, лимфобластную лимфому, крупноклеточную лимфому), остеосарком у детей; меланом у детей; сарком мягких тканей у детей, рака ободочной кишки (включая аденокарциному, синдром наследственного неполипозного колоректального рака, семейный аденоматозный полипоз), десмопластических мелкокруглоклеточных опухолей (DSRCT); злокачественных опухолей пищевода (включая аденокарциному, плоскоклеточную карциному), сарком Юинга (включая саркому Юинга кости, экстраоссальную опухоль Юинга, периферические примитивные нейроэктодермальные опухоли), злокачественных опухолей глаза (включая увеальную меланому, базальноклеточную карциному, плоскоклеточную карциному, меланому века, меланому конъюнктивы, карциному слюнных желез, карциному из клеток Меркеля, лимфому лимфоидной ткани слизистых оболочек, орбитальную лимфому, орбитальную саркому, орбитальную менингиому и менингиому оптического нерва, метастазирующие орбитальные опухоли, лимфому слезной железы, аденокистозную карциному, плеоморфную аденому, переходноклеточную карциному, лимфому слезного мешка); злокачественных опухолей фаллопиевых труб (включая эндометриоидную аденокарциному, серозную аденокарциному, лейомиосаркому, переходноклеточный рак фаллопиевых труб); лимфом Ходжкина (включая классическую лимфому Ходжкина, нодулярную склерозирующую лимфому Ходжкина, богатую лимфоцитами классическую лимфому Ходжкина, смешанноклеточную лимфому Ходжкина, лимфому Ходжкина с истощением лимфоцитов, лимфому Ходжкина с преобладанием лимфоцитов), ассоциированных с имплантацией анапластических крупноклеточных лимфом (ALCL); воспалительных злокачественных опухолей молочной железы (IBC); злокачественных опухолей почки (включая почечноклеточный рак, уротелиальную злокачественную опухоль почки, почечной лоханки и мочеточника); лейкозов, (включая острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический лимфобластный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз), злокачественных опухолей печени (включая печеночноклеточную карциному, фиброламеллярную печеночноклеточную карциному, ангиосаркому, гепатобластому, гемангиосаркому), злокачественных опухолей легкого (включая немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному, плоскоклеточную карциному, крупноклеточную карциному, мелкоклеточный рак легкого, карциноидную опухоль, карциному слюнной железы, метастазы легкого, саркому); медуллобластом; меланом (включая меланому кожи, поверхностную распространяющуюся меланому, нодулярную меланому, злокачественную лентигозную меланому, акральную лентигозную меланому, глазную меланому, меланому слизистых оболочек); мезотелиом (включая саркоматоидную мезотелиому, двухфазную мезотелиому), множественных эндокринных неоплазий (MEN), (включая множественную эндокринную неоплазию типа 1, множественную эндокринную неоплазию типа 2); множественных миелом;

миелодиспластических синдромов (MDS) (включая невосприимчивую анемию, невосприимчивую цитопению с мультилинейной дисплазией, невосприимчивую анемию с кольцевидными сидеробластами, невосприимчивую анемию с избытком бластов, невосприимчивую цитопению с мультилинейной дисплазией и с кольцевидными сидеробластами); миелопролиферативных нарушений (MPD) (включая истинную полицитемию, первичный миелофиброз, эссенциальную тромбоцитемию, системный мастоцитоз, гиперэозинофильный синдром); нейробластом; нейрофиброматоза (включая нейрофиброматоз типа 1, нейрофиброматоз типа 2, шванноматоз); неходжскинских лимфом (включая В-клеточную лимфому, Т-клеточную лимфому, НК-клеточную лимфому, лимфому лимфоидной ткани слизистых оболочек, фолликулярную лимфому, лимфому из клеток мантийной зоны, диффузную крупноклеточную лимфому, первичную медиастинальную крупноклеточную лимфому, анапластическую крупноклеточную лимфому, лимфому Беркитта, лимфобластную лимфому, лимфому маргинальной зоны); злокачественных опухолей полости рта (включая плоскоклеточную карциному); видов рака яичника (включая эпителиальный рак яичника, рак зародышевых клеток яичника, стромальный рак яичника, первичный перитонеальный рак яичника); видов рака поджелудочной железы (включая карциному островковых клеток, саркому, лимфому, псевдопапиллярные неоплазии, ампулярный рак, панкреатобластому, аденокарциному); заболеваний паращитовидной железы (включая гиперпаратиреоз, гипопаратиреоз, рак паращитовидной железы), видов рака полового члена (включая плоскоклеточную карциному, саркому Капоши, аденокарциному, меланому, базальноклеточную карциному); опухолей гипофиза (включая нефункционирующие опухоли, функционирующие опухоли, рак гипофиза), видов рака предстательной железы (включая аденокарциному, интраэпителиальную неоплазию предстательной железы), видов рака прямой кишки (включая аденокарциному), ретинобластом (включая одностороннюю ретинобластому, двухстороннюю ретинобластому, ретинобластому PNET), видов рака кожи (включая базальноклеточную карциному, плоскоклеточную карциному, актинический (солнечный) кератоз); опухолей основания черепа (включая менингиому, аденому гипофиза, невриному слухового нерва, гломусные опухоли, плоскоклеточную карциному, базальноклеточную карциному, аденокистозную карциному, аденокарциному, хондросаркому, рабдомиосаркому, остеосаркому, эстезиобластому, нейроэндокринную карциному, меланому слизистых оболочек), сарком мягких тканей; опухолей спинного мозга (включая интрамедуллярные опухоли спинного мозга, интрадуральные экстрамедуллярные опухоли спинного мозга, экстрадуральные опухоли спинного мозга, остеобластому, энхондрому, аневризматические костные кисты, гигантоклеточные опухоли, ангиому, эозинофильную гранулему, остеосаркому, хордому, хондросаркому, плазмацитому); видов рака желудка (включая лимфому, стромальные опухоли желудочно-кишечного тракта, карциноидные опухоли); видов рака яичка (включая эмбрионально-клеточные опухоли, несемиомную опухоль, семиному, эмбриональную карциному, опухоли желточного мешка, тератому,

опухоли из клеток Сертоли, хориокарциному, стромальные опухоли, опухоль из клеток Лейдига); видов рака горла (включая плоскоклеточную карциному); видов рака щитовидной железы (включая папиллярный рак щитовидной железы, фолликулярный рак щитовидной железы, карциному из клеток Гюртле, медуллярный рак щитовидной железы, анапластический рак щитовидной железы); видов рака тела матки (включая эндометриоидную аденокарциному, карциносаркому тела матки, саркому тела матки); видов рака влагалища (включая плоскоклеточную карциному, аденокарциному, меланому, саркому); видов рака вульвы (включая плоскоклеточную карциному, аденокарциному, меланому, саркому); болезни фон Гиппеля-Линдау; видов макроглобулинемии Вальденстрема; и опухолей Вильмса.

В некоторых вариантах осуществления, субъект страдает от или является носителем злокачественной или незлокачественной неоплазии, как указано в параграфах 1-10 ниже:

Соединительная ткань, (включая взрослую фиброзную ткань, эмбриональную (миксоматозную) фиброзную ткань, жир, хрящ, кость, нотохорд):

1a. доброкачественные неоплазии соединительной ткани включают: фиброму, миксому, липому, хондрому, остеому и фиброзную гистиоцитому.

1b. злокачественные неоплазии соединительной ткани включают: фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеосаркому, хордому, злокачественную фиброзную гистиоцитому,

Эндотелий и мезотелий (включая кровеносные сосуды, лимфатические сосуды и мезотелий):

2a. доброкачественные неоплазии эндотелия и мезотелия включают: гемангиому, гемангиоперицитому и лимфангиому.

2b. злокачественные неоплазии эндотелия и мезотелия включают: гемангиосаркому, ангиосаркому, лимфангиосаркому и мезотелиому.

Кровь и лимфоидные клетки (включая гематопозитические клетки и лимфоидную ткань),

3a. доброкачественные неоплазии крови и лимфоидных клеток включают: прелейкозы, миелопролиферативные нарушения и плазмацитоз.

3b. злокачественные неоплазии крови и лимфоидных клеток включают: плазмацитому, множественную миелому, лимфому Ходжкина и неходжскинскую лимфому.

Мышца (включая гладкую мышцу и поперечнополосатую мышцу):

4a. доброкачественные неоплазии мышцы включают: лейомиому и рабдомиому.

4b. злокачественные неоплазии мышцы включают: лейомиосаркому и рабдомиосаркому.

Эпителиальные ткани (включая слоистый сквамозный эпителий, железистый эпителий (включая печень, почку и желчный проток), переходный эпителий, плаценту и яичко):

5a. доброкачественные неоплазии эпителиальных тканей включают: папиллому, себорейный кератоз и аднексальные опухоли кожи, аденому (включая аденому печени, тубулярную аденому почки и аденому желчного протока), переходноклеточную папиллому и пузырьный занос.

5b. злокачественные неоплазии эпителиальных тканей включают: плоскоклеточную карциному; эпидермоидную карциному, злокачественные аднексальные опухоли кожи, аденокарциному, гепатому, печеночноклеточную карциному, почечноклеточный рак, гипернефрому, холангиокарциному, переходноклеточную карциному, хориокарциному, семиному и эмбрионально-клеточную карциному.

Нервные ткани (включая глиальные клетки, нервные клетки, оболочки головного мозга и оболочку нерва):

6a. доброкачественные неоплазии нервных тканей включают: ганглионеврому, менингиому, шванному, неврилеммому и нейрофиброму.

6b. злокачественные неоплазии нервных тканей включают: глиому (степеней I-III), анапластическую, мультиформную глиобластому (степени IV), нейробластому, медуллобластому, злокачественную менингиому, злокачественную шванному, нейрофибросаркому.

Ткани, способные к захвату предшественников аминов и их декарбоксилированию (APUD) (включая гипофиз, паращитовидную железу, щитовидную железу (С-клетки), бронхиальную выстилку (клетки Кульчицкого), мозговой слой надпочечников, феохромоцитому, поджелудочную железу, желудок и кишечник, каротидное тельце и хеморецепторную систему):

7a. доброкачественные неоплазии тканей APUD включают: базофильную аденому, эозинофильную аденому, хромофобную аденому, аденому паращитовидной железы, гиперплазию С-клеток, феохромоцитому, аденому островковых клеток, инсулиному, гастриному, карциноид, хемодектому и параганглиому.

7b. злокачественные неоплазии тканей APUD включают: карциному паращитовидной железы, медуллярную карциному щитовидной железы, бронхиальный карциноид, овсяноклеточную карциному, злокачественную феохромоцитому, карциному островковых клеток, злокачественный карциноид, карциноидный синдром, и злокачественную параганглиому.

Другие происходящие из нервного гребня клетки (включая продуцирующие пигмент клетки в коже, глазах и иногда в других участках, шванновские клетки периферической нервной системы и клетки Меркеля в плоском эпителии):

8a. доброкачественные неоплазии происходящих из нервного гребня клеток включают: невус, шванному и неврилеммому.

8b. злокачественные неоплазии происходящих из нервного гребня клеток включают: меланому, злокачественную шванному и неоплазию из клеток Меркеля.

Опухоли (включая ткань молочной железы и зачаток ткани почки)

9a. доброкачественные неоплазии ткани молочной железы включают фиброаденому.

9b. злокачественные неоплазии ткани молочной железы включают филоидную цистосаркому; злокачественные неоплазии зачатка почки включают опухоль Вильмса.

Яичник и яичко (включая мультипотентные клетки, зародышевые клетки, соединительную ткань стромы и эпителиальную ткань)

10a. Злокачественные неоплазии яичника и яичка включают: семиному (дисгерминому у женщин), хориокарциному, эмбриональную карциному, опухоль эндодермального синуса и тератокарциному, и опухоли из клеток Сертоли-Лейдига.

В некоторых вариантах осуществления, субъект страдает от или является носителем незлокачественной опухоли, выбранной из группы, состоящей из аденомы (включая аденому печени, надпочечника, гипофиза, щитовидной железы, и полипы ободочной кишки и желудка), астроцитомы, краниофарингиомы, десмоидной опухоли, энхондромы, фибром или фиброидов любого органа, таких как фиброма матки, ганглионевромы, гемангиомы, липомы, липобластомы, гиберномы, лимфангиомы, менингиомы, миомы (включая лейомиомы и рабдомиомы), невусов или бородавок, невромы, нейрофибромы, шванномы, остеохондромы и папилломы (включая кожу, шейку матки, проток молочной железы и конъюнктиву).

В некоторых вариантах осуществления, субъект представляет собой пациента со злокачественной опухолью, где злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из рака молочной железы, меланомы, рака ободочной кишки, урологической злокачественной опухоли, рака легкого, мелкоклеточного и немелкоклеточного рака легкого, рецидивирующих или невосприимчивых злокачественных новообразований, неходжскинских лимфом и лимфом Ходжкина, лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфоцитарной лимфомы, лимфомы ЦНС, Т-клеточной лимфомы, связанной со СПИД лимфомы, острого лимфобластного лейкоза, злокачественных опухолей желудочно-кишечного тракта, рака печени, печеночноклеточной карциномы, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака желчного протока, рака предстательной железы, карциномы почки, рака мочевого пузыря, колоректального рака, множественной миеломы, мезотелиомы, рака шейки матки, рака влагалища, рака анального канала, рака ротоглотки, миелогенного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, рака желудка, носоглоточной карциномы, карциномы головы и шеи, глиобластомы, глиосаркомы, плоскоклеточной злокачественной опухоли мозга, злокачественной глиомы, диффузных глиом ствола головного мозга, рака пищевода, рака щитовидной железы, астроцитомы, злокачественной опухоли грудной клетки, рака эндометрия, карциномы клеток кожи, лейкоза, ацинарно-клеточной карциномы, аденокарциномы, бронхиолоальвеолярной карциномы, холангиокарциномы, хордомы, гигантоклеточной карциномы, карциномы кишечника, карциномы большой слюнной железы, злокачественной одонтогенной неоплазии, злокачественной опухоли оболочки периферического нерва, рака кожи, рака яичка, опухоли зародышевых клеток, нейроэндокринной карциномы, карциномы паразитовидной

железы, карциномы гипофиза, хориокарциномы плаценты, злокачественной опухоли мошонки, карциномы трахеи, переходноклеточной карциномы, рака тела матки, рака вульвы, рака почки, рака прямой кишки, карциномы фаллопиевых труб, перитонеальной карциномы, эпителиальной злокачественной опухоли, плевральной мезотелиомы, саркоматоидной карциномы, синовиальной саркомы, нефробластомы, нейробластомы, острого миелоидного лейкоза взрослых, миелодиспластической/миелопролиферативной неоплазии, эмбриональной карциномы, саркомы Капоши, злокачественной опухоли кости, рака тела матки, рака желудка, карциномы эндометрия, злокачественной опухоли тонкого кишечника, злокачественной опухоли эндокринной системы, рака паразитовидной железы, рака надпочечника, саркомы мягких тканей, рака мочеиспускательного канала, рака полового члена, рака мочеоточника, карциномы почечной лоханки, неоплазии центральной нервной системы, ангиогенеза первичной опухоли, опухоли оси позвоночника, эпидермоидной злокачественной опухоли, индуцированных внешней средой опухолей, включая опухоли, индуцированные асбестом, аденосаркомы, аденосквамозной карциномы, аденокортикальной карциномы, астроцитарных опухолей, базальноклеточной карциномы, хондросаркомы, саркомы Юинга, рака желчного пузыря, гипофарингеальной злокачественной опухоли, внутриглазной меланомы, рака гортани, лейомиосаркомы, злокачественной опухоли губ и полости рта, злокачественных мезотелиальных опухолей, злокачественной тимомы, медуллобластомы, медуллоэпителиомы, карциномы из клеток Меркеля, мукоэпидермоидной карциномы, миелодиспластического синдрома, рака носовой полости и околоносовых пазух, остеосаркомы, пульмональной бластомы, пинеальных и супратенториальных примитивных нейроэктодермальных опухолей, неоплазии плазматических клеток, ретинобластомы, рабдомиосаркомы, саркомы, нейроэктодермальных опухолей и опухоли Вильмса.

В некоторых вариантах осуществления, субъект представляет собой пациента со злокачественной опухолью, страдающего от или несущего солидную опухоль. В некоторых вариантах осуществления, пациент со злокачественной опухолью имеет солидную опухоль, инфильтрованную лимфоцитами, экспрессирующими GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, субъект имеет одну или несколько опухолей, инфильтрованных регуляторными Т-клетками, например, таких как рак молочной железы, легкого (такой как мелкоклеточный рак легкого или немелкоклеточный рак легкого), колоректальный рак, рак шейки матки, почки, яичника, меланома, рак поджелудочной железы, печеночноклеточный рак, рак желудка, глиобластома, глиома, рак мочевого пузыря, миелома (такая как множественная миелома), рак предстательной железы, щитовидной железы, яичка и пищевода.

В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение ингибирующего GPR174 соединения в форме одиночного средства. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение ингибирующего GPR174 соединения в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38,

ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение ингибирующего GPR174 соединения в комбинации с антагонистом A2aR. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение ингибирующего GPR174 соединения в комбинации с антагонистом A2bR. В некоторых вариантах осуществления, способ включает введение ингибирующего GPR174 соединения в комбинации с ослабляющим T-рег средством, например, таким как средство, которое связывает один или несколько из GITR, CTLA-4, CD25, LAG3, TIGIT, NRP1, TGF- β , CCR2, CCR4, CCR8, TNFR2 и/или EZH2, и ослабляет, истощает или иным образом нарушает функцию супрессора опухолей T-рег клеток. В некоторых вариантах осуществления, ослабляющее T-рег средство представляет собой малую молекулу. В некоторых вариантах осуществления, ослабляющее T-рег средство выбрано из группы, состоящей из антитела против GITR, против CTLA-4, против CD25, против LAG3, против TIGIT, против NRP1, против TGF- β , против CCR2, против CCR4, против CCR8, против TNFR2 и/или против EZH2. Иллюстративные ослабляющие T-рег средства для использования в композициях и способах по настоящему изобретению представлены в примере 25.

В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает введение одного или нескольких дополнительных лекарственных средств. В конкретных вариантах осуществления, клетку злокачественной опухоли дополнительно приводят в контакт с химиотерапевтическим средством.

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, включающей комбинацию ингибитора GPR174, выбранного из любого из соединений, описанных ниже (например, соединений формул I-VI и соединений 1-59 из таблицы 1), и ингибитора опосредованной АТФ-аденозином-А2аR-А2bR передачи сигналов (такого как антагонист А2аR, антагонист А2bR и/или ингибитор CD73, и/или ингибитор CD38, и/или ингибитор CD39, и/или ослабляющее T-рег средство), и фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтическая композиция может находиться в единичной дозированной форме. В конкретных вариантах осуществления, соединение можно составлять для перорального, внутривенного, внутривнутрибрюшинного, внутримышечного, местного, ректального, кожного, подкожного, назального введения, введения в кожу (например, в форме чрескожного пластыря), интрацеребровентрикулярного, интрапаренхимного, интрастекального, ингаляционного, интракраниального или глазного введения. Фармацевтические композиции можно использовать для осуществления способов, описанных в настоящем описании.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к соединениям формулы I, имеющим активность в качестве ингибиторов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, соединения формулы I имеют структуру в соответствии с формулой IA или формулой IB, или формулой IC, как описано в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям,

включающим соединение формулы I, такое как соединение в соответствии с формулой IA или формулой IB, или формулой IC, как описано в настоящем описании. Соединения формулы I можно использовать в способах ингибирования по меньшей мере одного опосредованного GPR174 пути передачи сигналов, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, для лечения или предотвращения злокачественной опухоли, как описано в настоящем описании.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к соединениям формулы II, имеющим активность в качестве ингибиторов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, соединения формулы II имеют структуру в соответствии с формулой IIA, формулой IIB, формулой IIC, формулой IID или формулой IIE, как описано в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим соединение формулы II, такое как соединение в соответствии с формулой IIA, формулой IIB, формулой IIC, формулой IID или формулой IIE, как описано в настоящем описании. Соединения формулы II можно использовать в способах ингибирования по меньшей мере одного опосредованного GPR174 пути передачи сигналов, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, для лечения или предотвращения злокачественной опухоли, как описано в настоящем описании.

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к соединениям формулы III, имеющим активность в качестве ингибиторов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, соединения формулы III имеют структуру в соответствии с формулой IIIA, формулой IIIB, формулой IIIC, формулой IIID, формулой IIIE или формулой IIIF, как описано в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим соединение формулы III, такое как соединение в соответствии с формулой IIIA, формулой IIIB, формулой IIIC, формулой IIID, формулой IIIE или формулой IIIF, как описано в настоящем описании. Соединения формулы III можно использовать в способах ингибирования по меньшей мере одного опосредованного GPR174 пути передачи сигналов, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, для лечения или предотвращения злокачественной опухоли, как описано в настоящем описании.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к соединениям формулы IV, имеющим активность в качестве ингибиторов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, соединения формулы IV имеют структуру в соответствии с формулой IVA, формулой IVB, формулой IVC, формулой IVD или формулой IVE, как описано в настоящем

описании. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим соединение формулы IV, такое как соединение в соответствии с формулой IVA, формулой IVB, формулой IVC, формулой IVD или формулой IVE, как описано в настоящем описании. Соединения формулы IV можно использовать в способах ингибирования по меньшей мере одного опосредованного GPR174 пути передачи сигналов, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, для лечения или предотвращения злокачественной опухоли, как описано в настоящем описании.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к соединениям формулы V, имеющим активность в качестве ингибиторов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим соединение формулы V, как описано в настоящем описании. Соединения формулы V можно использовать в способах ингибирования по меньшей мере одного опосредованного GPR174 пути передачи сигналов, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, для лечения или предотвращения злокачественной опухоли, как описано в настоящем описании.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к соединениям формулы Va, имеющим активность в качестве ингибиторов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим соединение формулы Va, как описано в настоящем описании. Соединения формулы Va можно использовать в способах ингибирования по меньшей мере одного опосредованного GPR174 пути передачи сигналов, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, для лечения или предотвращения злокачественной опухоли, как описано в настоящем описании.

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к соединениям формулы VI, имеющим активность в качестве ингибиторов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтическим композициям, включающим соединение формулы VI, как описано в настоящем описании. Соединения формулы VI можно использовать в способах ингибирования по меньшей мере одного опосредованного GPR174 пути передачи сигналов, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, для лечения или предотвращения злокачественной опухоли, как описано в настоящем описании.

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции, включающей соединение, являющееся ингибитором опосредованного GPR174 пути передачи сигналов, где соединение приводили в контакт *in vitro* с клеткой млекопитающего, экспрессирующей GPR174, и определили как ингибирующее опосредованный GPR174 путь передачи сигналов, где способность соединения ингибировать указанный опосредованный GPR174 путь передачи сигналов является показателем того, что оно является ингибитором GPR174, где способ включает составление ингибирующего GPR174 соединения с фармацевтически приемлемым носителем, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, где указанное ингибирующее GPR174 соединение характеризуется по меньшей мере одним из следующих критериев:

(i) указанное соединение имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из формул I-VI;

(ii) указанное соединение изменяет аффинность связывания любого из эталонных соединений 1-59 (как указано в таблице 1) с GPR174; и/или

(iii) указанное соединение вызывает различие в ингибирующей активности любого из эталонных соединений 1-59 (как указано в таблице 1), в анализе опосредованного GPR174 пути передачи сигналов, при тестировании в присутствии указанного эталонного соединения, по сравнению с ингибирующей активностью эталонного соединения отдельно.

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции, включающей соединение, являющееся ингибитором опосредованного GPR174 пути передачи сигналов, где соединение приводили в контакт *in vitro* с клеткой млекопитающего, экспрессирующей GPR174, и определили как ингибирующее опосредованный GPR174 путь передачи сигналов, где способность соединения ингибировать указанный опосредованный GPR174 путь передачи сигналов является показателем того, что оно является ингибитором GPR174, где способ включает составление ингибирующего GPR174 соединения с фармацевтически приемлемым носителем, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, где указанное ингибирующее GPR174 соединение характеризуется по меньшей мере одним из следующих критериев:

(i) указанное соединение имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из формул I-VI;

(ii) указанное соединение изменяет кажущуюся аффинность связывания любого из эталонных соединений 1-59 (как указано в таблице 1) с GPR174; и/или

(iii) указанное соединение вызывает различие в ингибирующей активности любого из эталонных соединений 1-59 (как указано в таблице 1), в анализе опосредованного GPR174 пути передачи сигналов, при тестировании в присутствии указанного эталонного

соединения, по сравнению с ингибирующей активностью эталонного соединения отдельно.

В другом варианте осуществления, настоящее изобретение относится к взаимодействующему с GPR174 соединению, включающему структуру в соответствии с любой из формул I-VI, описанных в настоящем описании, и поддающуюся детекции группу. В некоторых вариантах осуществления, взаимодействующее с GPR174 соединение характеризуется по меньшей мере одним из следующих критериев:

(i) указанное соединение имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из формул I-VI;

(ii) указанное соединение изменяет аффинность связывания любого из эталонных соединений 1-59 (как указано в таблице 1) с GPR174; и/или

(iii) указанное соединение вызывает различие в ингибирующей активности любого из эталонных соединений 1-59 (как указано в таблице 1), в анализе опосредованного GPR174 пути передачи сигналов, при тестировании в присутствии указанного эталонного соединения, по сравнению с ингибирующей активностью эталонного соединения отдельно. В одном варианте осуществления, взаимодействующее с GPR174 соединение, включающее поддающуюся детекции группу, содержит структуру в соответствии с любым из соединений 1-59, описанных в таблице 1. В конкретных вариантах осуществления, поддающаяся детекции группа представляет собой по меньшей мере одну из радиоактивного изотопа, биолюминесцентной метки, хемилюминесцентной метки или фотоаффинной метки. В одном варианте осуществления, поддающаяся детекции группа представляет собой радиоактивный изотоп.

В другом варианте осуществления, настоящее изобретение относится к взаимодействующему с GPR174 соединению, включающему структуру в соответствии с любой из формул I-VI, описанных в настоящем описании, и поддающуюся детекции группу. В некоторых вариантах осуществления, взаимодействующее с GPR174 соединение характеризуется по меньшей мере одним из следующих критериев:

(i) указанное соединение имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из формул I-VI;

(ii) указанное соединение изменяет кажущуюся аффинность связывания любого из эталонных соединений 1-59 (как указано в таблице 1) с GPR174; и/или

(iii) указанное соединение вызывает различие в ингибирующей активности любого из эталонных соединений 1-59 (как указано в таблице 1), в анализе опосредованного GPR174 пути передачи сигналов, при тестировании в присутствии указанного эталонного соединения, по сравнению с ингибирующей активностью эталонного соединения отдельно. В одном варианте осуществления, взаимодействующее с GPR174 соединение, включающее поддающуюся детекции группу, содержит структуру в соответствии с любым из соединений 1-59, описанных в таблице 1. В конкретных вариантах осуществления, поддающаяся детекции группа представляет собой по меньшей мере одну из радиоактивного изотопа, хемилюминесцентной метки, биолюминесцентной метки или

фотоаффинной метки. В одном варианте осуществления, поддающаяся детекции группа представляет собой радиоактивный изотоп.

В любом из вышеуказанных аспектов, ингибирующее GPR174 соединение может представлять собой синтетическое соединение, полусинтетическое соединение (например, химически модифицированный стероид, полученный из природного источника) или природный продукт. В конкретных вариантах осуществления, соединение не представляет собой эндогенный лиганд GPR174 (например, представляет собой суррогатный лиганд). В различных вариантах осуществления, соединение представляет собой функциональный ингибитор опосредованного GPR174 пути передачи сигналов (например, антагонист, частичный агонист, обратный агонист, частичный обратный агонист или отрицательный аллостерический модулятор). В некоторых вариантах осуществления, соединение представляет собой антагонист GPR174 и ингибирует по меньшей мере один опосредованный GPR174 путь передачи сигналов в присутствии агониста или частичного агониста. В некоторых вариантах осуществления, соединение представляет собой обратный агонист. В конкретных вариантах осуществления, соединение уменьшает активацию опосредованного GPR174 пути передачи сигналов по меньшей мере до 2/3, 1/2, 1/5, 1/10, 1/50 или 1/100 исходной активности при концентрации менее чем 40, 25, 10, 5, 1, 0,5, 0,25, 0,1, или 0,5 мкМ (например, от 0,01 мкМ до 0,5 мкМ, от 0,01 мкМ до 0,5 мкМ, от 0,01 мкМ до 5 мкМ, от 0,01 мкМ до 10 мкМ, от 0,01 мкМ до 25 мкМ, или от 0,01 мкМ до 40 мкМ). В некоторых вариантах осуществления, соединение представляет собой обратный агонист и уменьшает по меньшей мере один опосредованный GPR174 путь передачи сигналов по меньшей мере до 1/2 по сравнению с исходной активностью при концентрации менее чем 10 мкМ (например, от 0,01 мкМ до 10 мкМ).

Ингибирующее GPR174 соединение может представлять собой полипептид, антитело, непептидное соединение, ингибитор экспрессии (например, молекулы антисмысловой нуклеиновой кислоты GPR174, такие как антисмысловая РНК, антисмысловая ДНК или антисмысловые олигонуклеотиды, рибозимы GPR174 или молекулы для РНКи GPR174), который ингибирует экспрессию GPR174, или малую молекулу (например, малую органическую или металлоорганическую молекулу).

В некоторых вариантах осуществления, соединение не находилось в разработке ни в какой организации до 11 января 2019 г. В некоторых вариантах осуществления, соединение не представляет собой одобренное регуляторным органом соединение. В некоторых вариантах осуществления, соединение представляет собой соединение, не одобренное до 11 января 2019 г. Управлением США по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств или другим регуляторным органом для использования при заболевании, ассоциированном с GPR174. В некоторых вариантах осуществления, соединение не находилось в разработке ни в какой организации до 11 января 2019 г. для использования при заболевании, ассоциированном с GPR174. В некоторых вариантах осуществления, соединение не было одобрено до 11 января 2019 г. Управлением США по

контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств или эквивалентным регуляторным органом как нацеливающее на GPR174. В конкретных вариантах осуществления, соединение не представляет собой антитело или его связывающий рецептор фрагмент. В конкретных вариантах осуществления, соединение не представляет собой пептид, проникающий в клетку связывающийся с мембраной пептид (см., например, Covic L. et al., *PNAS* 99(2):643-8 (2002)).

В конкретных вариантах осуществления любого аспекта, ингибирующее GPR174 выделенное соединение не представляет собой LysoPS или PS.

В конкретных вариантах осуществления, ингибирующее GPR174 соединение является способным к функциональному взаимодействию с GPR174 человека, имеющим последовательность из SEQ ID NO: 1, и/или к изменению клеточного распределения рекомбинантного полипептида GPR174 (например, GPR174 человека, имеющего последовательность из SEQ ID NO: 1), модифицированного для включения сигнала ядерной локализации, по сравнению с клеточным распределением рекомбинантного полипептида GPR174 в отсутствие соединения.

Соединение может являться специфическим для GPR174, например, по сравнению с эталонной панелью GPCR.

В конкретных вариантах осуществления любого аспекта, выделенное соединение избирательно связывает GPR174 и не связывает P2Y10.

В конкретных вариантах осуществления любого аспекта, выделенное соединение избирательно связывает GPR174 и не связывает GPR34.

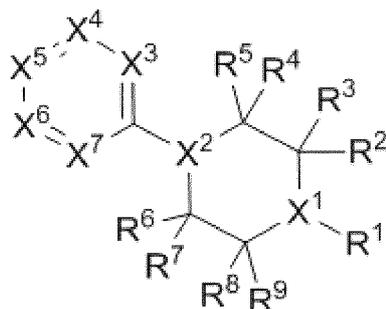
В конкретных вариантах осуществления любого аспекта, выделенное соединение функционально взаимодействует с GPR174 и не связывает P2Y10.

В конкретных вариантах осуществления любого аспекта, выделенное соединение функционально взаимодействует с GPR174 и не связывает GPR34.

В конкретных вариантах осуществления любого аспекта, выделенное соединение не является описанным в US2015/0361119.

Кроме того, в способах и композициях по любому из аспектов настоящего изобретения можно использовать любое соединение, имеющее структуру в соответствии с формулами, описанными ниже, такие как иллюстративные соединения в таблице 1, или их фармацевтически приемлемая соль.

В некоторых вариантах осуществления, ингибирующее GPR174 соединение имеет структуру в соответствии со следующей формулой (I):



(I),

или ее стереоизомером, или ее фармацевтически приемлемой солью, где

X¹ представляет собой N или CR¹⁰;X² представляет собой N или CR¹¹;X³ представляет собой N или CR¹²;X⁴ представляет собой N или CR¹³;X⁵ представляет собой N или CR¹⁴;X⁶ представляет собой N или CR¹⁵;X⁷ представляет собой N или CR¹⁶;

каждый из R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ и R⁹ независимо представляет собой H, гидроксигруппу, тиол, необязательно замещенный амин, необязательно замещенный амид, циано, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкокси, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилокси, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилокси, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоил, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоилоил, гидроксикарбонил, необязательно замещенный сложный эфир, необязательно замещенный карбоксамид, необязательно замещенный C₁-C₆ алканоилокси, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоилоилокси, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфинил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфонил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилсульфинил, необязательно замещенный C₁-C₆ арилсульфонил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилсульфинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклисульфони́л, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклисульфони́л, необязательно замещенный C₁-C₆ гетероалкил, необязательно замещенный C₂-C₆ гетероалкенил, необязательно замещенный C₂-C₆ гетероалкинил, необязательно замещенный C₃-C₁₀ циклоалкил, необязательно замещенный C₄-C₁₀ циклоалкенил, необязательно замещенный C₈-C₁₀ циклоалкинил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил, необязательно

замещенный C₁-C₉ гетероарил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₂-C₆ алкенил, или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₂-C₆ алкинил; или

R² и R³ объединяются с формированием =O, =S или =NR¹⁷; или

R⁴ и R⁵ объединяются с формированием =O, =S или =NR¹⁷; или

R⁶ и R⁷ объединяются с формированием =O, =S или =NR¹⁷; или

R⁸ и R⁹ объединяются с формированием =O, =S или =NR¹⁷;

каждый из R¹⁰, R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴, R¹⁵ и R¹⁶ независимо представляет собой H, гидроксигруппу, галоген, тиол, необязательно замещенный амин, необязательно замещенный амид, циано, нитро, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкокси, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилокси, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилокси, необязательно замещенный C₂-C₆ алканойл, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклилоил, гидроксикарбонил, необязательно замещенный сложный эфир, необязательно замещенный карбоксамид, необязательно замещенный C₁-C₆ алканойлокси, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклилоилокси, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфинил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфонил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилсульфинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилсульфинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₆ гетероалкил, необязательно замещенный C₂-C₆ гетероалкенил, необязательно замещенный C₂-C₆ гетероалкинил, необязательно замещенный C₃-C₁₀ циклоалкил, необязательно замещенный C₄-C₁₀ циклоалкенил, необязательно замещенный C₈-C₁₀ циклоалкинил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₂-C₆ алкенил, или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₂-C₆ алкинил; или

один из:

(i) R¹² и R¹³, вместе с атомами, к которым каждый из них присоединен, объединяются с формированием необязательно замещенного 5-, 6- или 7-членного кольца;

(ii) R^{13} и R^{14} , вместе с атомами, к которым каждый из них присоединен, объединяются с формированием необязательно замещенного 5-, 6- или 7-членного кольца;

(iii) R^{14} и R^{15} , вместе с атомами, к которым каждый из них присоединен, объединяются с формированием необязательно замещенного 5-, 6- или 7-членного кольца;
и

(iv) R^{15} и R^{16} , вместе с атомами, к которым каждый из них присоединен, объединяются с формированием необязательно замещенного 5-, 6- или 7-членного кольца;
и

R^{17} представляет собой H, гидроксил, циано, необязательно замещенный амино, необязательно замещенный амидо, необязательно замещенный карбоксамид, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинил, необязательно замещенный C_1-C_6 алканоил, необязательно замещенный C_7-C_{11} арилоил, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероциклоилоил, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероарилоил, необязательно замещенный C_1-C_6 алкилсульфинил, необязательно замещенный C_1-C_6 алкилсульфонил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилсульфинил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилсульфонил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилсульфинил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилсульфонил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкинил, необязательно замещенный C_3-C_{10} циклоалкил, необязательно замещенный C_4-C_{10} циклоалкенил, необязательно замещенный C_8-C_{10} циклоалкинил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил C_2-C_6 алкенил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил C_2-C_6 алкинил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил C_2-C_6 алкенил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил C_2-C_6 алкинил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил C_2-C_6 алкенил или необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил C_2-C_6 алкинил;

где три или менее из X^3 , X^4 , X^5 , X^6 и X^7 представляют собой N; и

по меньшей мере один из X^1 и X^2 представляет собой N.

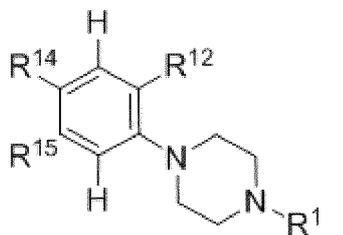
В некоторых вариантах осуществления формулы (I), X^1 представляет собой N. В конкретных вариантах осуществления формулы (I), X^2 представляет собой N. В конкретных вариантах осуществления формулы (I), X^3 представляют собой CR^{12} . В других вариантах осуществления формулы (I), X^4 представляют собой CR^{13} . В других вариантах осуществления формулы (I), X^5 представляют собой CR^{14} . В других вариантах осуществления формулы (I), X^6 представляют собой CR^{15} . В других конкретных вариантах осуществления формулы (I), X^7 представляют собой CR^{16} .

В конкретных вариантах осуществления формулы (I), выделенное соединение имеет

циклоалкил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкокси, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилокси, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилокси, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил. В конкретных вариантах осуществления формулы (I) или (IA), R¹³ представляет собой H или необязательно замещенный C₁-C₆ алкил. В других вариантах осуществления формулы (I) или (IA), R¹³ представляет собой H.

В конкретных вариантах осуществления формулы (I) или (IA), R¹⁶ представляет собой H, галоген, циано, нитро, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₃-C₁₀ циклоалкил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоил, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклилоил, гидроксикарбонил, необязательно замещенный сложный эфир, или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил. В других вариантах осуществления формулы (I) или (IA), R¹⁶ представляет собой H или необязательно замещенный C₁-C₆ алкил. В других вариантах осуществления формулы (I) или (IA), R¹⁶ представляет собой H.

В некоторых вариантах осуществления формулы (I), соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (IB):



(IB)

В конкретных вариантах осуществления формулы (I), (IA) или (IB), R¹² представляет собой H, галоген, циано, нитро, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкокси, необязательно замещенный C₁-C₆ алканоил, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфонил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилсульфонил, гидроксикарбонил, необязательно замещенный сложный эфир, необязательно замещенный карбоксамид, необязательно замещенный C₁-C₆ алканоилокси, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклилоилокси, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил, или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил. В конкретных вариантах осуществления формулы (I), (IA) или (IB), R¹² представляет собой H, галоген, циано, нитро, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкокси, необязательно замещенный C₁-C₆ алканоил,

вариантах осуществления формулы (I), (IA) или (IB), R^{14} представляет собой необязательно замещенный C_1-C_6 алканоил. В конкретных вариантах осуществления формулы (I), (IA) или (IB), R^{14} представляет собой необязательно замещенный C_2-C_4 алканоил. В конкретных вариантах осуществления формулы (I), (IA) или (IB), R^{14} представляет собой незамещенный C_2-C_4 алканоил.

В некоторых вариантах осуществления формулы (I), (IA) или (IB), R^{15} представляет собой H, необязательно замещенный amino, необязательно замещенный амидо, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 алкокси, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилокси, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилокси, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный C_3-C_{10} циклоалкил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил, или необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил C_1-C_6 алкил. В конкретных вариантах осуществления формулы (I), (IA) или (IB), R^{15} представляет собой H, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 алкокси, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилокси, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилокси, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный C_3-C_{10} циклоалкил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил или необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил. В конкретных вариантах осуществления формулы (I), (IA) или (IB), R^{15} представляет собой H или необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил. В других вариантах осуществления формулы (I), (IA) или (IB), R^{15} представляет собой H. В других вариантах осуществления формулы (I), (IA) или (IB), R^{15} представляет собой необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил (например, R^{15} представляет собой пиперидинил, замещенный метилом пиперидинил или бензпиперидинил).

В некоторых вариантах осуществления формулы (IB), R^1 выбран из группы, состоящей из C_1-C_6 алканоила, C_6-C_{10} арила, C_7-C_{11} арилоила, C_2-C_{10} гетероарилоила, C_2-C_7 алкоксикарбонила и C_6-C_{10} арилсульфонила, где R^1 является необязательно замещенным;

R^{12} представляет собой H, нитро или галоген;

R^{14} представляет собой C_1-C_6 алканоил или галоген; и

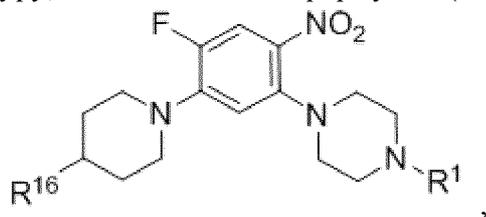
R^{15} представляет собой H или необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил.

В некоторых вариантах осуществления формулы (IB), R^1 выбран из необязательно замещенной группы, состоящей из C_1-C_6 -алканоила, C_7-C_{11} арилоила, C_2-C_{10} гетероарилоила, C_2-C_7 алкоксикарбонила и C_6-C_{10} арилсульфонила.

В некоторых вариантах осуществления формулы (IB), R^{12} представляет собой нитро, и R^{14} представляет собой фтор.

В некоторых вариантах осуществления формулы (IB), R^{15} представляет собой необязательно замещенный пиперидин-1-ил или необязательно замещенный азепан-1-ил. В

некоторых вариантах осуществления формулы (I), (IA) или (IB), соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (IC):



(IC)

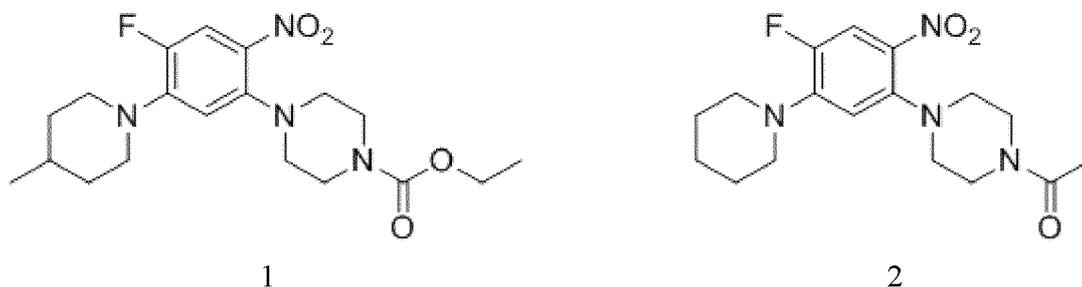
где R¹⁶ представляет собой H или C₁-C₆ алкил.

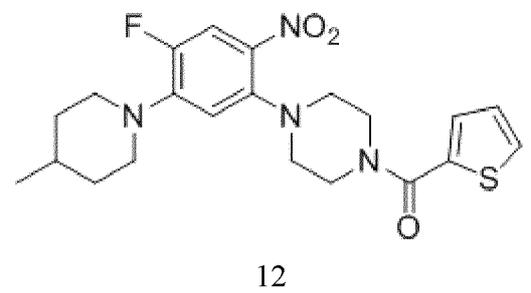
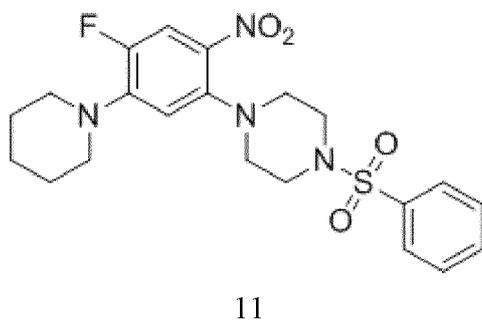
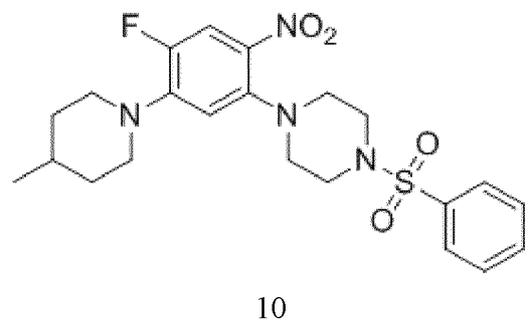
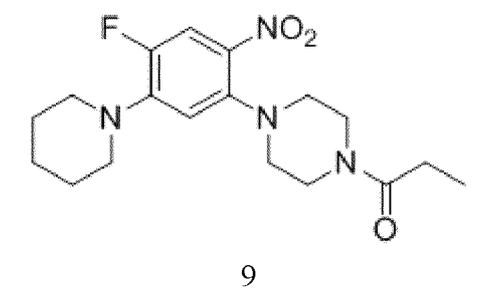
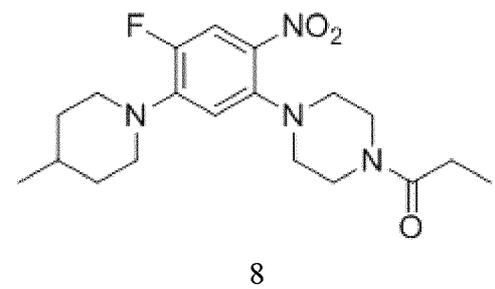
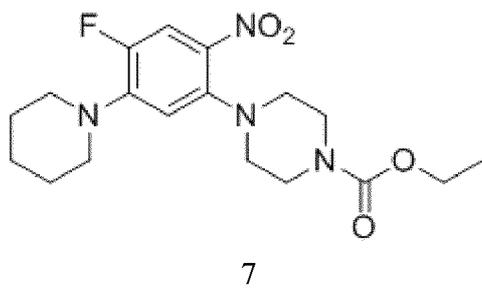
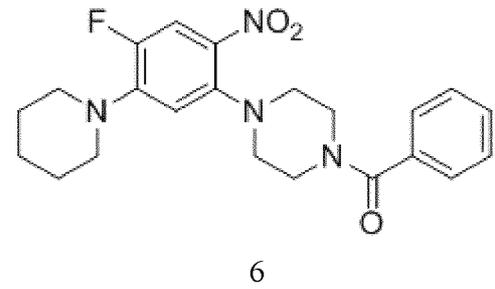
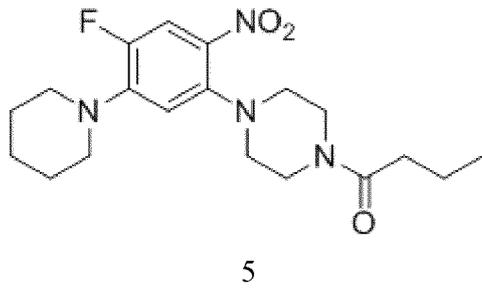
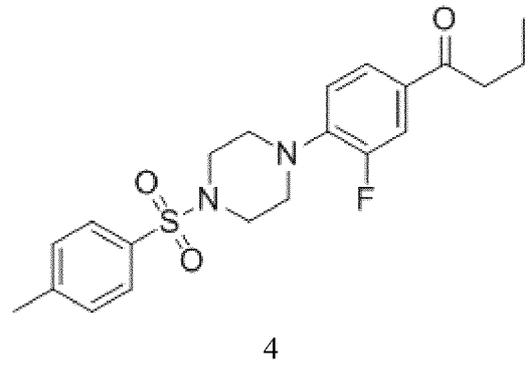
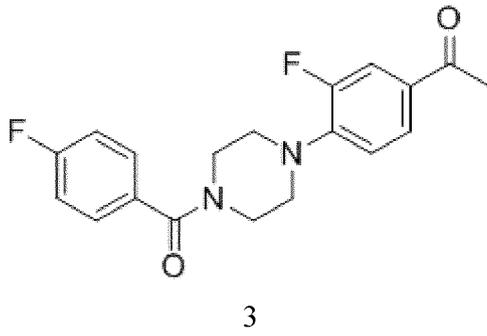
В некоторых вариантах осуществления формулы (IC), R¹⁶ представляет собой H или метил.

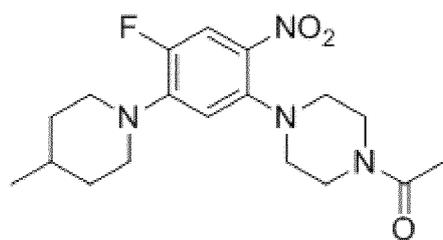
В конкретных вариантах осуществления формулы (I), (IA), (IB) или (IC), R¹ представляет собой H, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоил, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоилоил, необязательно замещенный сложный эфир, необязательно замещенный карбоксамид, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфонил, замещенный C₆-C₁₀ арилсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклисульфони́л, необязательно замещенный C₁-C₆ гетероалкил, необязательно замещенный C₃-C₁₀ циклоалкил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероцикл или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероцикл C₁-C₆ алкил. В конкретных вариантах осуществления формулы (I), (IA), (IB) или (IC), R¹ представляет собой необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоил, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоилоил, необязательно замещенный сложный эфир, необязательно замещенный карбоксамид, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфонил, замещенный C₆-C₁₀ арилсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклисульфони́л, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₁-C₆ алкил, или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероцикл C₁-C₆ алкил. В конкретных вариантах осуществления формулы (I), (IA), (IB) или (IC), R¹ представляет собой необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоил, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоил, необязательно замещенный сложный эфир, необязательно замещенный карбоксамид, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфонил, замещенный C₆-C₁₀ арилсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилсульфонил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₁-C₆ алкил или

необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₁-C₆ алкил. В некоторых вариантах осуществления формулы (I), (IA), (IB) или (IC), R¹ представляет собой optionally замещенный C₁-C₆ алкил, optionally замещенный C₂-C₆ алканоил, optionally замещенный C₇-C₁₁ арилоил, optionally замещенный сложный эфир, optionally замещенный C₆-C₁₀ арилсульфонил или optionally замещенный C₆-C₁₀ арил C₁-C₆ алкил. В других вариантах осуществления формулы (I), (IA), (IB) или (IC), R¹ представляет собой optionally замещенный C₁-C₆ алкил, optionally замещенный C₂-C₆ алканоил, optionally замещенный C₇-C₁₁ арилоил, optionally замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоил, optionally замещенный C₆-C₁₀ арилсульфонил или optionally замещенный сложный эфир. В других вариантах осуществления формулы (I), (IA), (IB) или (IC), R¹ представляет собой optionally замещенный C₂-C₇ алкоксикарбонил (например, метилоксикарбонил или этилоксикарбонил). В других вариантах осуществления формулы (I), (IA), (IB) или (IC), R¹ представляет собой optionally замещенный C₂-C₆ алканоил (например, R¹ представляет собой ацетил, пропаноил, н-бутаноил, изобутаноил, или т-пентаноил). В некоторых вариантах осуществления формулы (I), (IA), (IB) или (IC), R¹ представляет собой optionally замещенный C₇-C₁₁ арилоил (например, R¹ представляет собой 4-фторбензоил или бензоил). В других вариантах осуществления формулы (I), (IA), (IB) или (IC), R¹ представляет собой optionally замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоил (например, R¹ представляет собой 2-тиофенкарбонил). В конкретных вариантах осуществления формулы (I), (IA), (IB) или (IC), R¹ представляет собой optionally замещенный C₆-C₁₀ арилсульфонил (например, R¹ представляет собой *n*-толилсульфонил или фенилсульфонил). В других вариантах осуществления формулы (I), (IA), (IB) или (IC), R¹ представляет собой optionally замещенный C₁-C₆ алкил, (например, R¹ представляет собой этил или метил).

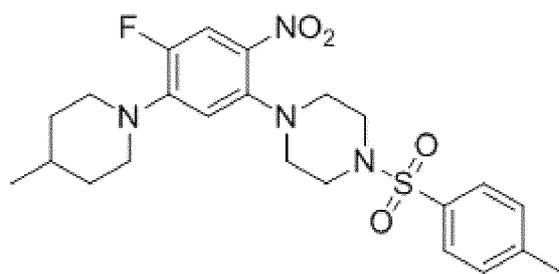
В конкретных вариантах осуществления формулы (I), (IA), (IB) или (IC), выделенное соединение представляет собой соединение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 или 53:



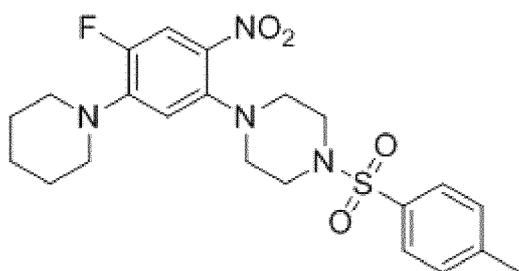




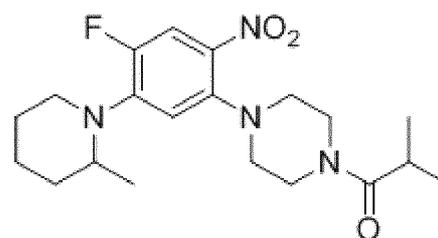
13



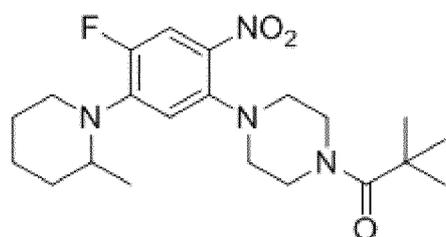
14



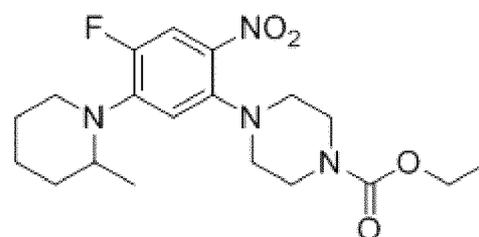
15



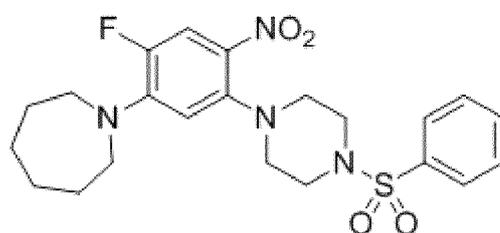
16



17

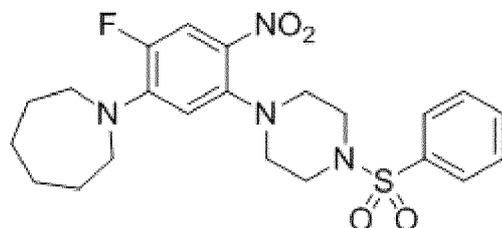


18



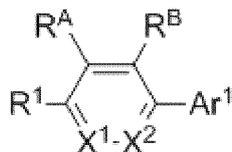
53

В конкретном варианте осуществления формулы (IB), выделенное соединение представляет собой соединение 53:



53

В некоторых вариантах осуществления, ингибирующее GPR174 соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (II):



(II)

или ее стереоизомером, или ее фармацевтически приемлемой солью, где

X¹ представляет собой N или CR²;

X² представляет собой N или CR³;

R^A и R^B, вместе с атомами, к которым они присоединены, объединяются с формированием необязательно замещенного 5-членного кольца, необязательно замещенного 6-членного кольца или необязательно замещенного 7-членного кольца;

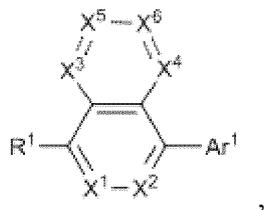
R¹ представляет собой H, гало, гидроксид, необязательно замещенный амино, необязательно замещенный амидо, тиол, циано, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкокси, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилокси, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилокси, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоил, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоилоил, гидроксикарбонил, необязательно замещенный C₂-C₇ алкоксикарбонил, необязательно замещенный карбоксамид, необязательно замещенный C₁-C₆ алканоилокси, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоилоилокси, необязательно замещенный C₁-C₆ тиоалкил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфинил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфонил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилтио, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилсульфинил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилтио, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилсульфинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклисульфенил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклисульфонил, необязательно замещенный сульфоамид, необязательно замещенный C₁-C₆ гетероалкил, необязательно замещенный C₂-C₆ гетероалкенил, необязательно замещенный C₂-C₆ гетероалкинил, необязательно замещенный C₃-C₁₀ циклоалкил, необязательно замещенный C₄-C₁₀ циклоалкенил, необязательно замещенный C₈-C₁₀ циклоалкинил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероцикл, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероцикл C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероцикл C₂-C₆ алкенил, или необязательно

замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₂-C₆ алкинил; и

Ar¹ представляет собой необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил.

В некоторых вариантах осуществления формулы (II), R^A и R^B, вместе с атомами, к которым каждый из них присоединен, объединяются с формированием необязательно замещенного карбоциклического кольца. В конкретных вариантах осуществления формулы (II), R^A и R^B, вместе с атомами, к которым каждый из них присоединен, объединяются с формированием необязательно замещенного гетероциклического кольца. В конкретных вариантах осуществления формулы (II), R^A и R^B, вместе с атомами, к которым каждый из них присоединен, объединяются с формированием необязательно замещенного 6-членного кольца. В других вариантах осуществления формулы (II), R^A и R^B, вместе с атомами, к которым каждый из них присоединен, объединяются с формированием необязательно замещенного неароматического кольца. В других вариантах осуществления формулы (II), R^A и R^B, вместе с атомами, к которым каждый из них присоединен, объединяются с формированием необязательно замещенного ароматического кольца.

В других вариантах осуществления формулы (II), выделенное соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (IIIА):



(IIIА)

где

X³ представляет собой N, CR⁴;

X⁴ представляет собой N, CR⁵;

X⁵ представляет собой N, CR⁶;

X⁶ представляет собой N, CR⁷ или отсутствует; и

каждый из R⁴, R⁵, R⁶, и R⁷ независимо представляет собой H, гало, гидрокси, необязательно замещенный амино, необязательно замещенный амидо, тиол, циано, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкокси, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилокси, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилокси, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоил, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклилоил, гидроксикарбонил, необязательно замещенный C₂-C₇ алкоксикарбонил, необязательно замещенный карбоксамид, необязательно замещенный C₁-C₆ алканоилокси, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀

гетероциклоилокси, обязательно замещенный C₁-C₆ тиоалкил, обязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфинил, обязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфонил, обязательно замещенный C₆-C₁₀ арилтио, обязательно замещенный C₆-C₁₀ арилсульфинил, обязательно замещенный C₆-C₁₀ арилсульфонил, обязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилтио, обязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилсульфинил, обязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилсульфонил, обязательно замещенный C₁-C₉ гетероцикллсульфинил, обязательно замещенный C₁-C₉ гетероцикллсульфонил, обязательно замещенный сульфамойл, обязательно замещенный C₁-C₆ гетероалкил, обязательно замещенный C₂-C₆ гетероалкенил, обязательно замещенный C₂-C₆ гетероалкинил, обязательно замещенный C₃-C₁₀ циклоалкил, обязательно замещенный C₄-C₁₀ циклоалкенил, обязательно замещенный C₈-C₁₀ циклоалкинил, обязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, обязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₁-C₆ алкил, обязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₂-C₆ алкенил, обязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₂-C₆ алкинил, обязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил, обязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₁-C₆ алкил, обязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₂-C₆ алкенил, обязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₂-C₆ алкинил, обязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклл, обязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклл C₁-C₆ алкил, обязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклл C₂-C₆ алкенил или обязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклл C₂-C₆ алкинил;

где

три или менее из X¹, X², X³, X⁴, X⁵ и X⁶ представляют собой N.

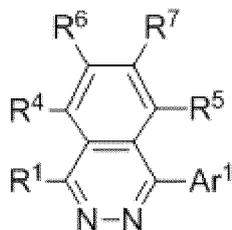
В конкретных вариантах осуществления формулы (IIA), X³ представляет собой CR⁴.

В других вариантах осуществления формулы (IIA), X⁴ представляет собой CR⁵.

В других вариантах осуществления формулы (IIA), X⁵ представляет собой CR⁶. В других вариантах осуществления формулы (IIA), X⁶ представляет собой CR⁷.

В некоторых вариантах осуществления формулы (II) или (IIA), X¹ представляет собой N. В конкретных вариантах осуществления формулы (II) или (IIA), X² представляет собой N.

В других вариантах осуществления формулы (II), выделенное соединение имеет структуру формулы (IIIB):



(IIIB)

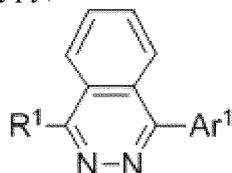
В некоторых вариантах осуществления формулы (IIA) или (IIIB), R⁴ представляет собой H, обязательно замещенный амино, гало, обязательно замещенный амидо, циано,

C_6-C_{10} арилокси, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилокси, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил, или необязательно замещенный C_1-C_9 гетероцикллил. В других вариантах осуществления формулы (IIA) или (IIB), R^6 представляет собой H, необязательно замещенный amino, необязательно замещенный амидо, гало или необязательно замещенный C_1-C_6 алкил. В других вариантах осуществления формулы (IIA) или (IIB), R^6 представляет собой H.

В некоторых вариантах осуществления формулы (IIA) или (IIB), R^7 представляет собой H, необязательно замещенный amino, гало, необязательно замещенный амидо, циано, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 алкокси, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилокси, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилокси, необязательно замещенный C_2-C_6 алканойл, необязательно замещенный C_7-C_{11} арилоил, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероарилоил, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероциклилоил, гидроксикарбонил, необязательно замещенный C_2-C_7 алкоксикарбонил, необязательно замещенный карбоксаид, необязательно замещенный C_1-C_6 алканойлокси, необязательно замещенный C_7-C_{11} арилоилокси, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероарилоилокси, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероциклилоилокси, необязательно замещенный C_1-C_6 алкилсульфонил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилсульфонил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилсульфонил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероцикллилсульфонил, необязательно замещенный сульфоамойл, необязательно замещенный C_1-C_6 тиоалкил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный C_3-C_{10} циклоалкил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероцикллил или необязательно замещенный C_1-C_9 гетероцикллил C_1-C_6 алкил. В конкретных вариантах осуществления формулы (IIA) или (IIB), R^7 представляет собой H, необязательно замещенный amino, гало, необязательно замещенный амидо, циано, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_2-C_7 алкоксикарбонил, необязательно замещенный карбоксаид, необязательно замещенный C_1-C_6 алканойлокси, необязательно замещенный C_7-C_{11} арилоилокси, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероарилоилокси, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероциклилоилокси, необязательно замещенный C_1-C_6 алкилсульфонил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилсульфонил, необязательно замещенный сульфоамойл, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил или необязательно замещенный C_1-C_9 гетероцикллил. В конкретных вариантах осуществления формулы (IIA) или (IIB), R^7 представляет собой H, гало, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 алкилсульфонил, необязательно замещенный карбоксаид или необязательно замещенный сульфоамойл. В

других вариантах осуществления формулы (IIA) или (IIB), R^7 представляет собой H.

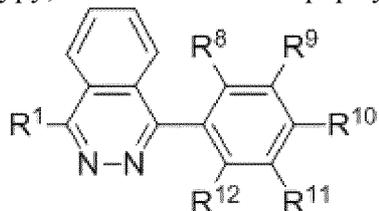
В других вариантах осуществления формулы (II), выделенное соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (IIC):



(IIC)

В некоторых вариантах осуществления формулы (II), (IIA), (IIB) или (IIC), Ar^1 представляет собой необязательно замещенный C_6-C_{10} арил. В других вариантах осуществления формулы (II), (IIA), (IIB) или (IIC), Ar^1 представляет собой необязательно замещенный C_6 арил.

В других вариантах осуществления формулы (II), выделенное соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (IID):



(IID)

где

каждый из R^8 , R^9 , R^{10} , R^{11} и R^{12} независимо представляет собой H, гало, гидрокси, необязательно замещенный amino, необязательно замещенный амидо, тиол, циано, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинил, необязательно замещенный C_1-C_6 алкокси, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилокси, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилокси, необязательно замещенный C_2-C_6 алканоил, необязательно замещенный C_7-C_{11} арилоил, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероарилоил, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероциклоилоил, гидроксикарбонил, необязательно замещенный C_2-C_7 алкоксикарбонил, необязательно замещенный карбоксаид, необязательно замещенный C_1-C_6 алканоилокси, необязательно замещенный C_7-C_{11} арилоилокси, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероарилоилокси, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероциклоилоилокси, необязательно замещенный C_1-C_6 тиоалкил, необязательно замещенный C_1-C_6 алкилсульфинил, необязательно замещенный C_1-C_6 алкилсульфонил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилтио, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилсульфинил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилсульфонил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилтио, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилсульфинил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилсульфонил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилсульфонил.

гетероциклилсульфинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклилсульфонил, необязательно замещенный сульфамойл, необязательно замещенный C₁-C₆ гетероалкил, необязательно замещенный C₂-C₆ гетероалкенил, необязательно замещенный C₂-C₆ гетероалкинил, необязательно замещенный C₃-C₁₀ циклоалкил, необязательно замещенный C₄-C₁₀ циклоалкенил, необязательно замещенный C₈-C₁₀ циклоалкинил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₂-C₆ алкенил или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₂-C₆ алкинил;

или любые два из соседних R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹ и R¹², вместе с двумя соседними атомами углерода, к которым они присоединены, формируют 5, 6 или 7-членное необязательно замещенное карбоциклическое или гетероциклическое кольцо.

В конкретных вариантах осуществления формулы (IID), R⁸ представляет собой H, гало или необязательно замещенный C₁-C₆ алкил. В других вариантах осуществления формулы (IID), R⁸ представляет собой H.

В конкретных вариантах осуществления формулы (IID), R¹¹ представляет собой H, гало или необязательно замещенный C₁-C₆ алкил. В других вариантах осуществления формулы (IID), R¹¹ представляет собой H.

В некоторых вариантах осуществления формулы (IID), R¹² представляет собой H, гало или необязательно замещенный C₁-C₆ алкил. В других вариантах осуществления формулы (IID), R¹² представляет собой H.

В конкретных вариантах осуществления формулы (IID), R⁹ представляет собой H, необязательно замещенный амино, гало, необязательно замещенный амидо, необязательно замещенный карбоксамид, циано, нитро, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкокси, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилокси, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилокси, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоил, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероцикливоил, гидроксикарбонил, необязательно замещенный C₂-C₇ алкоксикарбонил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфинил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфонил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилсульфинил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилсульфинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклилсульфонил, необязательно замещенный сульфамойл, необязательно замещенный C₁-C₆ гетероалкил, необязательно замещенный C₃-C₁₀ циклоалкил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил,

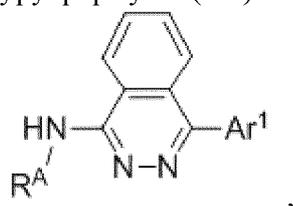
необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₁-C₆ алкил. В других вариантах осуществления формулы (IID), R⁹ представляет собой H, необязательно замещенный амидо, гало, циано, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₂-C₇ алкоксикарбонил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфонил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклилсульфонил, необязательно замещенный сульфамойл, необязательно замещенный C₁-C₆ гетероалкил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил, или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил. В других вариантах осуществления формулы (IID), R⁹ представляет собой H, необязательно замещенный карбоксамид, гало, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклилсульфонил или необязательно замещенный сульфамойл. В других вариантах осуществления формулы формулы (IID), R⁹ представляет собой необязательно замещенный сульфамойл (например, незамещенный сульфамойл).

В конкретных вариантах осуществления формулы (IID), R¹⁰ представляет собой H, гало, циано, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоил, гидроксикарбонил, необязательно замещенный C₂-C₇ алкоксикарбонил, необязательно замещенный карбоксамид, необязательно замещенный C₁-C₆ тиоалкил, необязательно замещенный C₁-C₆ гетероалкил, необязательно замещенный C₃-C₁₀ циклоалкил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₁-C₆ алкил. В других вариантах осуществления формулы (IID), R¹⁰ представляет собой H, гало, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₆ гетероалкил, необязательно замещенный C₃-C₁₀ циклоалкил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил, или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₁-C₆ алкил. В других вариантах осуществления формулы (IID), R¹⁰ представляет собой необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₆ гетероалкил или необязательно замещенный C₃-C₁₀ циклоалкил. В некоторых вариантах осуществления формулы формулы (IID), R¹⁰ представляет собой необязательно замещенный C¹-C⁶ алкил (например, метил).

В конкретных вариантах осуществления формулы (II), (IIA), (IIB), (IIC) или (IID), R¹ представляет собой H, гидроксид, необязательно замещенный амино, гало, тиол, необязательно замещенный амидо, необязательно замещенный карбоксамид, циано, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкокси, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилокси, необязательно замещенный C₁-C₉

гетероарилокси, необязательно замещенный C₁-C₆ алканоилокси, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклилоилокси, необязательно замещенный C₁-C₆ тиоалкил, необязательно замещенный C₁-C₆ гетероалкил, необязательно замещенный C₃-C₁₀ циклоалкил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₁-C₆ алкил. В конкретных вариантах осуществления формулы (IID), R¹⁰ представляет собой H, необязательно замещенный amino, необязательно замещенный амидо, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкокси, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилокси, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилокси, необязательно замещенный C₁-C₆ гетероалкил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₁-C₆ алкил. В некоторых вариантах осуществления формулы (II), (IIA), (IIB), (IIC) или (IID), R¹ представляет собой H, необязательно замещенный amino, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилокси, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилокси, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил, или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил. В других вариантах осуществления формулы (II), (IIA), (IIB), (IIC) или (IID), R¹ является необязательно замещенным amino. В других вариантах осуществления формулы (IID), R¹⁰ представляет собой замещенный amino, где по меньшей мере один заместитель представляет собой фенил. В других вариантах осуществления формулы (II), (IIA), (IIB), (IIC) или (IID), R¹ представляет собой замещенный amino, где по меньшей мере один заместитель представляет собой *o*-толил.

В некоторых вариантах осуществления формулы (II), соединение формулы (II) имеет структуру формулы (IIE):



(IIE)

где

R^A представляет собой необязательно замещенный фенил, и

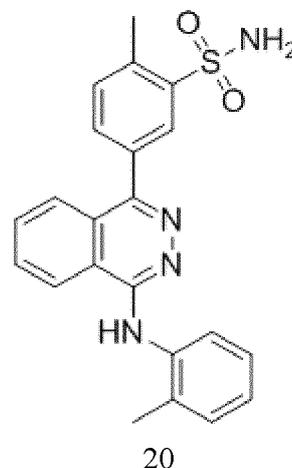
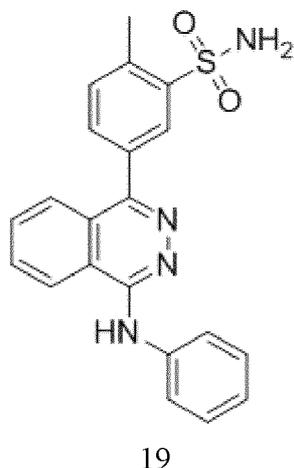
Ar¹ представляет собой необязательно замещенный фенил.

В некоторых вариантах осуществления формулы (IIE), R^A представляет собой фенил или 2-метилфенил.

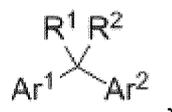
В некоторых вариантах осуществления формулы (IIE), Ar¹ представляет собой 3-

аминосульфонил-4-метилфенил.

В некоторых вариантах осуществления формулы (II), (IIA), (IIB) или (IC), выделенное соединение представляет собой соединение 19 или 20:



В некоторых вариантах осуществления, ингибирующее GPR174 соединения имеет структуру, в соответствии с формулой (III):



(III)

или ее стереоизомером, или таутомером, или ее фармацевтически приемлемой солью, где

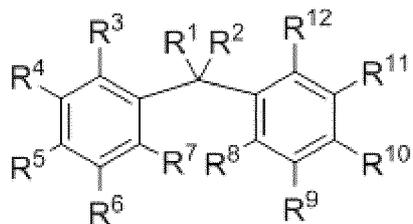
каждый из R^1 и R^2 независимо представляет собой H, гало, циано, необязательно замещенный C_1 - C_6 алкил или необязательно замещенный C_1 - C_6 гетероалкил; и

каждый из Ar^1 и Ar^2 независимо представляет собой необязательно замещенный C_6 - C_{10} арил или необязательно замещенный C_1 - C_9 гетероарил.

В конкретных вариантах осуществления формулы (III), Ar^1 представляет собой необязательно замещенный C_6 - C_{10} арил. В других вариантах осуществления формулы (III), Ar^1 представляет собой необязательно замещенный C_6 арил, например, необязательно замещенный фенил.

В конкретных вариантах осуществления формулы (III), Ar^2 представляет собой необязательно замещенный C_6 - C_{10} арил. В других вариантах осуществления формулы (III), Ar^2 представляет собой необязательно замещенный C_6 арил, например, необязательно замещенный фенил.

В других вариантах осуществления формулы (III), выделенное соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (IIIА):



(ША)

где

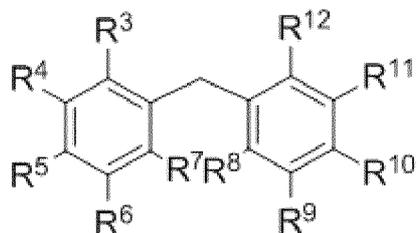
каждый из R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^7 , R^8 , R^9 , R^{10} , R^{11} и R^{12} независимо представляет собой H, гало, гидрокси, необязательно замещенный амино, необязательно замещенный амидо, тиол, циано, необязательно замещенный C_1 - C_6 алкил, необязательно замещенный C_2 - C_6 алкенил, необязательно замещенный C_2 - C_6 алкинил, необязательно замещенный C_1 - C_6 алкокси, необязательно замещенный C_6 - C_{10} арилокси, необязательно замещенный C_1 - C_9 гетероарилокси, необязательно замещенный C_2 - C_6 алканоил, необязательно замещенный C_7 - C_{11} арилоил, необязательно замещенный C_2 - C_{10} гетероарилоил, необязательно замещенный C_2 - C_{10} гетероциклоилоил, гидроксикарбонил, необязательно замещенный C_2 - C_7 алкоксикарбонил, необязательно замещенный карбоксаид, необязательно замещенный C_2 - C_6 алканоилокси, необязательно замещенный C_7 - C_{11} арилоилокси, необязательно замещенный C_2 - C_{10} гетероарилоилокси, необязательно замещенный C_2 - C_{10} гетероциклоилоилокси, необязательно замещенный C_2 - C_6 алканоиламино, необязательно замещенный C_7 - C_{11} арилоиламино, необязательно замещенный C_2 - C_{10} гетероарилоиламино, необязательно замещенный C_2 - C_{10} гетероциклоилоиламино, необязательно замещенный C_1 - C_6 тиоалкил, необязательно замещенный C_1 - C_6 алкилсульфинил, необязательно замещенный C_1 - C_6 алкилсульфонил, необязательно замещенный C_6 - C_{10} арилтио, необязательно замещенный C_6 - C_{10} арилсульфинил, необязательно замещенный C_6 - C_{10} арилсульфонил, необязательно замещенный C_1 - C_9 гетероарилтио, необязательно замещенный C_1 - C_9 гетероарилсульфинил, необязательно замещенный C_1 - C_9 гетероарилсульфонил, необязательно замещенный C_1 - C_9 гетероцикллсульфинил, необязательно замещенный C_1 - C_9 гетероцикллсульфонил, необязательно замещенный сульфоамил, необязательно замещенный C_1 - C_6 гетероалкил, необязательно замещенный C_2 - C_6 гетероалкенил, необязательно замещенный C_2 - C_6 гетероалкинил, необязательно замещенный C_3 - C_{10} циклоалкил, необязательно замещенный C_4 - C_{10} циклоалкенил, необязательно замещенный C_8 - C_{10} циклоалкинил, необязательно замещенный C_6 - C_{10} арил, необязательно замещенный C_6 - C_{10} арил C_1 - C_6 алкил, необязательно замещенный C_6 - C_{10} арил C_2 - C_6 алкенил, необязательно замещенный C_6 - C_{10} арил C_2 - C_6 алкинил, необязательно замещенный C_1 - C_9 гетероарил, необязательно замещенный C_1 - C_9 гетероарил C_1 - C_6 алкил, необязательно замещенный C_1 - C_9 гетероарил C_2 - C_6 алкенил, необязательно замещенный C_1 - C_9 гетероарил C_2 - C_6 алкинил, необязательно замещенный C_1 - C_9 гетероциклл, необязательно замещенный C_1 - C_9 гетероциклл C_1 - C_6

алкил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил C_2-C_6 алкенил или необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил C_2-C_6 алкинил.

В конкретных вариантах осуществления формулы (III) или (IIIА), R^1 представляет собой H, гало, или необязательно замещенный C_1-C_6 алкил. В других вариантах осуществления формулы (III) или (IIIА), R^1 представляет собой H, гало или метил. В других вариантах осуществления формулы (III) или (IIIА), R^1 представляет собой H.

В конкретных вариантах осуществления формулы (III) или (IIIА), R^2 представляет собой H, гало или необязательно замещенный C_1-C_6 алкил. В других вариантах осуществления формулы (III) или (IIIА), R^2 представляет собой H, гало или метил. В других вариантах осуществления формулы (III) или (IIIА), R^2 представляет собой H.

В некоторых вариантах осуществления формулы (III) или (IIIА), выделенное соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (IIIВ):



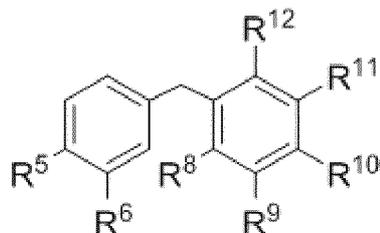
(IIIВ)

В конкретных вариантах осуществления формулы (III), (IIIА) или (IIIВ), R^3 представляет собой H, гало, или необязательно замещенный C_1-C_6 алкил. В других вариантах осуществления формулы (III), (IIIА) или (IIIВ), R^3 представляет собой H.

В конкретных вариантах осуществления формулы (III), (IIIА) или (IIIВ), R^4 представляет собой H, гало или необязательно замещенный C_1-C_6 алкил. В других вариантах осуществления формулы (III), (IIIА) или (IIIВ), R^4 представляет собой H.

В некоторых вариантах осуществления формулы (III), (IIIА) или (IIIВ), R^7 представляет собой H, гало или необязательно замещенный C_1-C_6 алкил. В других вариантах осуществления формулы (III), (IIIА) или (IIIВ), R^7 представляет собой H.

В других вариантах осуществления формулы (III), (IIIА) или (IIIВ), выделенное соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (IIIС):



(IIIС)

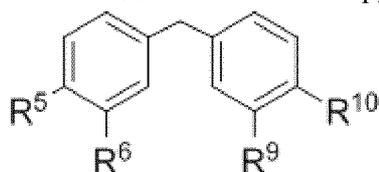
В конкретных вариантах осуществления формулы (III), (IIIА), (IIIВ) или (IIIС), R^{11} представляет собой H, гало или необязательно замещенный C_1-C_6 алкил. В других

вариантах осуществления формулы (III), (IIIА), (IIIВ) или (IIIС), R¹¹ представляет собой H.

В конкретных вариантах осуществления формулы (III), (IIIА), (IIIВ) или (IIIС), R¹² представляет собой H, гало или необязательно замещенный C₁-C₆ алкил. В других вариантах осуществления формулы (III), (IIIА), (IIIВ) или (IIIС), R¹² представляет собой H.

В некоторых вариантах осуществления формулы (III), (IIIА), (IIIВ) или (IIIС), R⁸ представляет собой H, гало или необязательно замещенный C₁-C₆ алкил. В других вариантах осуществления формулы (III), (IIIА), (IIIВ) или (IIIС), R⁸ представляет собой H.

В других вариантах осуществления формулы (III), (IIIА), (IIIВ) или (IIIС), выделенное соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (IIIД):



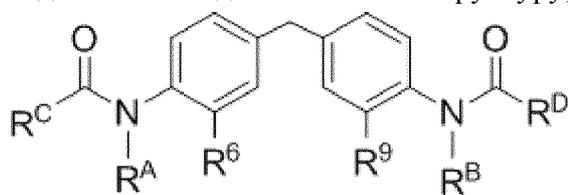
(IIIД)

В некоторых вариантах осуществления формулы (III), (IIIА), (IIIВ), (IIIС) или (IIIД), R⁵ представляет собой H, гало, циано, необязательно замещенный amino, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоил, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоилоил, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоилокси, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоиламино, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоиламино, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоиламино, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоилоиламино, гидроксикарбонил, необязательно замещенный карбоксамид, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфонил, замещенный C₆-C₁₀ арилсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклизсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₆ гетероалкил, необязательно замещенный C₃-C₁₀ циклоалкил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₁-C₆ алкил. В других вариантах осуществления формулы (III), (IIIА), (IIIВ), (IIIС) или (IIIД), R⁵ является необязательно замещенным amino, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоилокси, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоиламино, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоиламино, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоиламино, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоилоиламино, гидроксикарбонил или необязательно замещенный карбоксамид. В других вариантах

осуществления формулы (III), (IIIА), (IIIВ), (IIIС) или (IIIД), R⁵ представляет собой необязательно замещенный амино, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоиламино, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоиламино, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоиламино или необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоиламино.

В конкретных вариантах осуществления формулы (III), (IIIА), (IIIВ), (IIIС) или (IIIД), R¹⁰ представляет собой H, гало, циано, необязательно замещенный амино, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоил, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоилоил, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоилокси, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоиламино, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоиламино, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоиламино, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоиламино, гидроксикарбонил, необязательно замещенный карбоксамид, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфонил, замещенный C₆-C₁₀ арилсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклилсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₆ гетероалкил, необязательно замещенный C₃-C₁₀ циклоалкил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил, или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₁-C₆ алкил. В других вариантах осуществления формулы (III), (IIIА), (IIIВ), (IIIС) или (IIIД), R¹⁰ является необязательно замещенным амино, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоилокси, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоиламино, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоиламино, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоиламино, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоиламино, гидроксикарбонил или необязательно замещенный карбоксамид. В других вариантах осуществления формулы (III), (IIIА), (IIIВ), (IIIС) или (IIIД), R¹⁰ является необязательно замещенным амино, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоиламино, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоиламино, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоиламино или необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоиламино.

В конкретных вариантах осуществления формулы (III), (IIIА), (IIIВ), (IIIС) или (IIIД), выделенное соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (IIIЕ):



(ШЕ)

где

каждый из R^A и R^B независимо представляет собой H или необязательно замещенный C_1-C_6 алкил; и

каждый из R^C и R^D независимо представляет собой H, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_3-C_{10} циклоалкил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил или необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил.

В некоторых вариантах осуществления формулы (Ш), (ША), (ШВ), (ШС), (ШД) или (ШЕ), R^A представляет собой H. В других вариантах осуществления формулы (Ш), (ША), (ШВ), (ШС), (ШД) или (ШЕ), R^B представляет собой H.

В конкретных вариантах осуществления формулы (Ш), (ША), (ШВ), (ШС), (ШД) или (ШЕ), R^C представляет собой необязательно замещенный C_6-C_{10} арил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил. В других вариантах осуществления формулы (Ш), (ША), (ШВ), (ШС), (ШД) или (ШЕ), R^C представляет собой необязательно замещенный C_4 гетероарил, например, тиофен-2-ил.

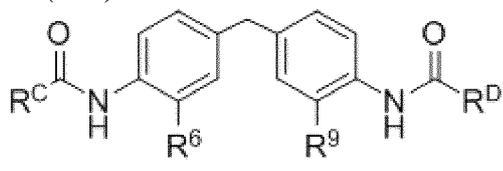
В других вариантах осуществления формулы (Ш), (ША), (ШВ), (ШС), (ШД) или (ШЕ), R^D представляет собой необязательно замещенный C_6-C_{10} арил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил. В других вариантах осуществления формулы (Ш), (ША), (ШВ), (ШС), (ШД) или (ШЕ), R^D представляет собой необязательно замещенный C_4 гетероарил, например, тиофен-2-ил.

В конкретных вариантах осуществления формулы (Ш), (ША), (ШВ), (ШС), (ШД) или (ШЕ), R^6 представляет собой H, гало, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный C_3-C_{10} циклоалкил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил или необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил C_1-C_6 алкил. В других вариантах осуществления формулы (Ш), (ША), (ШВ), (ШС), (ШД) или (ШЕ), R^6 представляет собой H, гало, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил или необязательно замещенный C_3-C_{10} циклоалкил. В других вариантах осуществления формулы (Ш), (ША), (ШВ), (ШС), (ШД) или (ШЕ), R^6 представляет собой H, гало, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил или необязательно замещенный C_3-C_{10} циклоалкил. В других вариантах осуществления формулы (Ш), (ША), (ШВ), (ШС), (ШД) или (ШЕ), R^6 представляет собой H или необязательно замещенный C_1-C_6 алкил. В некоторых вариантах осуществления формулы

(III), (IIIА), (IIIВ), (IIIС) или (IIIД), R^6 представляет собой H. В других вариантах осуществления формулы (III), (IIIА), (IIIВ), (IIIС), (IIIД) или (IIIЕ), R^6 представляет собой C_1 - C_6 алкил, например, метил.

В конкретных вариантах осуществления формулы (III), (IIIА), (IIIВ), (IIIС), (IIIД) или (IIIЕ), R^9 представляет собой H, гало, необязательно замещенный C_1 - C_6 алкил, необязательно замещенный C_2 - C_6 алкенил, необязательно замещенный C_2 - C_6 алкинил, необязательно замещенный C_1 - C_6 гетероалкил, необязательно замещенный C_3 - C_{10} циклоалкил, необязательно замещенный C_6 - C_{10} арил, необязательно замещенный C_6 - C_{10} арил C_1 - C_6 алкил, необязательно замещенный C_1 - C_9 гетероарил, необязательно замещенный C_1 - C_9 гетероарил C_1 - C_6 алкил, необязательно замещенный C_1 - C_9 гетероциклил, или необязательно замещенный C_1 - C_9 гетероциклил C_1 - C_6 алкил. В других вариантах осуществления формулы (III), (IIIА), (IIIВ), (IIIС), (IIIД) или (IIIЕ), R^9 представляет собой H, гало, необязательно замещенный C_1 - C_6 алкил, необязательно замещенный C_2 - C_6 алкенил, необязательно замещенный C_2 - C_6 алкинил, необязательно замещенный C_1 - C_6 гетероалкил, или необязательно замещенный C_3 - C_{10} циклоалкил. В других вариантах осуществления формулы (III), (IIIА), (IIIВ), (IIIС), (IIIД) или (IIIЕ), R^9 представляет собой H, гало, необязательно замещенный C_1 - C_6 алкил, необязательно замещенный C_2 - C_6 алкенил, необязательно замещенный C_2 - C_6 алкинил, необязательно замещенный C_1 - C_6 гетероалкил или необязательно замещенный C_3 - C_{10} циклоалкил. В других вариантах осуществления формулы (III), (IIIА), (IIIВ), (IIIС), (IIIД) или (IIIЕ), R^9 представляет собой H или необязательно замещенный C_1 - C_6 алкил. В некоторых вариантах осуществления формулы (III), (IIIА), (IIIВ), (IIIС), (IIIД) или (IIIЕ), R^9 представляет собой H. В других вариантах осуществления формулы (III), (IIIА), (IIIВ), (IIIС), (IIIД) или (IIIЕ), R^9 представляет собой C_1 - C_6 алкил, например, метил.

В некоторых вариантах осуществления, соединение формулы (III) имеет структуру формулы (IIIФ):



(IIIФ)

где

каждый из R^C и R^D независимо представляет собой необязательно замещенный C_1 - C_9 гетероарил; и

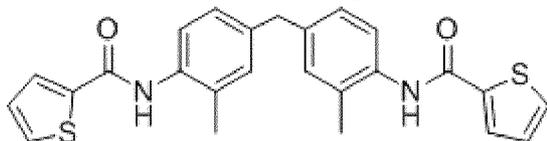
каждый из R^6 и R^9 независимо представляет собой необязательно замещенный C_1 - C_6 алкил.

В некоторых вариантах осуществления формулы (IIIФ), каждый из R^C и R^D независимо представляет собой незамещенный C_1 - C_9 гетероарил; и каждый из R^6 и R^9 независимо представляет собой незамещенный C_1 - C_6 алкил.

В некоторых вариантах осуществления формулы (III^F), каждый из R^C и R^D представляет собой тиен-2-ил.

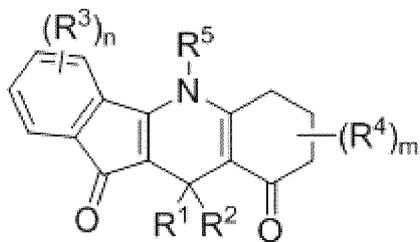
В некоторых вариантах осуществления формулы (III^F), каждый из R⁶ и R⁹ представляет собой метил.

В некоторых вариантах осуществления формулы (III), (III^A), (III^B), (III^C), (III^D) или (III^E), выделенное соединение представляет собой соединение 21:



21

В некоторых вариантах осуществления, ингибирующее GPR174 соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (IV):



(IV)

или ее стереоизомером, или ее таутомером, или ее фармацевтически приемлемой солью, где

каждый из R¹ и R² независимо представляет собой H, гидрокси, гало, необязательно замещенный амино, необязательно замещенный амидо, тиол, циано, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкокси, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилокси, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилокси, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоил, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоилоил, гидроксикарбонил, необязательно замещенный C₂-C₇ алкоксикарбонил, необязательно замещенный карбоксамид, необязательно замещенный C₁-C₆ алканоилокси, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоилоилокси, необязательно замещенный C₁-C₆ тиоалкил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфинил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфонил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилтио, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилсульфинил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилтио, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилсульфинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₉

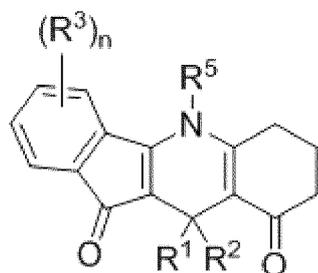
замещенный C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкокси, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилокси, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилокси, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоил, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклилоил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилоксикарбонил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфинил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфонил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилсульфинил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилсульфинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклилсульфинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклилсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₆ гетероалкил, необязательно замещенный C₂-C₆ гетероалкенил, необязательно замещенный C₂-C₆ гетероалкинил, необязательно замещенный C₃-C₁₀ циклоалкил, необязательно замещенный C₄-C₁₀ циклоалкенил, необязательно замещенный C₈-C₁₀ циклоалкинил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₂-C₆ алкенил, или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₂-C₆ алкинил.

n представляет собой 0, 1, 2, 3 или 4; и

m представляет собой 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В некоторых вариантах осуществления формулы (IV), m представляет собой 0.

В других вариантах осуществления формулы (IV), выделенное соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (IVA):

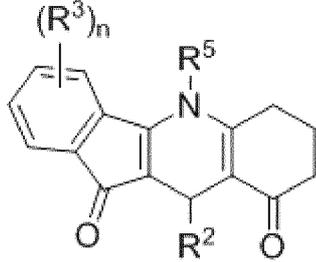


(IVA)

В конкретных вариантах осуществления формулы (IV) или (IVA), R¹ представляет собой H, гало, необязательно замещенный amino, необязательно замещенный амидо, тиол, циано или необязательно замещенный C₁-C₆ алкил. В других вариантах осуществления формулы (IV) или (IVA), R¹ представляет собой H, гало или необязательно замещенный C₁-

C_6 алкил. В других вариантах осуществления формулы (IV) или (IVA), R^1 представляет собой H.

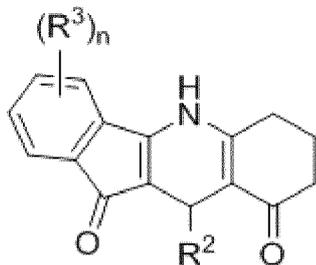
В конкретных вариантах осуществления формулы (IV) или (IVA), выделенное соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (IVB):



(IVB)

В некоторых вариантах осуществления формулы (IV), (IVA) или (IVB), R^5 представляет собой H, необязательно замещенный C_1 - C_6 алкил, необязательно замещенный C_2 - C_6 алкенил, необязательно замещенный C_2 - C_6 алкинил, необязательно замещенный C_2 - C_6 алканоил, необязательно замещенный C_7 - C_{11} арилоил, необязательно замещенный C_2 - C_{10} гетероарилоил, необязательно замещенный C_2 - C_{10} гетероциклилоил, необязательно замещенный C_1 - C_6 алкилоксикарбонил, необязательно замещенный C_1 - C_6 алкилсульфонил, или необязательно замещенный C_6 - C_{10} арилсульфонил. В других вариантах осуществления формулы (IV), (IVA) или (IVB), R^5 представляет собой H, необязательно замещенный C_1 - C_6 алкил, необязательно замещенный C_2 - C_6 алканоил, необязательно замещенный C_7 - C_{11} арилоил или необязательно замещенный C_1 - C_6 алкилоксикарбонил. В других вариантах осуществления формулы (IV), (IVA) или (IVB), R^5 представляет собой H, необязательно замещенный C_1 - C_6 алкил или необязательно замещенный C_2 - C_6 алканоил. В других вариантах осуществления формулы (IV), (IVA) или (IVB), R^5 представляет собой H.

В конкретных вариантах осуществления формулы (IV), (IVA) или (IVB), выделенное соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (IVC):

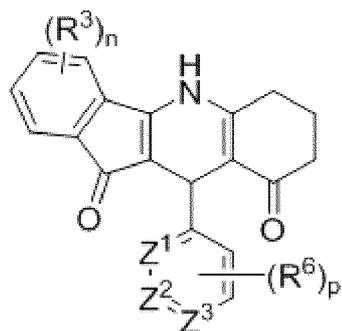


(IVC)

В конкретных вариантах осуществления формулы (IV), (IVA), (IVB) или (IVC), R^2 представляет собой H, необязательно замещенный C_1 - C_6 алкил, необязательно замещенный C_2 - C_6 алкенил, необязательно замещенный C_2 - C_6 алкинил, необязательно замещенный C_1 - C_6 гетероалкил, необязательно замещенный C_2 - C_6 гетероалкенил, необязательно замещенный C_2 - C_6 гетероалкинил, необязательно замещенный C_3 - C_{10} циклоалкил,

необязательно замещенный C₄-C₁₀ циклоалкенил, необязательно замещенный C₈-C₁₀ циклоалкинил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероцикл, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероцикл C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероцикл C₂-C₆ алкенил, или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероцикл C₂-C₆ алкинил. В других вариантах осуществления формулы (IV), (IVA), (IVB) или (IVC), R² представляет собой необязательно замещенный C₃-C₁₀ циклоалкил, необязательно замещенный C₄-C₁₀ циклоалкенил, необязательно замещенный C₈-C₁₀ циклоалкинил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил, или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероцикл. В других вариантах осуществления формулы (IV), (IVA), (IVB) или (IVC), R² представляет собой необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероцикл. В других вариантах осуществления формулы (IV), (IVA), (IVB) или (IVC), R² представляет собой необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил. В других вариантах осуществления формулы (IV), (IVA), (IVB) или (IVC), R² представляет собой необязательно замещенный пиридил (например, 2-пиридил, 3-пиридил или 4-пиридил). В конкретных вариантах осуществления формулы (IV), (IVA), (IVB) или (IVC), R² представляет собой необязательно замещенный фенил.

В некоторых вариантах осуществления формулы (IV), (IVA), (IVB) или (IVC), выделенное соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (IVD):



(IVD)

где R⁶ в каждом случае независимо представляет собой, гало, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₂-C₆ гетероарил, необязательно замещенный C₂-C₆ гетероцикл, необязательно замещенный C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный amino, необязательно замещенный амидо, тиол, циано, нитро, C₁-C₆ алкилсульфонил, гидроксикарбонил, необязательно замещенный C₂-C₇ алкоксикарбонил,

необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилокси или необязательно замещенный C₂-C₆ гетероарилокси;

Z¹ представляет собой С или N;

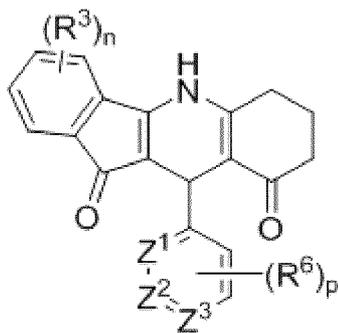
Z² представляет собой С или N;

Z³ представляет собой N или С; и

р представляет собой 0, 1, 2, 3, 4 или 5.

В некоторых вариантах осуществления формулы (IVD), Z¹ представляет собой С, Z² представляет собой С, и Z³ представляет собой N. В других вариантах осуществления формулы (IVD), Z¹ представляет собой С, Z² представляет собой N, и Z³ представляет собой С. В конкретных вариантах осуществления формулы (IVD), Z¹ представляет собой N, Z² представляет собой С, и Z³ представляет собой С. В других конкретных вариантах осуществления формулы (IVD), Z¹ представляет собой С, Z² представляет собой С, и Z³ представляет собой С.

В некоторых вариантах осуществления формулы (IV), (IVA), (IVB) или (IVC), выделенное соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (IVD):



(IVD)

где R⁶ в каждом случае независимо представляет собой, гало, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₂-C₆ гетероарил, необязательно замещенный C₂-C₆ гетероцикл, необязательно замещенный C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный амино, необязательно замещенный амидо, тиол, циано, нитро, C₁-C₆ алкилсульфонил, гидроксикарбонил, необязательно замещенный C₂-C₇ алкоксикарбонил, необязательно замещенный C₂-C₆ алкокси, необязательно замещенный C₂-C₆ алкенокси, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилокси или необязательно замещенный C₂-C₆ гетероарилокси;

Z¹ представляет собой СН или N;

Z² представляет собой СН или N;

Z³ представляет собой N или СН; и

р представляет собой 0, 1, 2, 3, 4 или 5.

В некоторых вариантах осуществления формулы (IVD), Z¹ представляет собой С, Z² представляет собой С, и Z³ представляет собой N. В других вариантах осуществления

формулы (IVD), Z^1 представляет собой C, Z^2 представляет собой N, и Z^3 представляет собой CH. В конкретных вариантах осуществления формулы (IVD), Z^1 представляет собой N, Z^2 представляет собой CH, и Z^3 представляет собой CH. В других конкретных вариантах осуществления формулы (IVD), Z^1 представляет собой CH, Z^2 представляет собой CH, и Z^3 представляет собой CH.

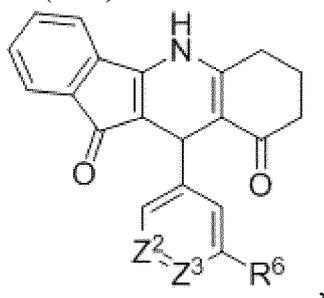
В некоторых вариантах осуществления формулы (IVD), p представляет собой 0. В других вариантах осуществления формулы (IVD), p представляет собой 1. В конкретных вариантах осуществления формулы (IVD), p представляет собой 2. В некоторых вариантах осуществления формулы (IVD), p представляет собой 1, и R^6 находится в p - или m -положении.

В конкретных вариантах осуществления формулы (IVD), R^6 представляет собой метокси, метил, гидроксил, этокси, этил, необязательно замещенный фенокси, необязательно замещенный циклопентилокси, t -бутокси, аллиокси, изопропилокси, n -пентилокси, трифторметилокси, дифторметилокси, фтор, хлор, нитро, 2-гидроксиэтилокси, необязательно замещенный 1,3,4-оксадиазолил или необязательно замещенный пирролидил.

В конкретных вариантах осуществления формулы (IV), (IVA), (IVB), (IVC) или (IVD), R^3 представляет собой H, гало, необязательно замещенный amino, необязательно замещенный амидо, тиол, циано, гидроксикарбонил, необязательно замещенный C_2 - C_7 алкоксикарбонил или необязательно замещенный C_1 - C_6 алкил.

В других вариантах осуществления формулы (IV), (IVA), (IVB), (IVC) или (IVD), n представляет собой 0.

В некоторых вариантах осуществления формулы (IV), соединение имеет структуру формулы (IVE):



(IVE)

где

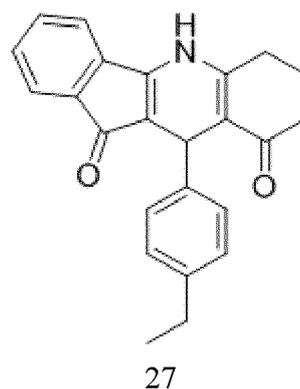
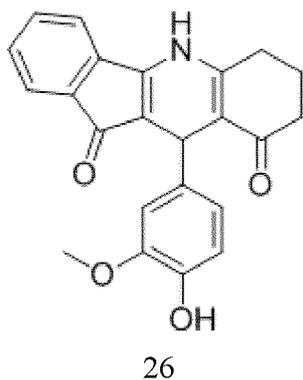
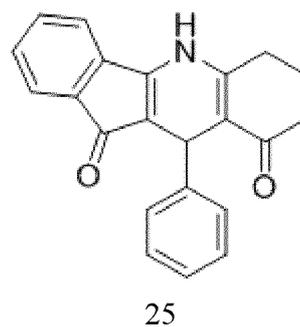
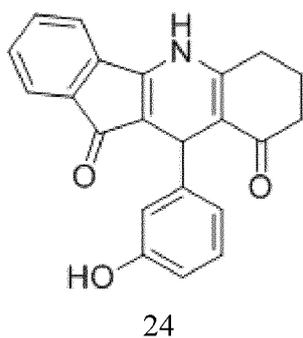
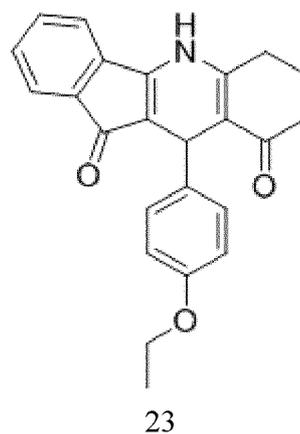
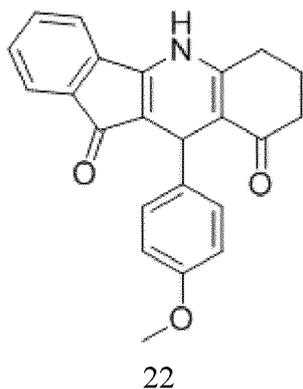
каждый из Z^2 и Z^3 независимо представляет собой CR^6 или N; и

каждый из R^6 независимо представляет собой H, галоген, гидроксид, нитро, необязательно замещенный C_1 - C_6 алкилсульфонил, необязательно замещенный C_1 - C_6 алкил, необязательно замещенный C_1 - C_6 алкокси, необязательно замещенный C_4 - C_{11} циклоалкокси, необязательно замещенный C_1 - C_6 галоалкокси, необязательно замещенный C_2 - C_6 -алкенокси, необязательно замещенный C_6 - C_{10} арилокси, необязательно замещенный

C_1-C_9 гетероцикл, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил или необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил;

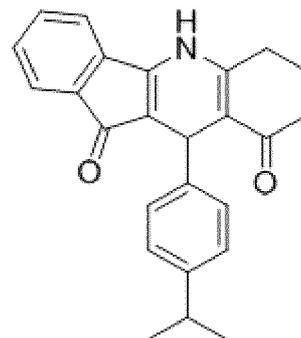
или две соседних группы R^6 , взятые вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, формируют C_1-C_9 гетероцикл.

В некоторых вариантах осуществления формулы IV, (IVA), (IVB) или (IVC), выделенное соединение представляет собой соединение 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 54 или 55:

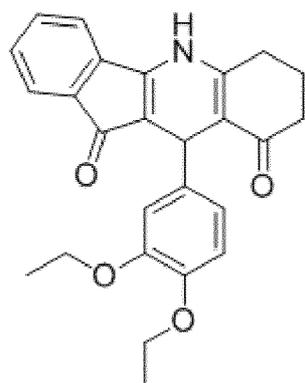




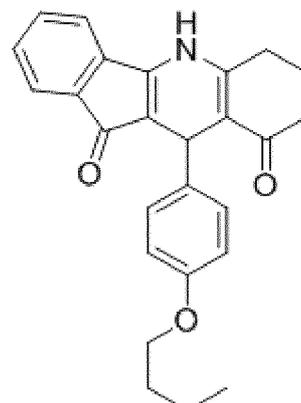
28



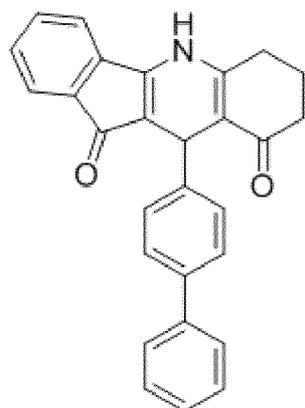
29



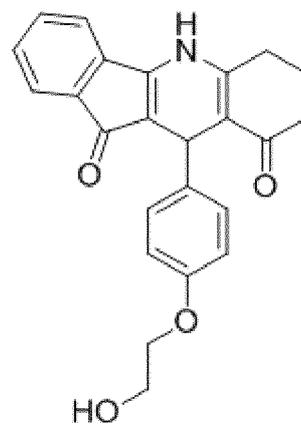
30



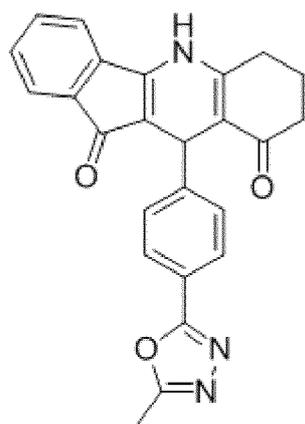
31



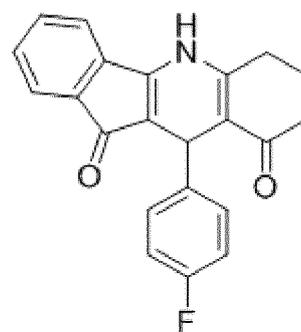
32



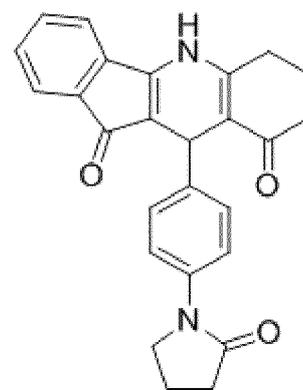
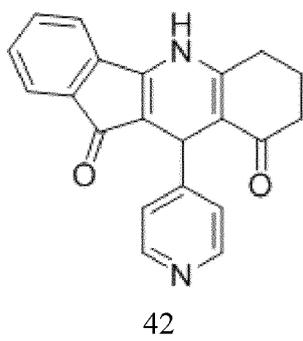
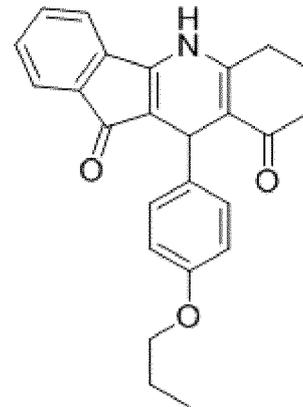
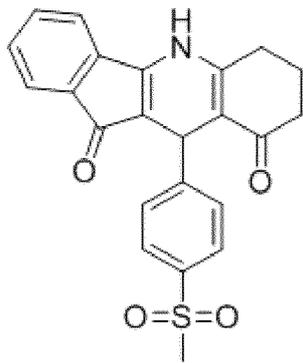
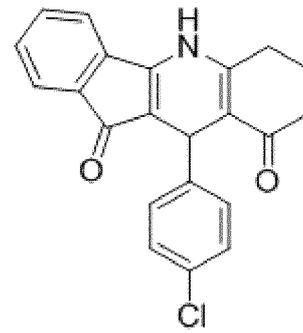
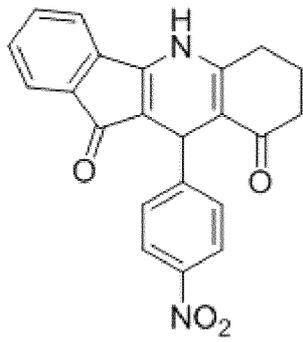
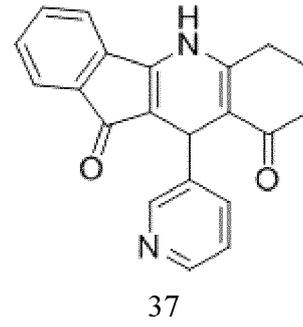
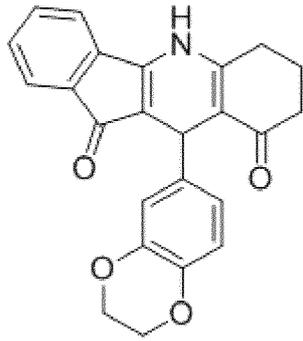
33

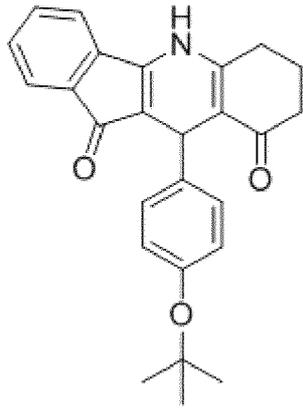


34

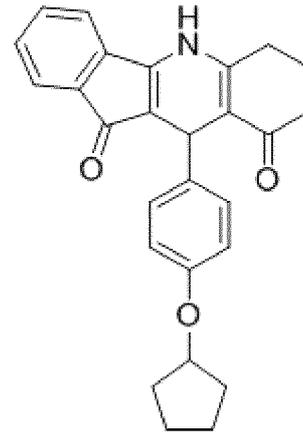


35

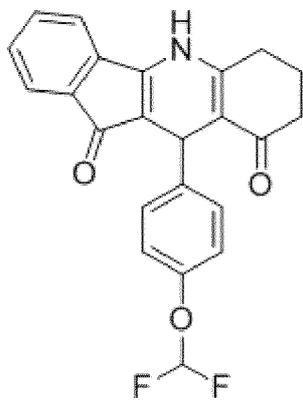




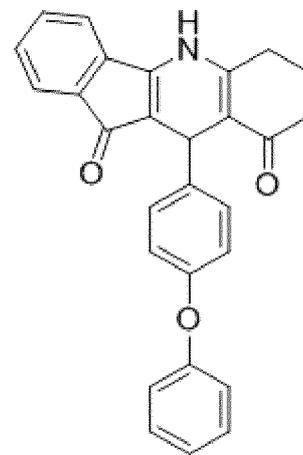
44



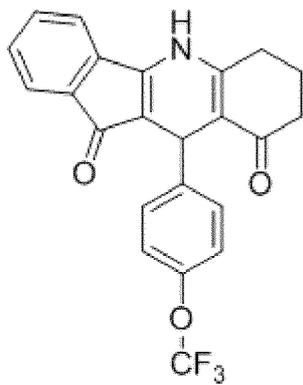
45



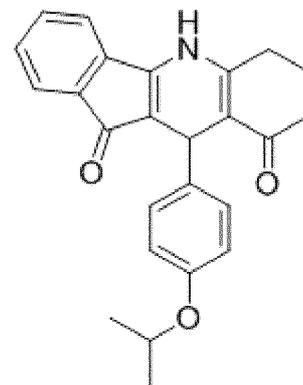
46



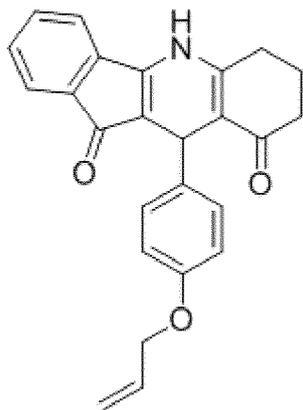
47



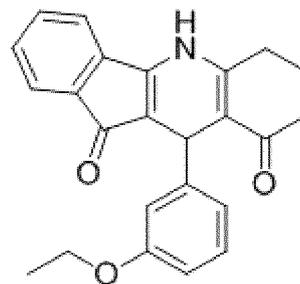
48



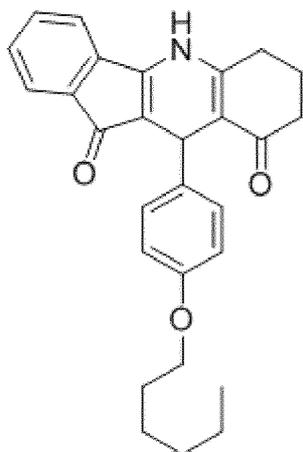
49



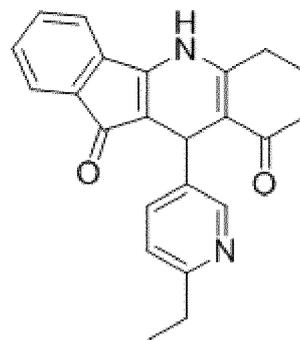
50



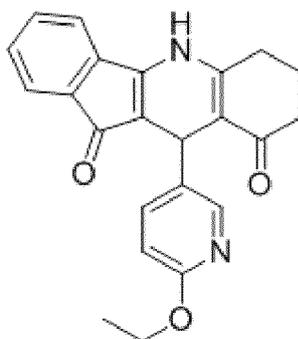
51



52

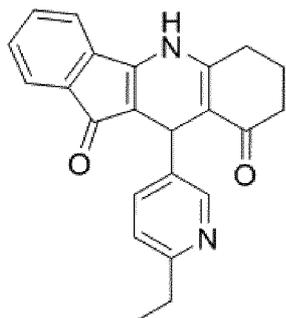


54

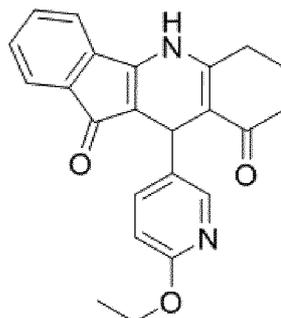


55

В некоторых вариантах осуществления, соединение формулы (IVE) представляет собой соединение 54 или 55.

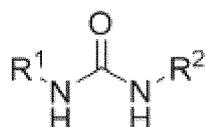


Соединение 54



Соединение 55

В некоторых вариантах осуществления, ингибирующее GPR174 соединение имеет структуру в соответствии со следующей формулой (V):



(V)

или ее стереоизомером, или ее таутомером, или ее фармацевтически приемлемой солью, где

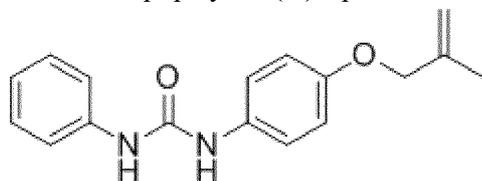
R¹ представляет собой фенил, и

R² представляет собой необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил.

В некоторых вариантах осуществления формулы (V), R² представляет собой необязательно замещенный фенил.

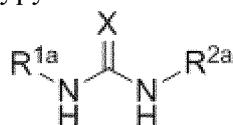
В некоторых вариантах осуществления формулы (V), R² представляет собой фенил, замещенный *para*-C₂-C₆ алкенокси.

В некоторых вариантах осуществления формулы (V), R² представляет собой фенил, замещенный *para*-(2-метилаллил)окси. В некоторых вариантах осуществления формулы (V), соединение формулы (V) представляет собой соединение 56:



56

В некоторых вариантах осуществления, ингибирующее GPR174 соединение имеет структуру в соответствии со следующей формулой (Va):



(Va)

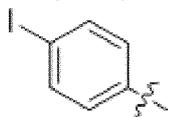
или ее стереоизомером, или ее таутомером, или ее фармацевтически приемлемой солью, где

X представляет собой O или S;

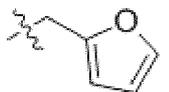
R^{1a} представляет собой необязательно замещенный фенил; и

R^{2a} представляет собой необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₃-C₉ гетероарил или необязательно замещенный C₃-C₁₀ гетероарилалкил.

В некоторых вариантах осуществления, R^{1a} представляет собой замещенный фенил. В некоторых более конкретных вариантах осуществления, R^{1a} является необязательно замещенным гало (например, F, Br, Cl или I). В некоторых вариантах осуществления, R^{1a} имеет следующую структуру:

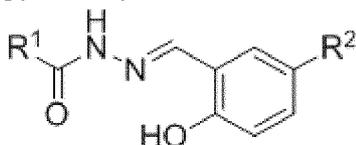


В некоторых вариантах осуществления, R^{2a} представляет собой необязательно замещенный C₃-C₁₀ гетероарилалкил. В некоторых вариантах осуществления, R^{2a} является незамещенным. В некоторых более конкретных вариантах осуществления, R^{2a} имеет следующую структуру:



В некоторых вариантах осуществления, X представляет собой O. В конкретных вариантах осуществления, X представляет собой S.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к ингибирующему GPR174 соединению, в соответствии с формулой (VI):



(VI)

или ее стереоизомером, или ее таутомером, или ее фармацевтически приемлемой солью, где

R¹ представляет собой необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил, и

R² представляет собой галоген.

В некоторых вариантах осуществления формулы (VI), связь N=C имеет конфигурацию (E).

В некоторых вариантах осуществления формулы (VI), связь N=C имеет конфигурацию (Z).

В некоторых вариантах осуществления формулы (VI), R¹ представляет собой необязательно замещенный пиридирил или необязательно замещенный фуранил.

В некоторых вариантах осуществления формулы (VI), R¹ представляет собой

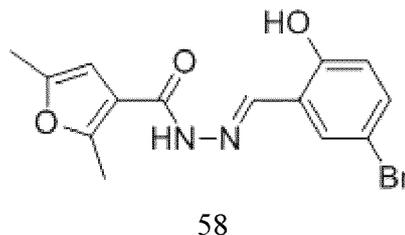
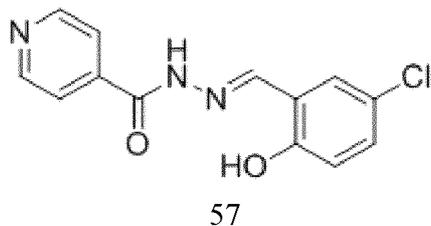
пиридин-4-ил.

В некоторых вариантах осуществления формулы (VI), R¹ представляет собой 2,5-диметил-фул-3-ил.

В некоторых вариантах осуществления формулы (VI), R² представляет собой гало.

В некоторых вариантах осуществления формулы (VI), R² представляет собой хлор или бром.

В некоторых вариантах осуществления формулы (VI), соединение формулы (VI) представляет собой соединение 57 или 58:



или его стереоизомер, или его таутомер или его фармацевтически приемлемую соль.

В любом из вариантов осуществления, описанных в настоящем описании, соединение может представлять собой соединение, описанное в таблице 1 (например, любое из соединений 1-59).

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу идентификации модулирующего средства, способного модулировать опосредованный GPR174 путь передачи сигналов Gs, включающему:

(a) приведение в контакт клетки с модулирующим средством-кандидатом, где указанная клетка экспрессирует GPR174 и включает опосредованный GPR174 путь передачи сигналов, и

(b) определение того, модулирует ли модулирующее средство-кандидат опосредованный GPR174 путь передачи сигналов Gs, по сравнению с клеткой, приведенной в контакт с контролем, или по сравнению с эталонным стандартом. В некоторых вариантах осуществления, указанное модулирующее средство-кандидат представляет собой химическое соединение, включающее структуру в соответствии с любой из формул I-VI, описанных в настоящем описании. В конкретных вариантах осуществления, стадия (b) дополнительно включает проведение анализа для детекции по меньшей мере одного из следующего: экспрессии гена репортера транскрипции, активности GTPазы, уровня cAMP, уровня внутриклеточного мессенджера, уровня кальция, активности нижестоящей киназы, активации транскрипции нижестоящих генов, изменения морфологии клеток, изменения скорости роста клеток, высвобождения арахидоновой кислоты или скорости внеклеточного закисления.

В некоторых вариантах осуществления, модулирующее средство-кандидат выбрано из группы, состоящей из соединения, нуклеиновой кислоты, природного экстракта и газа. В конкретных вариантах осуществления, соединение представляет собой низкомолекулярное соединение. В конкретных вариантах осуществления, химическое

соединение включает структуру в соответствии с любой из формул I-VI, описанных в настоящем описании.

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способу идентификации модулирующего средства, способного модулировать активность опосредованного GPR174 пути передачи сигналов Gs, включающему:

(a) приведение клетки, экспрессирующей GPR174, в контакт с:
(i) по меньшей мере одним модулирующим средством-кандидатом; и
(ii) эталонным химическим соединением, как известно, модулирующим активность опосредованного GPR174 пути передачи сигналов Gs;

(b) определение уровня активности опосредованного GPR174 пути передачи сигналов в клетке, приведенной в контакт в соответствии со стадией (a); и

(c) сравнение уровня активности опосредованного GPR174 пути передачи сигналов в клетке, приведенной в контакт только с эталонным химическим соединением, с активностью опосредованного GPR174 пути передачи сигналов, определенного на стадии (b); где различие активности опосредованной GPR174 передачи сигналов между клеткой, содержащей модулирующее средство-кандидат в присутствии эталонного соединения, и клеткой, приведенной в контакт только с эталонным соединением, показывает, что модулирующее средство-кандидат является способным модулировать активность GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, указанное эталонное химическое соединение, как известно, модулирующее активность опосредованного GPR174 пути передачи сигналов Gs, содержит структуру в соответствии с любой из формул I-VI, описанных в настоящем описании. В конкретных вариантах осуществления, стадия (b) дополнительно включает проведение анализа для детекции по меньшей мере одного из следующего: экспрессии гена репортера транскрипции, активности GTPазы, уровня cAMP, уровня внутриклеточного мессенджера, уровня кальция, активности нижестоящей киназы, активации транскрипции нижестоящих генов, изменения морфологии клеток, изменения скорости роста клеток, высвобождения арахидоновой кислоты или скорости внеклеточного закисления. В некоторых вариантах осуществления, модулирующее средство-кандидат выбрано из группы, состоящей из соединения, нуклеиновой кислоты, природного экстракта и газа. В конкретных вариантах осуществления, соединение представляет собой химическое соединение. В конкретных вариантах осуществления, низкомолекулярное соединение включает структуру в соответствии с любой из формул I-VI.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу идентификации модулирующего средства, способного модулировать активность опосредованного GPR174 пути передачи сигналов. Способ включает: (a) приведение клетки, экспрессирующей GPR174, в контакт с (i) по меньшей мере одним модулирующим средством-кандидатом и (ii) эталонным химическим соединением, как известно, модулирующим активность опосредованного GPR174 пути передачи сигналов; (b) определение уровня активности опосредованного GPR174 пути передачи сигналов в клетке, приведенной в контакт в

соответствии со стадией (a); и (c) сравнение уровня активности опосредованного GPR174 пути передачи сигналов в клетке, приведенной в контакт только с эталонным химическим соединением, с активностью опосредованного GPR174 пути передачи сигналов, определенного на стадии (b); в котором различие активности опосредованной GPR174 передачи сигналов между клеткой, содержащей модулирующее средство-кандидат в присутствии эталонного соединения, и клеткой, приведенной в контакт только с эталонным соединением, показывает, что модулирующее средство-кандидат является способным модулировать активность GPR174. В некоторых вариантах осуществления, эталонное химическое соединение включает структуру в соответствии с любой из формул I-VI (например, любое из соединений 1-59).

В конкретных вариантах осуществления, стадия (b) дополнительно включает проведение анализа для детекции по меньшей мере одного из следующего: экспрессии гена репортера транскрипции, активности GTPазы, уровня cAMP, уровня внутриклеточного мессенджера, уровня кальция, активности нижестоящей киназы, активации транскрипции нижестоящих генов, изменения морфологии клеток, изменения скорости роста клеток, высвобождения арахидоновой кислоты или скорости внеклеточного закисления.

В некоторых вариантах осуществления, модулирующее средство-кандидат выбрано из группы, состоящей из соединения, нуклеиновой кислоты, природного экстракта и газа. В конкретных вариантах осуществления, соединение представляет собой низкомолекулярное химическое соединение.

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способу применения низкомолекулярного химического соединения для ингибирования опосредованного GPR174 пути передачи сигналов в клетке. Способ включает следующие стадии:

(a) предоставления низкомолекулярного химического соединения, которое функционально взаимодействует с GPR174 и ингибирует опосредованный GPR174 путь передачи сигналов Gs в клетках, экспрессирующих GPR174, где соединение характеризуется по меньшей мере одним из следующих критериев:

(i) соединение имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из формулы I, II, III, IV, V и VI (или (I), (II), (III), (IV), (V), (Va) или (VI)); или

(ii) соединение изменяет аффинность связывания любого из эталонных соединений 1-59 (как указано в таблице 1) с GPR174; или

(iii) соединение вызывает различие в ингибирующей активности любого из эталонных соединений 1-59 (как указано в таблице 1) в анализе опосредованного GPR174 пути передачи сигналов, при тестировании в присутствии эталонного соединения, по сравнению с ингибирующей активностью эталонного соединения отдельно; и

(b) приведение клетки, экспрессирующей GPR174, включающей опосредованный GPR174 путь передачи сигналов, в контакт с соединением в соответствии со стадией (a), таким образом, ингибирование опосредованного GPR174 пути передачи сигналов в клетке.

В другом аспекте, настоящее изобретение относится к способу применения

низкомолекулярного химического соединения для ингибирования опосредованного GPR174 пути передачи сигналов в клетке. Способ включает следующие стадии:

(a) предоставления низкомолекулярного химического соединения, которое функционально взаимодействует с GPR174 и ингибирует опосредованный GPR174 путь передачи сигналов Gs в клетках, экспрессирующих GPR174, где соединение характеризуется по меньшей мере одним из следующих критериев:

(i) соединение имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из формулы I, II, III, IV, V и VI (или (I), (II), (III), (IV), (V), (Va) или (VI)); или

(ii) соединение изменяет кажущуюся аффинность связывания любого из эталонных соединений 1-59 (как указано в таблице 1) с GPR174; или

(iii) указанное соединение вызывает различие в ингибирующей активности любого из эталонных соединений 1-59 (как указано в таблице 1), в анализе опосредованного GPR174 пути передачи сигналов, при тестировании в присутствии указанного эталонного соединения, по сравнению с ингибирующей активностью эталонного соединения отдельно;
и

(b) приведения клетки, экспрессирующей GPR174, включающей опосредованный GPR174 путь передачи сигналов, в контакт с соединением в соответствии со стадией (a), таким образом, ингибирования опосредованного GPR174 пути передачи сигналов в клетке.

В некоторых вариантах осуществления, соединение изменяет аффинность связывания любого из эталонных соединений 1-59 (как указано в таблице 1) с GPR174. В конкретных вариантах осуществления, соединение уменьшает (т.е., ингибирует) аффинность связывания любого из эталонных соединений 1-59 с GPR174. В конкретных вариантах осуществления, соединение конкурентно уменьшает (т.е., конкурентно ингибирует) аффинность связывания любого из эталонных соединений 1-59 с GPR174. В других вариантах осуществления, соединение увеличивает аффинность связывания любого из эталонных соединений 1-59 (как указано в таблице 1) с GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, соединение изменяет кажущуюся аффинность связывания любого из эталонных соединений 1-59 (как указано в таблице 1) для GPR174. В конкретных вариантах осуществления, соединение уменьшает кажущуюся аффинность связывания любого из эталонных соединений 1-59 для GPR174. В конкретных вариантах осуществления, соединение конкурентно связывается с GPR174 и уменьшает кажущуюся аффинность связывания любого из эталонных соединений 1-59 для GPR174. В альтернативных вариантах осуществления, соединение аллостерически связывается с GPR174 и уменьшает кажущуюся аффинность связывания любого из эталонных соединений 1-59 для GPR174. В других вариантах осуществления, соединение увеличивает аффинность связывания любого из эталонных соединений 1-59 (как указано в таблице 1) для GPR174.

В конкретных вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов настоящего изобретения, опосредованный GPR174 путь передачи сигналов представляет

собой путь Gs.

В некоторых вариантах осуществления любого из вышеуказанных аспектов, клетка находится в субъекте-млекопитающем, нуждающемся в лечении любого состояния, заболевания или нарушения, описанного в настоящем описании.

Ингибирование опосредованной АТФ-аденозин-А2аR- и/или А2bR передачи сигналов (например, антагонист А2аR и/или антагонист А2bR, и/или ингибитор CD73, и/или ингибитор CD38, и/или ингибитор CD39)

Передача сигналов аденозина, через путь рецептора А2А и/или рецептора А2В, в частности, идентифицирована как многообещающий способ иммунотерапии злокачественных опухолей. Leone *et al.*, «Targeting adenosine for cancer immunotherapy», *J. ImmunoTher. Cancer.*, 2018, 6:57. Allard *et al.*, «The ectonucleotidases CD39 and CD73: novel checkpoint inhibitor targets», *Immunol. Rev.*, 2017, 276(1), 121-144 (см. также таблицу 15 ниже). Аденозин представляет собой иммуносупрессивный метаболит, продуцируемый на высоких уровнях в микроокружении опухолей. Передача сигналов аденозина возникла в качестве ключевого метаболического пути, регулирующего иммунитет опухолей. В частности, передача сигналов аденозина через рецептор А2А, экспрессированный на иммунocyтах, сильно ослабляет иммунные ответы в воспаленных тканях. Аденозин продуцируется в условиях гипоксии в воспаленных и злокачественных тканях посредством превращения АТФ, опосредованного ферментами CD73 (NT5E, 5'-нуклеотидазой (5'-NT) или экто-5'-нуклеотидазой) и CD39 (эктонуклеозид-трифосфат-дифосфогидролазой-1, NTPDазой1). Аденозин может также продуцироваться из NAD⁺ по оси с центром на метаболизирующем NAD⁺ CD38, образующем аденозиндифосфат-рибозу (ADPR). Показано, что аденозин, образованный посредством опосредованного CD38 пути, коррелирует с прогрессированием миелома человека (Horenstein *et al.*, *Mol Med* 22:694-704, 2016). Образование и передача сигналов аденозина, в частности, через рецептор А2А, играет роль в разрешении воспаления в ответ на повреждение ткани, ослабляя иммунный ответ. Это объединение заживления ран и иммуносупрессии, однако, представляет механизм ускользания злокачественной опухоли от иммунологического надзора. Соответственно, ингибирование пути гипоксии-CD38-CD39-CD73-А2АР идентифицировано в качестве многообещающей мишени для иммунотерапии злокачественных опухолей.

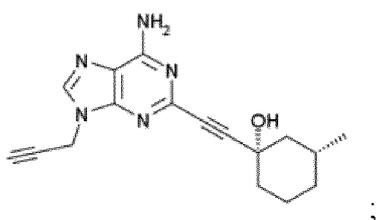
Ингибиторы пути АТФ-рецептора аденозина А2А и/или А2В

Ингибиторы пути АТФ-рецептора аденозина А2А и/или ингибиторы пути АТФ-рецептора аденозина А2В, которые можно использовать в комбинации с ингибиторами GPR174 в композициях, способах и применениях, описанных в настоящем описании, включают антагонисты рецептора аденозина А2А, антагонисты рецептора А2В и ингибиторы ферментов, деградирующих АТФ до аденозина, таких как ингибиторы CD73 и ингибиторы CD38, и ингибиторы ингибиторов CD39, и комбинации таких средств.

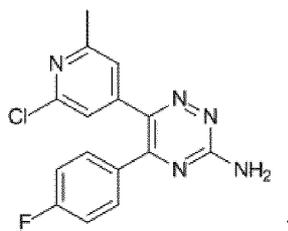
Антагонисты рецептора аденозина А2А

Антагонисты рецептора аденозина A2A включают соединения ATL-444, AZD4635, кофеин, цифораденант (CPI-444; V81444), CPI-445, EOS100850, МК-3814, истрадефиллин (KW-6002), MSX-3, PBF-509 (NIR178), преладенант (SCH-420,814), SCH-58261, SCH-412,348, SCH-442,416, ST-1535, ST-4206, теофиллин, тозаденант (SYN115), VER-6623, VER-6947, VER-7835, випаденант (ВІІВ-014) и ZM-241,385, структуры которых приведены ниже.

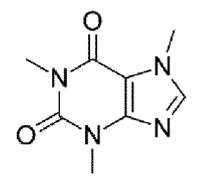
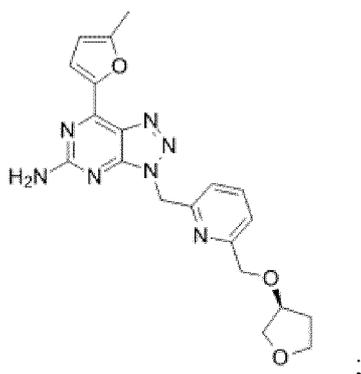
ATL-444



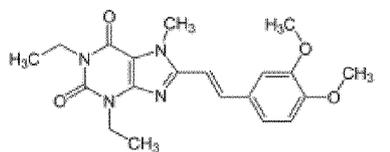
AZD4635



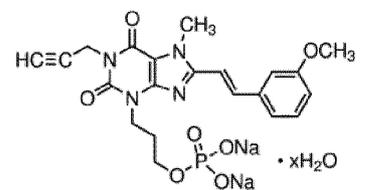
Кофеин

Цифораденант (CPI-444;
V81444)

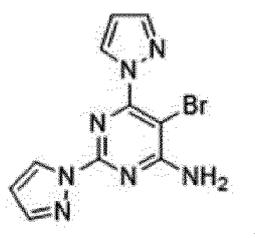
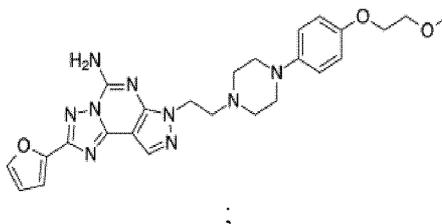
Истрадефиллин (KW-6002)



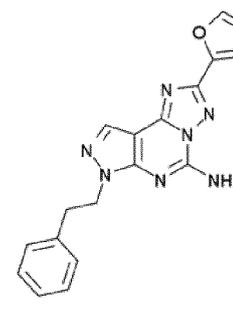
MSX-3



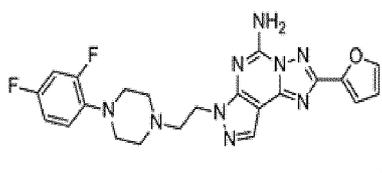
PBF-509 (NIR178)

Преладенант
(SCH-420,814)

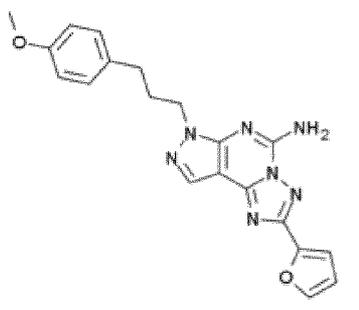
SCH-58261



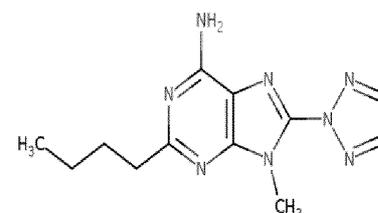
SCH-412,348

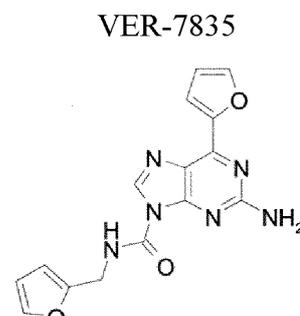
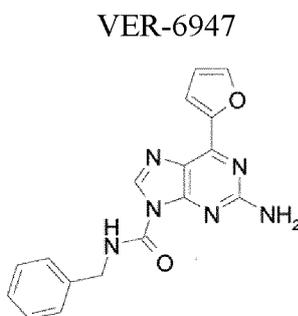
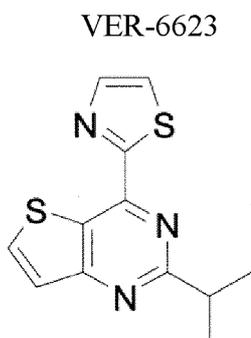
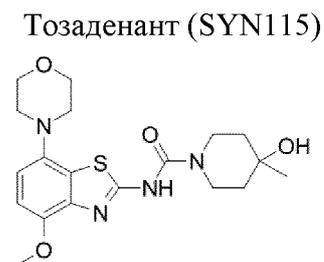
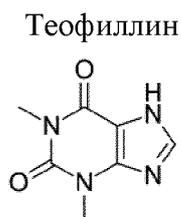
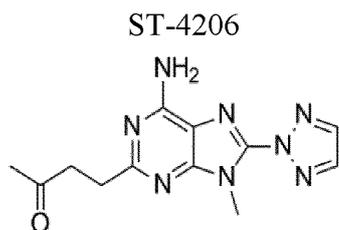


SCH-442,416

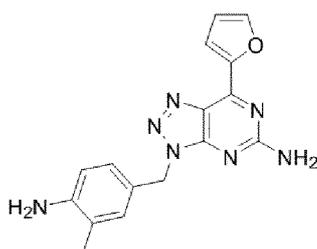


ST-1535

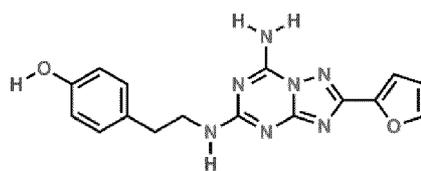




Випаденант (ВІІВ-014)



ZM-241,385



Дополнительные антагонисты рецептора A2A описаны в Preti, *et al.*, «History and Perspectives of A2A Adenosine Receptor Antagonists as Potential Therapeutic Agents», *Med. Res. Rev.*, 2015, 35(4), 790-848, содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки, и Congreve *et al.*, «Targeting adenosine A2A receptor antagonism for treatment of cancer», *Exp. Opin. Drug Discov.*, 2018, 13(11), 997-1003.

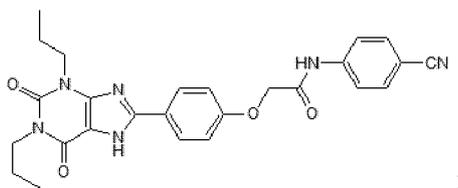
Другие антагонисты рецептора A2A описаны в следующих международных патентных заявках, содержание которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки: Публикации PCT No. WO 2019/007140; WO 2018/166493; WO 2018/161910; WO 2018/130184; WO 2018/059531; WO 2017/136375; WO 2017/112917; WO 2017/008205; WO 2017/011214; WO 2016/200717; WO 2016/126570; WO 2016/087429; WO 2016/081290; WO 2015/020565; WO 2014/105664; WO 2014/105666; WO 2014/101120; WO 2014/101113; WO 2013/156614; WO 2013/058681; WO 2012/129381; WO 2012/112962; WO 2012/061787; WO 2012/060844; WO 2012/038980; WO 2011/061527; WO 2011/060207; WO 2011/053507; WO 2010/040003; WO 2010/037122; WO 2009/055308; WO 2009/050198; WO 2008/055711; WO 2007/047293; WO 2007/038212; WO 2006/137527; WO 2006/129626; WO 2006/124770; WO 2006/083949; WO 2012/03898; WO 2011/06152; WO 2011/06020; WO 2011/05350; WO

2010/04000; WO 2010/03712; WO 2009/055308; WO 2009/050198; WO 2008/055711; WO 2007/047293; WO 2007/038212; WO 2006/137527; WO 2006/129626; WO 2006/124770; и WO 2006/083949.

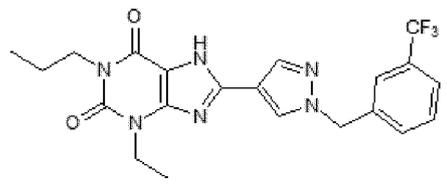
Антагонисты рецептора аденозина A2B

Антагонисты рецептора аденозина A2B включают соединения MRS-1754, GS-6201, ISAM-140, PSB-0788, PSB-1115 и PSB-603 структуры которых приведены ниже:

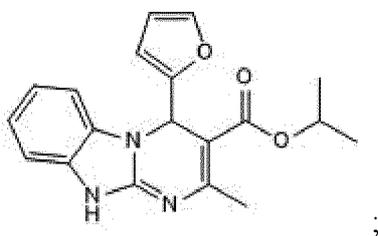
MRS-1754



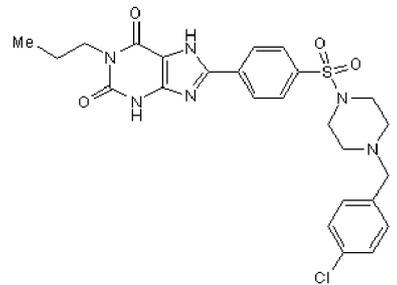
GS-6201



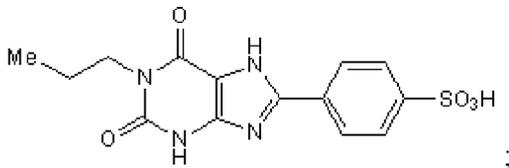
ISAM-140



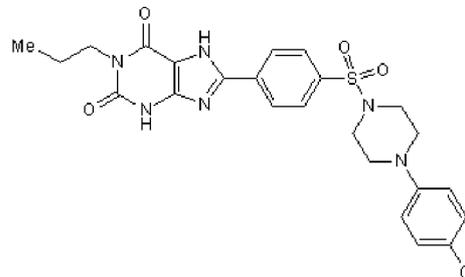
PSB-0788



PSB-1115



PSB-603



Дополнительные антагонисты рецептора A2B включают ATL-801, CVT-6883, MRS-1706, OSIP-339.391, PSB-1901, PBF-1129 и дополнительные антагонисты рецептора A2B, как описано в Vigano S. et al., *Frontiers in Immunology* vol 10:925, 2019; Volpini R. et al., *Journal of Med Chem* 45(15):3271-9, 2002; Volpini R. et al., *Current Pharmaceutical Design* 8(25):2285-98, 2002; Baraldi P.G. et al., *Journal of Med Chem* 47(6):1434-47, 2004; Cacciari B. et al., *Mini Reviews in Med Chem* 5(12):1053-60, 2005; Baraldi P.G. et al., *Current Med Chem* 13(28):3467-82, 2006; Beukers M.W. et al., *Medicinal Research Reviews*, 26(5):667-98, 2006; Elzein E. et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 16(2):302-6, 2006; Carotti A. et al., *Journal of Med Chem* 49(1):282-99, 2006; Tabrizi M.A. et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16(5):2419-30, 2008; Stefanachi A. et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16(6):2852-69, 2008 and Jiang et al., *Journal of Med Chem* 62(8):4032-4055, 2019, так же как соединение 38, описанное в Stefanachi A. et al., *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 16(22):9780-9, 2008.

Другие антагонисты рецептора A2B описаны в следующих международных

патентных заявках, содержание которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки: Публикации PCT No. WO 1995/011681; WO 1999/042093; WO 2000/049051; WO 2000/073307; WO 2009/157938; WO 2011/005871; WO 2012/112964; WO 2007/149277; WO 2019/123482; WO 2007/134958; WO 2005/051951; WO 2003/042214; WO 2007/039297; WO 2005/040155; WO 2005/042534; WO 2004/106337; WO 2001/016134; WO 2008/027585; WO 2003/053366; WO 2003/053361; WO 2005/070926; WO 2008/080461; WO 2016/150901; WO 2005/051951; WO 2003/042214; WO 2003/063800; и WO 2016/164838.

Ингибиторы CD73 (NT5E, 5'-нуклеотидазы (5'-NT) или экто-5'-нуклеотидазы)

Ингибиторы CD73 могут включать антитела против CD73, нуклеотиды (например, ингибирующую РНК), которые ингибируют экспрессию CD73, так же как химические (например, низкомолекулярные) ингибиторы.

Антитела против CD73, включая олеклумаб, описаны в следующих международных патентных заявках, содержание которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки: Публикации PCT No. WO 2018/237157; WO 2018/237173; WO 2018/215535; WO 2018/187484; WO 2018/137598; WO 2018/013611; WO 2017/152085; WO 2017/118613; WO 2017/100670; WO 2017/064043; WO 2016/131950; WO 2016/081748; WO 2016/075176; WO 2016/075099; и WO 2016/055609.

Нуклеотиды, ингибирующие экспрессию CD73, описаны в следующих международных патентных заявках, содержание которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки: Публикация PCT No. WO 2018/065627.

Ингибиторы CD73 включают натриевую соль N-бензил- α,β -метиленаденозин-5'-дифосфата и натриевую соль α,β -метиленаденозин 5'-дифосфата (PSB 12379), BMS-986179, MEDI9447, CPI-006 и NZV930. Ингибиторы CD73 описаны также в следующих международных патентных заявках, содержание которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки: Публикации PCT No WO 2018/208727; WO 2018/208980; WO 2018/187512; WO 2018/183635; WO 2018/110555; WO 2018/094148; WO 2018/067424; WO 2017/153952; WO 2017/120508; WO 2017/098421; WO 2015/164573; WO 2015/049447; и WO 2007/135195.

Отмечено, что в то время как ингибиторы CD73 являются применимыми в композициях и способах, описанных в настоящем описании, для лечения злокачественной опухоли, использования ингибитора CD73 предпочтительно избегают во время раннего формирования опухоли и в условиях метастазирования из-за того факта, что образованный посредством CD73 аденозин может помогать в предотвращении метастазирования (может действовать в качестве барьера в эндотелии сосудов), таким образом, может являться предпочтительным наличие CD73, остающегося активным в таких условиях.

Ингибиторы CD38 (гидролазы циклической ADP-рибозы)

CD38 представляет собой эктофермент, катализирующий синтез и гидролиз циклической ADP-рибозы (сADPR) из NAD⁺ до ADP-рибозы, в дополнение к синтезу NAADP из NADP⁺.¹

Ингибиторы CD38 могут включать антитела против CD38, нуклеотиды (например, ингибирующую РНК), которые ингибируют экспрессию CD38, так же как химические (например, низкомолекулярные) ингибиторы.

Антитела против CD38, включая даратумумаб, и другие ингибиторы CD38, описаны в следующих публикациях и международных патентных заявках, содержание которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки; Xia C, et al, *Drugs of Today*. **52** (10): 551-560, 2016; Escande C. et al., *Diabetes* 62(4):1084-1093, 2013; Патент США No. 9840496; Публикации патентов США No. 2018/85383; 2017/0260164; Публикации PCT No. WO 2019/140410; WO 2019/74973; WO 2019/0904931; WO 2019/087151; WO 2019/074973; WO 2019/034753; WO 2019/034752; WO 2019/020643; WO 2018/224685; WO 2018/224683; WO 2018/224682; WO 2016/087975; и WO 2013/002879

Ингибиторы CD39 (эктонуклеозидтрифосфат-дифосфогидролазы-1, NTPДазы1)

Ингибиторы CD39 могут включать антитела против CD39, нуклеотиды (например, ингибирующую РНК), которые ингибируют экспрессию CD39, так же как химические (например, низкомолекулярные) ингибиторы.

Антитела против CD39, включая ТТХ-030, описаны в следующих международных патентных заявках, содержание которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки: Публикации PCT No. WO 2018/167267; WO 2018/065552; WO 2017/191300; WO 2017/157948; WO 2017/089334; WO 2017/064043; WO 2016/073845; WO 2012/085132; и WO 2009/095478.

Нуклеотиды, ингибирующие экспрессию CD39, описаны в следующих международных патентных заявках, содержание которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки: Публикация PCT No. WO 2018/065622.

Ингибиторы CD39 включают метавольфрамат натрия (POM 1); тринатриевую соль 6-N, N-диэтил-D-β,γ-дибромметилена-АТФ (ARL-67156); натриевую соль 1-амино-4-(1-нафтил)аминоантрахинон-2-сульфоновой кислоты (PSB 06126), натриевую соль 1-амино-4-(4-хлорфенил)аминоантрахинон-2-сульфоновой кислоты (PSB069) и IPH52. Ингибиторы CD39 описаны также в следующих международных патентных заявках, содержание которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки: Публикация PCT No. WO 2007/135195.

Другие признаки и преимущества настоящего изобретения очевидны из следующего подробного описания, чертежей и формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

ФИГУРА 1А показывает аминокислотную последовательность GPR174 человека (NP_115942.1), указанную как SEQ ID NO:1.

ФИГУРА 1В показывает кДНК, кодирующую GPR174 человека (NM_032553.1), указанную как SEQ ID NO:2.

ФИГУРА 1С показывает аминокислотную последовательность GPR174 мыши (NP_001028423.1), указанную как SEQ ID NO:3.

ФИГУРА 1D показывает аминокислотную последовательность GPR174 крысы (NP_001100408.1), указанную как SEQ ID NO:4.

ФИГУРА 2 представляет собой график, показывающий, что порядок ранжирования зарегистрированной активности множества известных агонистов мускаринового рецептора ацетилхолина M1 (CHRM1) сохраняется в анализе клеточного перераспределения (CRA).

ФИГУРА 3 представляет собой схематическую диаграмму, показывающую алгоритм, используемый для определения профиля передачи сигналов G-белка для орфанного GPCR.

ФИГУРА 4A представляет собой график, показывающий эффект различных соединений на передачу сигналов бета-2 адренергического рецептора (ADBR2).

ФИГУРА 4B представляет собой график, показывающий эффекты сверхэкспрессии ADBR2 на репортер CRE-luc, как определено посредством временной трансфекции увеличивающимися количествами (нг) ДНК, кодирующей ADBR2.

ФИГУРА 4C представляет собой график, показывающий эффекты сверхэкспрессии ADBR2 на репортер NFAT-luc, как определено посредством временной трансфекции увеличивающимися количествами (нг) ДНК, кодирующей ADBR2.

ФИГУРА 4D представляет собой график, показывающий, что соединение ICI 118551, обратный агонист ADBR2, специфически ингибирует активность репортера CRE-luc в клетках, временно трансфицированных ADBR2.

ФИГУРА 4E представляет собой график, показывающий, что соединение ICI 118551 не ингибирует активность репортера NFAT-luc в клетках, временно трансфицированных ADBR2.

ФИГУРА 5A представляет собой график, иллюстрирующий кривые зависимости ответа от дозы репрезентативных соединений, включая соединения 1, 2, 3, 4 и 20, против GPR174 в анализе перераспределения клеток (CRA).

ФИГУРА 5B представляет собой график, иллюстрирующий кривую зависимости ответа от дозы репрезентативных соединений, включая соединения 1, 2, 3, 4 и 20, против CHRM1 в анализе CRA. Также показана кривая зависимости ответа от дозы взаимодействующего с CHRM1 соединения пирензепина.

ФИГУРЫ 6A-6B представляют собой графики, показывающие, что соединение 1 (группа I) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174 (ФИГУРА 6A), но не в присутствии ADBR2 (ФИГУРА 6B).

ФИГУРЫ 7A-7B представляют собой графики, показывающие, что соединение 2 (группа I) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174 (ФИГУРА 7A), но не в присутствии ADBR2 (ФИГУРА 7B).

ФИГУРЫ 8A-8B представляют собой графики, показывающие, что соединение 4 (группа I) не модулировало путь Gs в присутствии GPR174 (ФИГУРА 8A) и не модулировало путь Gs в присутствии ADBR2 (ФИГУРА 8B).

ФИГУРЫ 9A-9B представляют собой графики, показывающие, что соединение 6

(группа I) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174 (ФИГУРА 9А), но не в присутствии ADBR2 (ФИГУРА 9В).

ФИГУРЫ 10А-10В представляют собой графики, показывающие, что соединение 7 (группа I) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174 (ФИГУРА 10А), но не в присутствии ADBR2 (ФИГУРА 10В).

ФИГУРЫ 11А-11В представляют собой графики, показывающие, что соединение 10 (группа I) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174 (ФИГУРА 11А), но не в присутствии ADBR2 (ФИГУРА 11В).

ФИГУРЫ 12А-12В представляют собой графики, показывающие, что соединение 11 (группа I) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174 (ФИГУРА 12А), но не в присутствии ADBR2 (ФИГУРА 12В).

ФИГУРЫ 13А-13В представляют собой графики, показывающие, что соединение 19 (группа II) не модулировало путь Gs в присутствии GPR174 (ФИГУРА 13А) и не модулировало путь Gs в присутствии ADBR2 (ФИГУРА 13В).

ФИГУРЫ 14А-14В представляют собой графики, показывающие, что соединение 21 (группа III) не модулировало путь Gs в присутствии GPR174 (ФИГУРА 14А) и не модулировало путь Gs в присутствии ADBR2 (ФИГУРА 14В).

ФИГУРЫ 15А-15В представляют собой графики, показывающие, что соединение 22 (группа IV) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174 (ФИГУРА 15А), но не в присутствии ADBR2 (ФИГУРА 15В).

ФИГУРА 16А-16В представляют собой графики, показывающие, что соединение 23 (группа IV) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174 (ФИГУРА 16А), но не в присутствии ADBR2 (ФИГУРА 16В).

ФИГУРА 17А-17В представляют собой графики, показывающие, что соединение 31 (группа IV) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174 (ФИГУРА 17А), но не в присутствии ADBR2 (ФИГУРА 17В).

ФИГУРЫ 18А-18В представляют собой графики, показывающие, что соединение 33 (группа IV) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174 (ФИГУРА 18А), но не в присутствии ADBR2 (ФИГУРА 18В).

ФИГУРЫ 19А-19В представляют собой графики, показывающие, что соединение 36 (группа IV) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174 (ФИГУРА 19А), но не в присутствии ADBR2 (ФИГУРА 19В).

ФИГУРЫ 20А-20В представляют собой графики, показывающие, что соединение 42 (группа IV) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174 (ФИГУРА 20А), но не в присутствии ADBR2 (ФИГУРА 20В).

ФИГУРЫ 21А-21В представляют собой графики, показывающие, что соединение 4 (группа I) не модулирует путь Gs в присутствии GPR174, но конкурирует с агонистом GPR174 LysoPS (ФИГУРА 21А), и ни соединение 4, ни LysoPS не модулируют передачу сигналов Gs в присутствии ADBR (ФИГУРА 21В).

ФИГУРА 22 графически иллюстрирует относительное содержание транскрипта GPR174 в тканях человека, как измерено посредством qПЦР, как описано в примере 5.

ФИГУРА 23 графически иллюстрирует относительное содержание транскрипта GPR174 в лимфоидных клетках человека, как измерено посредством qПЦР, как описано в примере 5.

ФИГУРА 24А графически иллюстрирует процент FoxP3⁺Helios⁻ клеток в CD4⁺ популяции клеток на сутки 3 после стимуляции в культурах мононуклеарных клеток периферической крови (РВМС) человека, обработанных носителем, соединением 10 или интерлейкином-2 (IL-2) ($n=0,03$ для соединения 10 против носителя; $p=0,003$ для IL-2 против носителя), как описано в примере 6.

ФИГУРА 24В графически иллюстрирует процент FoxP3⁺Helios⁺ клеток в CD4⁺ популяции клеток на сутки 7 после стимуляции в культурах РВМС, обработанных носителем, соединением 10 или IL-2 ($p=0,01$ для соединения 10 против носителя; $p=0,01$ для IL-2 против носителя), как описано в примере 6.

ФИГУРА 25 графически иллюстрирует количество IL-2 в культуральных супернатантах (кратность по сравнению с уровнями для носителя) на сутки 2 после стимуляции в культурах РВМС, обработанных носителем или соединением 10 (1 мкМ, 3 мкМ или 10 мкМ), как описано в примере 6.

ФИГУРА 26 графически иллюстрирует количество IFN- γ в культуральных супернатантах (кратность по сравнению с уровнями для носителя) на сутки 2 после стимуляции в культурах РВМС, обработанных носителем или соединением 10 (1 мкМ, 3 мкМ или 10 мкМ), как описано в примере 6.

ФИГУРА 27 графически иллюстрирует количество IL-2 (пг/мл) в культуральных супернатантах через 48 часов после стимуляции в культурах спленоцитов от мышей WT или GPR174 КО, обработанных носителем или соединением 10 (10 мкМ), как описано в примере 7.

ФИГУРА 28 графически иллюстрирует процент FoxP3⁺Helios⁺ клеток в CD4⁺ популяции клеток на сутки 7 после стимуляции в культурах РВМС от одного донора, обработанных носителем или соединением 10 (3 мкМ, 10 мкМ или 30 мкМ) ($n=3$, $*n<0,05$; $**n<0,01$), как описано в примере 8.

ФИГУРА 29 графически иллюстрирует количество IL-2 (пг/мл) в культуральных супернатантах на сутки 3 после стимуляции в культурах РВМС от одного донора, обработанных носителем или ингибирующим GPR174 соединением 10 (3 мкМ, 10 мкМ, 30 мкМ или 60 мкМ), как описано в примере 8.

ФИГУРА 30 графически иллюстрирует долю от значения для носителя FoxP3⁺Helios⁺ клеток в CD4⁺ популяции клеток на сутки 7 после стимуляции в культурах РВМС от восьми различных доноров, обработанных носителем или соединением 10 (30 мкМ), как описано в примере 9.

ФИГУРА 31 графически иллюстрирует количество IL-2 (кратность по сравнению с

продуцированным ИЛ-2 для носителя) в культуральных супернатантах на сутки 2 после стимуляции в культурах РВМС от восьми различных доноров, обработанных носителем или соединением 10 (30 мкМ), как описано в примере 9.

ФИГУРА 32 графически иллюстрирует количество различных цитокинов (кратность по сравнению с продуцированным цитокином для носителя) в культуральных супернатантах на сутки 2 после стимуляции для РВМС человека, полученных от восьми доноров, обработанных носителем или соединением 10 (30 мкМ), где статистически значимую кратность увеличения наблюдали для интерлейкина-6 (ИЛ-6) ($***p < 0,001$), интерлейкина-10 (ИЛ-10) ($*p < 0,05$), интерферона гамма (IFN- γ) ($*p < 0,05$) и фактора некроза опухоли (TNF- α) ($*p < 0,05$), по сравнению с контрольным носителем, и где статистически значимую кратность уменьшения наблюдали для интерлейкина 17 (ИЛ-17А) ($***p < 0,001$), по сравнению с контрольным носителем, как описано в примере 9.

ФИГУРА 33 графически иллюстрирует кратность индукции посредством соединения 10 (30 мкМ) в панели цитокинов в совместно культивированных C57BL/6+DBA1 спленоцитах мыши на сутки 6 после смешивания, по сравнению с уровнями цитокинов, измеренными в совместно культивированных C57BL/6+DBA1 спленоцитах на сутки 6 в отсутствие соединения 10, как описано в примере 10.

На ФИГУРЕ 34А показаны популяции CD4⁺ (46,2%), CD8⁺ (17,1%) и не-Т-клеток (33,9%), присутствующие в репрезентативной культуре РВМС от одного донора, через четыре часа после стимуляции антителом против CD3 и антителом против CD28 в присутствии соединения 10 (10 мкМ), как описано в примере 11.

ФИГУРА 34В графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным ИЛ-2 в популяции CD4⁺ Т-клеток, обработанной соединением 10 (10 мкМ), показанной на ФИГУРЕ 34А, по сравнению с контрольным носителем, как описано в примере 11.

ФИГУРА 34С графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным ИЛ-2 в популяции CD8⁺ Т-клеток, обработанной соединением 10 (10 мкМ), показанной на ФИГУРЕ 34А, по сравнению с контрольным носителем, как описано в примере 11.

На ФИГУРЕ 35А показаны популяции CD4⁺ (31,8%), CD8⁺ (27,5%) и не-Т-клеток (33,1%), присутствующие в репрезентативной культуре РВМС от одного донора, через двое суток после стимуляции антителом против CD3 и антителом против CD28, как описано в примере 11.

ФИГУРА 35В графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием ИЛ-2 в популяции CD4⁺ Т-клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0, или 3,0 мкМ), репрезентативные для которых показаны на ФИГУРЕ 35А, как описано в примере 11.

ФИГУРА 35С графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием ИЛ-2 в популяции CD8⁺ Т-клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0, или 3,0), репрезентативные для которых показаны на ФИГУРЕ 35А, как описано в примере 11.

ФИГУРА 35D графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием IL-2 в популяциях не-T-клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0, или 3,0 мкМ), репрезентативные для которых показаны на ФИГУРЕ 35А, как описано в примере 11.

ФИГУРА 35E графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием IL-10 в популяции CD4⁺ Т-клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0, или 3,0 мкМ), репрезентативные для которых показаны на ФИГУРЕ 35А, как описано в примере 11.

ФИГУРА 35F графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием IL-10 в популяции CD8⁺ Т-клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0, или 3,0 мкМ), репрезентативные для которых показаны на ФИГУРЕ 35А, как описано в примере 11.

ФИГУРА 35G графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием IL-10 в популяциях не-T-клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0, или 3,0 мкМ), репрезентативные для которых показаны на ФИГУРЕ 35А, как описано в примере 11.

ФИГУРА 35H графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием IFN- γ в популяции CD4⁺ Т-клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0, или 3,0 мкМ), репрезентативные для которых показаны на ФИГУРЕ 35А, как описано в примере 11.

ФИГУРА 35I графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием IFN- γ в популяции CD8⁺ Т-клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0, или 3,0 мкМ), репрезентативные для которых показаны на ФИГУРЕ 35А, как описано в примере 11.

ФИГУРА 35J графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием IFN- γ в популяциях не-T-клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0, или 3,0 мкМ), репрезентативные для которых показаны на ФИГУРЕ 35А, как описано в примере 11.

ФИГУРА 35K графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием TNF- α в популяции CD4⁺ Т-клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0, или 10 мкМ), репрезентативные для которых показаны на ФИГУРЕ 35А, как описано в примере 11.

ФИГУРА 35L графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием TNF- α в популяции CD8⁺ Т-клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 или 10 мкМ), репрезентативные для которых показаны на ФИГУРЕ 35А, как описано в примере 11.

ФИГУРА 35M графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием TNF- α в популяциях не-T-клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0, или 10 мкМ), репрезентативные для которых показаны

на ФИГУРЕ 35А, как описано в примере 11.

На ФИГУРЕ 36А показан дополнительный анализ популяции не-Т-клеток из ФИГУРЫ 35А, сортированной на популяции $CD56^+CD16^-$ (2,27%), $CD56^+CD16^+$ (11,8%) и не-НК (78,5%), присутствующих в популяции не-Т-клеток в репрезентативной культуре РВМС через 2 суток после стимуляции антителом против CD3 и антителом против CD28, как описано в примере 11.

ФИГУРА 36В графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием IFN- γ в популяциях не-Т- $CD56^+CD16^+$ клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0 или 3,0 мкМ), репрезентативные для которых показаны на ФИГУРЕ 36А, как описано в примере 11.

ФИГУРА 36С графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием IFN- γ в популяциях не-Т- $CD56^+CD16^-$ клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0 или 3,0 мкМ), репрезентативные для которых показаны на ФИГУРЕ 36А, как описано в примере 11.

ФИГУРА 36D графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием TNF- α в популяциях не-Т- $CD56^+CD16^+$ клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 или 10 мкМ), репрезентативные для которых показаны на ФИГУРЕ 36А, как описано в примере 11.

ФИГУРА 36Е графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием TNF- α в популяциях не-Т- $CD56^+CD16^-$ клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 или 10 мкМ), репрезентативные для которых показаны на ФИГУРЕ 36А, как описано в примере 11.

ФИГУРА 37 графически иллюстрирует количество окрашенных декстрамером клеток (антигенспецифических Т-клеток) как процент от тотальных $CD8^+$ клеток в культурах спленоцитов, полученных от мышей WT и GPR174 KO через три недели после иммунизации с использованием 1000 ГАЕ вируса гриппа A/PR/8/34, и культивированных в течение 5 суток в присутствии антигенного пептида NP, где спленоциты, полученные от наивных мышей WT, включены в качестве контроля, как описано в примере 12.

ФИГУРА 38 графически иллюстрирует количество окрашенных декстрамером клеток (антигенспецифических Т-клеток) как процент от тотальных $CD8^+$ клеток в культурах спленоцитов, полученных от мышей WT и GPR174 KO, иммунизированных и бустер-иммунизированных через три недели с использованием 1000 ГАЕ (гемагглютинирующих единиц) вируса гриппа A/PR/8/34, где спленоциты анализировали через 11 суток после бустера, и где спленоциты, полученные от наивных мышей WT, включены в качестве контроля, как описано в примере 12.

ФИГУРА 39А графически иллюстрирует долю наивных регуляторных Т-клеток (T-reg) с положительным по CTLA-4 окрашиванием (процент от наивных Т-рег клеток ($CD45RA^+FOXP3^+$) в культурах РВМС, обработанных ингибирующим GPR174 соединением 10 (0, 0,19, 0,38, 0,75, 1,5, 3,0 или 6,0 мкМ) или эквивалентными количествами

контрольного носителя (DMSO), через одни сутки после стимуляции, как описано в примере 13;

ФИГУРА 39В графически иллюстрирует долю не регуляторных Т-клеток (не-Т-рег) с положительным по CTLA-4 окрашиванием (процент от наивных не-Т-рег клеток (CD45RA+FOXP3-) в культурах PBMC, обработанных ингибирующим GPR174 соединением 10 (0, 0,19, 0,38, 0,75, 1,5, 3,0 или 6,0 мкМ) или эквивалентными количествами контрольного носителя (DMSO), через одни сутки после стимуляции, как описано в примере 13;

ФИГУРА 40А графически иллюстрирует долю Т-рег памяти с положительным по CTLA-4 окрашиванием (процент от Т-рег памяти (CD45RA-FOXP3+) в культурах PBMC, обработанных ингибирующим GPR174 соединением 10 (0, 0,19, 0,38, 0,75, 1,5, 3,0 или 6,0 мкМ) или эквивалентными количествами контрольного носителя (DMSO), через одни сутки после стимуляции, как описано в примере 13;

ФИГУРА 40В графически иллюстрирует долю не-Т-рег клеток памяти с положительным по CTLA-4 окрашиванием (процент от не-Т-рег памяти (CD45RA-FOXP3-) в культурах PBMC, обработанных ингибирующим GPR174 соединением 10 (0, 0,19, 0,38, 0,75, 1,5, 3,0 или 6,0 мкМ) или эквивалентными количествами контрольного носителя (DMSO), через одни сутки после стимуляции, как описано в примере 13;

ФИГУРА 41 графически иллюстрирует долю CD4+ Т-клеток человека с положительным по PD-L1 окрашиванием в культурах PBMC, обработанных ингибирующим GPR174 соединением 10 (0, 1,25 или 5 мкМ), через одни сутки после стимуляции, показывающую, что экспрессия PD-L1 уменьшена в CD4+ Т-клетках, обработанных соединением 10, зависимым от дозы образом, по сравнению с обработанными контрольным носителем клетками, как описано в примере 14;

ФИГУРА 42 графически иллюстрирует долю CD8+ Т-клеток человека с положительным по TGIT окрашиванием в культурах PBMC, обработанных ингибирующим GPR174 соединением 10 (0, 1,25 или 5 мкМ) через одни сутки после стимуляции, показывающую, что экспрессия TGIT уменьшена в CD8+ Т-клетке, обработанной соединением 10, зависимым от дозы образом, по сравнению с обработанными контрольным носителем клетками, как описано в примере 14; и

ФИГУРА 43 графически иллюстрирует долю CD4+ Т-клеток человека с положительным по AREG окрашиванием в культурах PBMC, обработанных ингибирующим GPR174 соединением 10 (0, 1,25 или 5 мкМ) через одни сутки после стимуляции, показывающую, что экспрессия AREG уменьшена в CD4+ Т-клетках, обработанных соединением 10, зависимым от дозы образом, по сравнению с обработанными контрольным носителем клетками, как описано в примере 14;

ФИГУРА 44 графически иллюстрирует количество IFN- γ в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции в культурах PBMC от одного донора, культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (3 мкМ);

ингибирующего A2aR соединения (ZM241385, 1 мкМ или 10 мкМ); комбинации соединения 10 (3 мкМ) плюс 1 мкМ ZM241385; комбинации соединения 10 (3 мкМ) плюс 10 мкМ ZM241385; или контрольного носителя (DMSO), показывающее, что комбинированное ингибирование GPR174 и A2aR приводит к синергической индукции продукции IFN- γ , как описано в примере 15.

ФИГУРА 45А графически иллюстрирует кратность индукции активности передачи сигналов Gs в клетках НЕК293, трансфицированных экспрессирующей GPR174 дикого типа плазмидой и экспрессирующей биосенсор сАМР плазмидой pGlo22F, в присутствии увеличивающихся концентраций липосом из фосфатидилсерина (PS) или лизофосфатидилсерина (Lyso-PS), как описано в примере 16.

ФИГУРА 45В графически иллюстрирует кратность индукции активности передачи сигналов Gs в клетках НЕК293, трансфицированных экспрессирующей мутант GPR174-v38 плазмидой и экспрессирующей биосенсор сАМР плазмидой pGlo22F, в присутствии увеличивающихся концентраций липосом из фосфатидилсерина (PS) или лизофосфатидилсерина (Lyso-PS), как описано в примере 16.

ФИГУРА 46 графически иллюстрирует уровень активности передачи через GPR174 сигналов Gs в клетках НЕК293, трансфицированных экспрессирующей GPR174 плазмидой и экспрессирующей биосенсор сАМР плазмидой pGlo22F (показанный как соотношение люминесценции после добавления фосфолипида к предварительно считанному значению люминесценции) в присутствии липосом из PS, фосфатидилхолина (PC), фосфатидилэтаноламина (PE) и фосфатидилинозитола (PI), как описано в примере 16.

ФИГУРА 47А графически иллюстрирует ингибирование индуцированной PS передачи через GPR174 сигналов Gs посредством ингибирующего GPR174 соединения 10 (группа I) зависимым от дозы образом, с кажущейся IC₅₀ приблизительно 20-40 нМ, как описано в примере 16.

ФИГУРА 47В графически иллюстрирует ингибирование индуцированной PS передачи через GPR174 сигналов Gs посредством ингибирующего GPR174 соединения 6 (группа I) зависимым от дозы образом, с кажущейся IC₅₀ приблизительно 0,1 мкМ, как описано в примере 16.

ФИГУРА 47С графически иллюстрирует ингибирование индуцированной PS передачи через GPR174 сигналов Gs посредством ингибирующего GPR174 соединения 11 (группа I), зависимым от дозы образом, с кажущейся IC₅₀ приблизительно 0,1 мкМ, как описано в примере 16.

ФИГУРА 47D графически иллюстрирует ингибирование индуцированной PS передачи через GPR174 сигналов Gs посредством ингибирующего GPR174 соединения 20 (группа II), зависимым от дозы образом, с кажущейся IC₅₀ приблизительно 3,0 мкМ, как описано в примере 16.

ФИГУРА 47Е графически иллюстрирует ингибирование индуцированной PS передачи через GPR174 сигналов Gs посредством ингибирующего GPR174 соединения 30

(группа IV), зависимым от дозы образом, с кажущейся IC_{50} приблизительно 1,3 мкМ, как описано в примере 16.

ФИГУРА 47F графически иллюстрирует ингибирование индуцированной PS передачи через GPR174 сигналов Gs посредством ингибирующего GPR174 соединения 23 (группа IV), зависимым от дозы образом, с кажущейся IC_{50} приблизительно 0,15 мкМ, как описано в примере 16.

ФИГУРА 48A графически иллюстрирует соотношение люминесценции после добавления к предварительно считанной люминесценции для экспрессирующих GPR174 и GloSensor клеток НЕК293, подвергнутых воздействию культуральной среды, или необработанных (неапоптотических) клеток K562, или апоптотических клеток K562 (обработанных H_2O_2 в течение 20 часов), как описано в примере 17.

ФИГУРА 48B графически иллюстрирует соотношение люминесценции после добавления к предварительно считанной люминесценции для экспрессирующих GPR174 и GloSensor клеток НЕК293, подвергнутых воздействию культуральной среды, или свежeweделенных нейтрофилов, или апоптотических нейтрофилов (обработанных антитела против Fas), как описано в примере 17.

ФИГУРА 48C графически иллюстрирует соотношение люминесценции после добавления к предварительно считанной люминесценции для экспрессирующих GPR174 и GloSensor клеток НЕК293, подвергнутых воздействию культурального супернатанта (суп.) или тромбоцитов (Pl), как описано в примере 17.

ФИГУРА 49A графически иллюстрирует количество IFN- γ (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции в культурах PBMC от одного донора (донора 1), культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (2 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (SCH-58261, 0,2 мкМ, 0,6 мкМ или 2 мкМ); комбинации соединения 10 (2 мкМ) плюс 0,2 мкМ SCH-58261; комбинации соединения 10 (2 мкМ) плюс 0,6 мкМ SCH-58261 или комбинации соединения 10 (2 мкМ) плюс 2 мкМ SCH-58261; или контрольного носителя (DMSO), как описано в примере 18.

ФИГУРА 49B графически иллюстрирует количество IL-2 (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции в культурах PBMC от одного донора (донора 1), культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (2 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (SCH-58261, 0,2 мкМ, 0,6 мкМ или 2 мкМ); комбинации соединения 10 (2 мкМ) плюс 0,2 мкМ SCH-58261; комбинации соединения 10 (2 мкМ) плюс 0,6 мкМ SCH-58261 или комбинации соединения 10 (2 мкМ) плюс 2 мкМ SCH-58261; или контрольного носителя (DMSO), как описано в примере 18.

ФИГУРА 49C графически иллюстрирует количество TNF (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции в культурах PBMC от одного донора (донора 1), культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (2 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (SCH-58261, 0,2 мкМ, 0,6 мкМ или 2 мкМ); комбинации соединения 10 (2 мкМ) плюс 0,2 мкМ SCH-58261; комбинации соединения 10 (2 мкМ) плюс

0,6 мкМ SCH-58261 или комбинации соединения 10 (2 мкМ) плюс 2 мкМ SCH-58261; или контрольного носителя (DMSO), как описано в примере 18.

ФИГУРА 50А графически иллюстрирует количество IFN- γ (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции в культурах PBMC от одного донора (донора 2), культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (ZM, 0,2 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (PBF-509 0,1 мкМ), комбинации соединения 10 (1 мкМ) плюс 0,2 мкМ ZM; комбинации соединения 10 (1 мкМ) плюс 0,1 мкМ PBF-509; или контрольного носителя (DMSO), как описано в примере 18.

ФИГУРА 50В графически иллюстрирует количество IL-2 (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции в культурах PBMC от одного донора (донора 2), культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (ZM, 0,2 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (PBF-509 0,1 мкМ), комбинации соединения 10 (1 мкМ) плюс 0,2 мкМ ZM; комбинации соединения 10 (1 мкМ) плюс 0,1 мкМ PBF-509; или контрольного носителя (DMSO), как описано в примере 18.

ФИГУРА 50С графически иллюстрирует количество TNF (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции в культурах PBMC от одного донора (донора 2), культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (ZM, 0,2 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (PBF-509 0,1 мкМ), комбинации соединения 10 (1 мкМ) плюс 0,2 мкМ ZM; комбинации соединения 10 (1 мкМ) плюс 0,1 мкМ PBF-509; или контрольного носителя (DMSO), как описано в примере 18.

ФИГУРА 51А графически иллюстрирует количество IFN- γ (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции в культурах PBMC от одного донора (донора 3), культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (ZM, 0,2 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (PBF-509 0,2 мкМ), комбинации соединения 10 (1 мкМ) плюс 0,2 мкМ ZM; комбинации соединения 10 (1 мкМ) плюс 0,2 мкМ PBF-509; или контрольного носителя (DMSO), как описано в примере 18.

ФИГУРА 51В графически иллюстрирует количество IL-2 (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции в культурах PBMC от одного донора (донора 3), культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (ZM, 0,2 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (PBF-509 0,2 мкМ), комбинации соединения 10 (1 мкМ) плюс 0,2 мкМ ZM; комбинации соединения 10 (1 мкМ) плюс 0,2 мкМ PBF-509; или контрольного носителя (DMSO), как описано в примере 18.

ФИГУРА 51С графически иллюстрирует количество TNF (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции в культурах PBMC от одного донора (донора

3), культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (ZM, 0,2 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (PBF-509 0,2 мкМ), комбинации соединения 10 (1 мкМ) плюс 0,2 мкМ ZM; комбинации соединения 10 (1 мкМ) плюс 0,2 мкМ PBF-509; или контрольного носителя (DMSO), как описано в примере 18.

ФИГУРА 52А графически иллюстрирует кратность изменения, по сравнению с носителем, количества IFN- γ в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции в культурах PBMC от 12 доноров, культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1-2 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (ZM, 0,2-1 мкМ); комбинации соединения 10 (1-2 мкМ) плюс 0,2-1 мкМ ZM; или контрольного носителя (DMSO), как описано в примере 19.

ФИГУРА 52В графически иллюстрирует кратность изменения, по сравнению с носителем, количества IL-2 в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции в культурах PBMC от 12 доноров, культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1-2 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (ZM, 0,2-1 мкМ); комбинации соединения 10 (1-2 мкМ) плюс 0,2-1 мкМ ZM; или контрольного носителя (DMSO), как описано в примере 19.

ФИГУРА 52С графически иллюстрирует кратность изменения, по сравнению с носителем, количества TNF в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции в культурах PBMC от 12 доноров, культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1-2 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (ZM, 0,2-1 мкМ); комбинации соединения 10 (1-2 мкМ) плюс 0,2-1 мкМ ZM; или контрольного носителя (DMSO), как описано в примере 19.

ФИГУРА 52D графически иллюстрирует кратность изменения, по сравнению с носителем, количества GM-CSF в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции в культурах PBMC от 12 доноров, культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1-2 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (ZM, 0,2-1 мкМ); комбинации соединения 10 (1-2 мкМ) плюс 0,2-1 мкМ ZM; или контрольного носителя (DMSO), как описано в примере 19.

ФИГУРА 53А графически иллюстрирует количество IFN- γ (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции культур PBMC человека от одного донора (донора 3), культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ); ZM, 0,1 мкМ); PBF (0,1 мкМ), SCH (0,2 мкМ), MRS (1 мкМ), аденозиндезаминазы (ADA, 0,75 мкг/мл), отдельно или в комбинации с соединением 10, или контрольного носителя, как описано в примере 20.

ФИГУРА 53В графически иллюстрирует количество IL-2 (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции культур PBMC человека от одного донора (донора 3), культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ); ZM, 0,1 мкМ); PBF (0,1 мкМ), SCH (0,2 мкМ), MRS (1 мкМ), аденозиндезаминазы

(ADA, 0,75 мкг/мл), отдельно или в комбинации с соединением 10, или контрольного носителя, как описано в примере 20.

ФИГУРА 53С графически иллюстрирует количество TNF (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции культур PBMC человека от одного донора (донора 3), культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ); ZM, 0,1 мкМ); PBF (0,1 мкМ), SCH (0,2 мкМ), MRS (1 мкМ), аденозиндезаминазы (ADA, 0,75 мкг/мл), отдельно или в комбинации с соединением 10, или контрольного носителя, как описано в примере 20.

ФИГУРА 54А графически иллюстрирует количество IFN- γ (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции культур PBMC человека от одного донора (донора 6), культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ); ZM, 0,1 мкМ); PBF (0,1 мкМ), SCH (0,2 мкМ), MRS (1 мкМ), аденозиндезаминазы (ADA, 0,75 мкг/мл), отдельно или в комбинации с соединением 10, или контрольного носителя, как описано в примере 20.

ФИГУРА 54В графически иллюстрирует количество IL-2 (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции культур PBMC человека от одного донора (донора 6), культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ); ZM, 0,1 мкМ); PBF (0,1 мкМ), SCH (0,2 мкМ), MRS (1 мкМ), аденозиндезаминазы (ADA, 0,75 мкг/мл), отдельно или в комбинации с соединением 10, или контрольного носителя, как описано в примере 20.

ФИГУРА 54С графически иллюстрирует количество TNF (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции культур PBMC человека от одного донора (донора 6), культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ); ZM, 0,1 мкМ); PBF (0,1 мкМ), SCH (0,2 мкМ), MRS (1 мкМ), аденозиндезаминазы (ADA, 0,75 мкг/мл), отдельно или в комбинации с соединением 10, или контрольного носителя, как описано в примере 20.

ФИГУРА 55А графически иллюстрирует количество IFN- γ (пг/мл) в супернатантах через 24 часа после стимуляции PBMC человека (донор 7) в присутствии ингибирующих GPR174 соединений 6, 10, 11 или 20, каждого в присутствии или в отсутствие ZM, как описано в примере 21.

ФИГУРА 55В графически иллюстрирует количество IL-2 (пг/мл) в супернатантах через 24 часа после стимуляции PBMC человека (донор 7) в присутствии ингибирующих GPR174 соединений 6, 10, 11 или 20, каждого в присутствии или в отсутствие ZM, как описано в примере 21.

ФИГУРА 55С графически иллюстрирует количество TNF (пг/мл) в супернатантах через 24 часа после стимуляции PBMC человека (донор 7) в присутствии ингибирующих GPR174 соединений 6, 10, 11 или 20, каждого в присутствии или в отсутствие ZM, как описано в примере 21.

ФИГУРА 55D графически иллюстрирует количество GM-CSF (пг/мл) в

супернатантах через 24 часа после стимуляции PBMC человека (донор 7) в присутствии ингибирующих GPR174 соединений 6, 10, 11 или 20, каждого в присутствии или в отсутствие ZM, как описано в примере 21.

ФИГУРА 56А графически иллюстрирует кратность изменения, по сравнению с носителем, количества IFN- γ в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции в культурах PBMC человека от 5 доноров, культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (ZM, 0,2 мкМ); ингибирующего A2bR соединения MRS (2 мкМ) или комбинации соединения 10 (1 мкМ) плюс 0,2 мкМ ZM плюс 2 мкМ MRS, или контрольного носителя (DMSO), как описано в примере 22.

ФИГУРА 56В графически иллюстрирует кратность изменения, по сравнению с носителем, количества IL-2 в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции в культурах PBMC человека от 5 доноров, культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (ZM, 0,2 мкМ); ингибирующего A2bR соединения MRS (2 мкМ) или комбинации соединения 10 (1 мкМ) плюс 0,2 мкМ ZM плюс 2 мкМ MRS, или контрольного носителя (DMSO), как описано в примере 22.

ФИГУРА 56С графически иллюстрирует кратность изменения, по сравнению с носителем, количества TNF в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции в культурах PBMC человека от 5 доноров, культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (ZM, 0,2 мкМ); ингибирующего A2bR соединения MRS (2 мкМ) или комбинации соединения 10 (1 мкМ) плюс 0,2 мкМ ZM плюс 2 мкМ MRS, или контрольного носителя (DMSO), как описано в примере 22.

ФИГУРА 57 графически иллюстрирует кратность уменьшения количества AREG⁺ клеток в присутствии носителя; ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ); ZM-241385 (0,2 мкМ); или комбинации соединения 10 (1 мкМ) и ZM (0,2 мкМ), как описано в примере 23.

ФИГУРА 58 представляет собой схематическую диаграмму, иллюстрирующую, каким образом как GPR174, так и рецепторы аденозина отвечают на продукты стресса и гибели клеток, как описано в примере 23.

ФИГУРА 59А графически иллюстрирует рост опухолей CT26 у индивидуальных мышей дикого типа (WT), подвергнутых инокуляции клеток мышечной карциномы ободочной кишки CT26.cl25 на сутки 0 и обработке антителом против GITR на сутки 7 и 9, как описано в примере 24;

ФИГУРА 59В графически иллюстрирует рост опухолей CT26 у индивидуальных мышей GPR174-КО, подвергнутых инокуляции клеток мышечной карциномы ободочной кишки CT26.cl25 на сутки 0 и обработке антителом против GITR на сутки 7 и 9; как описано в примере 24;

ФИГУРА 60 графически иллюстрирует процент выживаемости несущих опухоль мышей WT и GPR174-КО, подвергнутых инокуляции клеток мышинной карциномы ободочной кишки CT26.cl25 на сутки 0 и обработке антителом против GITR на сутки 7 и 9, показывающий, что мыши GPR174-КО имели более высокий процент выживаемости (т.е., были подвергнуты эвтаназии значимо позже), чем мыши WT ($p=0,03$, логарифмический ранговый критерий), как описано в примере 24;

ФИГУРА 61А графически иллюстрирует рост опухолей CT26 у индивидуальных мышей WT, подвергнутых инокуляции клеток мышинной карциномы ободочной кишки CT26.cl25 на сутки 0 и обработке антителом против GITR на сутки 7, 9 и 14, как описано в примере 24;

ФИГУРА 61В графически иллюстрирует рост опухолей у индивидуальных мышей GPR174-КО, подвергнутых инокуляции клеток мышинной карциномы ободочной кишки CT26.cl25 на сутки 0 и обработке антителом против GITR на сутки 7, 9 и 14; как описано в примере 24;

ФИГУРА 62 графически иллюстрирует процент выживаемости несущих опухоль мышей WT и GPR174-КО, подвергнутых инокуляции клеток мышинной карциномы ободочной кишки CT26.cl25 на сутки 0 и обработке антителом против GITR на сутки 7, 9 и 14, показывающий, что мыши GPR174-КО имели более высокий процент выживаемости (т.е., были подвергнуты эвтаназии значимо позже), чем мыши WT, как описано в примере 24;

ФИГУРА 63А графически иллюстрирует рост опухолей меланомы B16F10-Kb у индивидуальных мышей WT, подвергнутых инокуляции клеток B16F10-Kb на сутки 0 и обработке антителом против GITR на сутки 4 и 14, как описано в примере 25;

ФИГУРА 63В графически иллюстрирует рост опухолей меланомы B16F10-Kb у индивидуальных мышей GPR174-КО, подвергнутых инокуляции клеток B16F10-Kb на сутки 0 и обработке антителом против GITR на сутки 4 и 14, как описано в примере 25;

ФИГУРА 63С графически иллюстрирует средний объем опухоли для опухолей меланомы B16F10-Kb у мышей WT и GPR174-КО, подвергнутых инокуляции клеток B16F10-Kb на сутки 0 и обработке антителом против GITR на сутки 4 и 14, показывающий, что средние размеры опухолей были значимо меньше у мышей GPR174 КО на сутки 14 (где «*» обозначает $p=0,01$) и 16 (где «***» обозначает: $p=0,00005$), как описано в примере 25;

ФИГУРА 64 графически иллюстрирует процент выживаемости несущих опухоль меланому B16F10-Kb мышей WT и GPR174-КО, подвергнутых инокуляции клеток B16F10-Vb на сутки 0 и обработке антителом против GITR на сутки 4 и 14, показывающий, что мыши GPR174-КО имели более высокий процент выживаемости (т.е., были подвергнуты эвтаназии значимо позже) чем мыши WT ($p=0,006$, логарифмический ранговый критерий), как описано в примере 25;

ФИГУРА 65 графически иллюстрирует концентрации IL-2 в культурах стимулированных Т-клеток человека в присутствии или в отсутствие PS-липосом (PSL) или

ингибитора GPR174 (соединения 10, 3 мкМ), как описано в примере 26;

ФИГУРА 66А графически иллюстрирует концентрацию IL-2 в культурах стимулированных Т-клеток человека в присутствии или в отсутствие PS-липосом, экзосом опухолей или ингибирующего GPR174 соединения (соединения 10, 0,5 мкМ), как описано в примере 26;

ФИГУРА 66В графически иллюстрирует концентрацию IFN- γ в культурах стимулированных Т-клеток человека в присутствии или в отсутствие PS-липосом, экзосом опухолей или ингибирующего GPR174 соединения (соединения 10, 0,5 мкМ), как описано в примере 26;

ФИГУРА 66С графически иллюстрирует концентрацию TNF в культурах стимулированных Т-клеток человека в присутствии или в отсутствие PS-липосом, экзосом опухолей или ингибирующего GPR174 соединения (соединения 10, 0,5 мкМ), как описано в примере 26;

ФИГУРА 67 графически иллюстрирует уровни IL-2 (кратность изменения по сравнению с носителем) в культурах стимулированных Т-клеток мыши WT или GPR174-КО в присутствии или в отсутствие PS-липосом (PSL) или ингибитора GPR174 (соединения 10, 1 мкМ), как описано в примере 26;

ФИГУРА 68А графически иллюстрирует эффекты антагониста рецептора аденозина A2a/A2b ZM-241385 (0,1 мкМ), ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ) или обоих соединений (ZN-241385 плюс соединение 10) на уровни IL-2 в супернатантах культивированных спленоцитов, выделенных от n=3 мышей WT после 2 суток стимуляции антителом против CD3 и антителом против CD28, как описано в примере 27;

ФИГУРА 68В графически иллюстрирует эффекты антагониста рецептора аденозина A2a/A2b ZM-241385 (0,1 мкМ), ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ), или обоих соединений (ZN-241385 плюс соединение 10) на уровни IL-2 в супернатантах культивированных спленоцитов, выделенных от мышей n=3 GPR174-КО после 2 суток стимуляции антителом против CD3 и антителом против CD28, как описано в примере 27;

ФИГУРА 69 графически иллюстрирует эффекты антагониста рецептора аденозина A2a/A2b ZM-241385 (0,2 мкМ), ингибирующего GPR174 соединения 10 (0,3 мкМ) или ингибирующего GPR174 соединения 6 (0,3 мкМ), или ZM-241385 плюс соединение 10 или ZM-241385 плюс соединение 6 на уровни IL-2 в супернатантах культивированных спленоцитов, выделенных от 3 мышей WT после 2 суток стимуляции антителом против CD3 и антителом против CD28 в присутствии агониста рецептора аденозина NECA (0,1 мкМ), как описано в примере 27;

ФИГУРА 70А графически иллюстрирует эффекты антагониста рецептора аденозина A2a/A2b ZM-241385 (0,2 мкМ), ингибирующего GPR174 соединения 10 (0,3 мкМ) или соединения 6 (0,3 мкМ), или ZM-241385 отдельно или в комбинации с любым ингибирующим GPR174 соединением on уровни IL-2 в супернатантах культивированных спленоцитов, выделенных от 3 мышей WT после 2 суток стимуляции антителом против

CD3 и антителом против CD28 в присутствии агониста рецептора аденозина NECA (0,1 мкМ), как описано в примере 27;

ФИГУРА 70В графически иллюстрирует эффекты антагониста рецептора аденозина A2a/A2b ZM-241385 (0,2 мкМ), ингибирующего GPR174 соединения 10 (0,3 мкМ) или соединения 6 (0,3 мкМ), или ZM-241385 отдельно или в комбинации с любым ингибирующим GPR174 соединением on уровне IL-2 в супернатантах культивированных спленоцитов, выделенных от 3 мышей GPR174-КО после 2 суток стимуляции антителом против CD3 и антителом против CD28 в присутствии агониста рецептора аденозина NECA (0,1 мкМ), как описано в примере 27;

ФИГУРА 71 графически иллюстрирует уровни IL-2 в супернатантах PBMC человека, стимулированных антителом против CD3 и антителом против CD28 в присутствии или в отсутствие ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ); ингибирующего A2aR/A2bR соединения ZM-241385 (0,1 мкМ), или ингибирующего CD73 соединение APCP (10 мкМ), собранных через 24 часа после стимуляции, как описано в примере 28;

ФИГУРА 72А графически иллюстрирует концентрацию IL-2 в очищенных Т-клетках человека, стимулированных активатором CD3/CD28 в присутствии PS-липосомы (PS, 1 мкМ), агониста рецептора аденозина NECA (0,1 мкМ) или комбинации PS (1 мкМ) плюс NECA (0,1 мкМ), по сравнению только со средами, как описано в примере 29;

ФИГУРА 72В графически иллюстрирует концентрацию IFN- γ (ФИГ. 72В) в очищенных Т-клетках человека, стимулированных активатором CD3/CD28 в присутствии PS-липосомы (PS, 1 мкМ), агониста рецептора аденозина NECA (0,1 мкМ) или комбинации PS (1 мкМ) плюс NECA (0,1 мкМ), по сравнению только со средами, как описано в примере 29; и

ФИГУРА 72С графически иллюстрирует концентрацию IFN- γ (ФИГ. 72С) в очищенных Т-клетках человека, стимулированных активатором CD3/CD28 в присутствии PS-липосомы (PS, 1 мкМ), агониста рецептора аденозина NECA (0,05 мкМ) или комбинации PS (1 мкМ) плюс NECA (0,05 мкМ), по сравнению только со средами, как описано в примере 29.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Как подробно описано ниже, авторы настоящего изобретения идентифицировали соединения, которые функционально взаимодействуют с GPR174 и являются способными ингибировать один или несколько опосредованных GPR174 путей передачи сигналов. Авторы настоящего изобретения далее охарактеризовали пути передачи сигналов, активированные посредством GPR174, и определили профиль передачи сигналов для этого рецептора, который включает путь передачи сигналов Gs. Авторы настоящего изобретения, кроме того, определили, что комбинированное ингибирование GPR174 и ингибирование рецептора аденозина 2a (A2aR) и/или рецептора аденозина 2b (A2bR), или комбинация ингибирования GPR174 и ингибитора гидролиза АТФ до аденозина посредством CD38,

CD39 и CD73 (такого как ингибитор CD73 и/или ингибитор CD38, и/или ингибитор CD39) и/или ослабляющего T-рег средства приводит к синергической индукции продукции IFN- γ , IL-2, TNF и GM-CSF в PBMC человека. Авторы настоящего изобретения, кроме того, обнаружили, что фосфатидилсерин (PS) является агонистом опосредованной GPR174 передачи сигналов Gs, и показали, что передача сигналов PS посредством GPR174 ингибируется посредством множества ингибирующих GPR174 низкомолекулярных соединений с разнообразными химическими структурами. Как далее показано в настоящем описании, недостаточность GPR174 усиливает противоопухолевые иммунные ответы у мышей.

На основании этих обнаружений, настоящее изобретение относится к способам *in vivo* и *in vitro* ингибирования опосредованных GPR174 путей передачи сигналов, либо отдельно, либо в комбинации с ингибированием опосредованной ATP-аденозин-A2aR и/или A2bR передачи сигналов (например, антагонистом A2aR и/или антагонистом A2bR), или комбинации ингибитора опосредованной GPR174 передачи сигналов и ингибитора гидролиза ATP до аденозина посредством CD38, CD39 и CD73 (например, ингибитора CD73 или ингибитора CD38, или ингибитора CD39) и/или ослабляющего T-рег средства, и таким образом, стимуляции иммунного ответа у субъекта-млекопитающего, в частности, у субъектов, страдающих такими состояниями, как злокачественная опухоль, как описано в настоящем описании.

Определения

Термин «сопряженный с G-белком рецептор» или «GPCR», или «GPR» относится к трансмембранному рецептору, способному передавать сигнал от среды снаружи клетки к внутренней части клетки посредством пути G-белка и/или пути аррестина. Сотни таких рецепторов известны в данной области; см., например, Fredriksson et al., *Mol. Pharmacol.* 63:1256-1272, 2003, и Vassilatis, D.K., *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 4903-4908 (2003), содержание каждого из которых, таким образом, приведено в качестве ссылки. В этих ссылках охарактеризованы GPCR человека и мыши, на основании гомологии последовательности и функции. GPCR человека можно разбить на пять классов: секретиновые, родопсиновые, глутаматные, frizzled/Tas2 и молекулы адгезии. Альтернативно, рецепторы можно классифицировать по их лигандам, например, пептидным гормонам или малым молекулам (например, биогенным аминам). Другие схемы классификации включают классификацию A-F, где класс А представляет рецепторы, родственные родопсину и адренергическим рецепторам, класс В, рецепторы, родственные кальцитонину и рецепторам паратиреоидного гормона, класс С, рецепторы, родственные метаботропным рецепторам, и классы D-F представляют рецепторы, обнаруженные в грибах и архебактериях.

Термины «сопряженный с G-белком рецептор 174», «GPR174», «FKSG79» или «GPCR17» относятся к любым природным формам белка GPR174, например, SEQ ID NO:1, показанной на фигуре 1, или их природным вариантам, таким как варианты, имеющие по

меньшей мере 90% идентичность (например, по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность) с SEQ ID NO:1. Предпочтительные формы GPR174 имеют способность передавать сигналы посредством по меньшей мере одного пути сопряженного с G-белком рецептора, такого как Gs.

Термин «G-белок» относится к гетеротримерному белковому комплексу, который передает сигнал от активированного GPCR к эффекторной молекуле(молекулам) внутри клетки, таким как ферменты и ионные каналы. G-белки состоят из субъединиц $G\alpha$, $G\beta$ и $G\gamma$. Семейства субъединиц $G\alpha$ включают Gq, Gi, Gs и $G\alpha_{12/13}$. Пути передачи сигналов G-белка названы по активированной субъединице $G\alpha$, т.е., Gas, $G\alpha_i$, $G\alpha_q$ и $G\alpha_{12/13}$. Гетеротримерный G-белок связывает активированный белок GPCR, то есть, белок GPCR, связанный с лигандом или суррогатным лигандом. При связывании с белком GPCR, субъединица $G\alpha$ заменяет гуанозиндифосфатом (GDP) гуанозин-5'-трифосфат (GTP) и диссоциирует от субъединиц $G\beta$ и $G\gamma$, которые, как правило, ассоциируют в гетеродимерный комплекс. После диссоциации, как связанный с $G\alpha$ -GTP белок, так и комплекс $G\beta\gamma$ могут активировать путь передачи сигналов. Семейство Gq включает $G\alpha_q$, $G\alpha_{11}$, $G\alpha_{14}$ и $G\alpha_{15/16}$. Семейство Gi включает $G\alpha_{i1-3}$, $G\alpha_o$, $G\alpha_t$, $G\alpha_{ust}$ и $G\alpha_z$. Семейство Gs включает $G\alpha_s$ и $G\alpha_{olf}$. $G_{12/13}$ включает $G\alpha_{12}$ и $G\alpha_{13}$.

Термин «путь передачи сигналов» относится к внутриклеточному ответу на сигнал. Для целей этого описания, путь передачи сигналов G-белка относится к внутриклеточному ответу, который возникает после связывания лиганда, суррогатного лиганда, или любого другого функционального активатора или функционального инактиватора с сопряженным с G-белком рецептором, например, GPR174, и активирует сопряженный с G-белком путь. Пути передачи сигналов G-белка включают пути Gq, Gi, Gs, $G_{12/13}$ и $\beta\gamma$. Путь передачи сигналов аррестина относится к внутриклеточному ответу, который возникает после связывания лиганда, суррогатного лиганда, или любого другого функционального активатора или функционального инактиватора с сопряженным с G-белком рецептором, например, GPR174, и активации опосредованного аррестином пути передачи сигналов, такого как пути передачи сигналов аррестина 1, аррестина 2, аррестина 3 и аррестина 4.

«Путь передачи сигналов Gq» или «путь передачи сигналов $G\alpha_q$ » относится к внутриклеточному пути передачи сигналов, активируемому посредством активированного белка Gq альфа. Белок $G\alpha_q$ активируется посредством замены GTP на GDP после связывания с активированным белком GPCR. Активация пути передачи сигналов Gq, как правило, активирует β -изоформы фосфолипазы C (PLC β), которые гидролизуют фосфатидилинозитол для получения диацилглицерина (DAG) и инозитол-1,4,5-трифосфата (IP $_3$). IP $_3$ является растворимым и диффундирует через цитоплазму, и взаимодействует с рецепторами IP $_3$ на эндоплазматическом ретикулуме, вызывая высвобождение кальция и увеличение уровня внутриклеточного кальция. DAG остается связанным с внутренним листком плазматической мембраны из-за его гидрофобного характера, где он привлекает протеинкиназу C (PKC), которая становится активированной

в сочетании со связыванием ионов кальция. PKC затем фосфорилирует другие белки для контроля их функции. Можно детектировать также нижестоящие эффекты, например, экспрессию репортерного гена, регулируемого подходящим фактором транскрипции.

«Путь передачи сигналов G_i » или «путь передачи сигналов G_{ai} » относится к внутриклеточному пути передачи сигналов, активируемому посредством активированного белка G_i альфа. Белок G_{ai} активируется после связывания с активированным белком GPCR. $G_{ai}1-3$, G_{ao} и G_{az} ингибируют активность аденилилциклазы (AC). Сенсорный белок G_i , G_{at} , активирует зависимую от циклического гуанозинмонофосфата (сGMP) фосфодиэстеразу, вызывая уменьшение уровня внутриклеточного сGMP, и G_{agust} активирует фосфолипазу C (PLC). Все члены семейства G_i , за исключением G_{az} , являются чувствительными к ингибированию токсином коклюша посредством рибозилирования аденозиндифосфатом (ADP) их субъединицы α (Siehler, *Biotechnology* 3:471-83, 2008).

«Путь передачи сигналов G_s » или «путь передачи сигналов G_{as} » относится к внутриклеточному пути передачи сигналов, активируемому посредством активированного белка G_s альфа. Белок G_{as} активируется после связывания с активированным белком GPCR. Семейство G_s белков G (G_{as} и G_{aolf}) активирует AC, которая образует вторичный мессенджер 3',5'-циклический аденозинмонофосфат (сAMP).

«Путь передачи сигналов $G_{12/13}$ » или «путь передачи сигналов $G_{a12/13}$ » относится к внутриклеточному пути передачи сигналов, активируемому посредством активированного белка $G_{12/13}$ альфа. Белок $G_{a12/13}$ активируется после связывания с белком GPCR. Семейство $G_{12/13}$ белков G (G_{a12} и G_{a13}) активирует белки Rho-фактора обмена гуанина (Rho-GEF). Белки Rho-GEF катализируют обмен GTP на GDP для активации RhoA. RhoA, в свою очередь, активирует Rho-киназу, что далее приводит к активации активирующего фактора транскрипции 2 (ATF2) и приводит к клеточным ответам (Liu et al., *Methods Mol. Biol.* 237:145-9, 2004).

«Путь передачи сигналов $\beta\gamma$ » относится к внутриклеточному пути, активируемому посредством свободного (т.е., несвязанного с белком $G\alpha$) комплекса $\beta\gamma$. Комплексы $\beta\gamma$ могут, например, активировать фосфолипазу A₂, управлять открытием сопряженных с G-белком калиевых каналов внутреннего выпрямления (GIRK) при связывании с мускариновыми рецепторами ацетилхолина, активируют кальциевые каналы L-типа, и инициируют путь фосфолипазы C посредством активации PLC.

«Путь передачи сигналов аррестина» относится к внутриклеточному пути передачи сигналов, активируемому посредством аррестина 1, аррестина 2, аррестина 3 или аррестина 4. Аррестины вовлечены в передачу сигналов посредством ERK, JNK, p38, Akt, PI3-киназы, и RhoA (DeWire et al., *Annu. Rev. Physiol.* 69:483-510, 2007).

Термин «приведение в контакт» используют в настоящем описании взаимозаменяемо со следующими: объединение с, добавление к, смешивание с, введение в, пропускание через, инкубация с, протекание над и т.д. Для целей ясности, фраза «приведение клетки в контакт» включает введение соединения млекопитающему

(например, перорально, в плазму или внутримышечно), таким образом, что соединение контактирует с клетками млекопитающего *in vivo*.

Под термином «опосредованный GPR174 путь передачи сигналов» понимают путь передачи сигналов, активность которого подвергается модуляции, по меньшей мере частично, посредством GPR174.

В рамках изобретения, фраза «модулирует по меньшей мере один опосредованный GPR174 путь передачи сигналов» относится к модуляции (активации или ингибированию) по меньшей мере пути передачи сигналов Gs, который является функциональным в клетке, экспрессирующей GPR174, посредством приведения клетки в контакт с соединением, которое функционально взаимодействует с GPR174.

«Модулятор» представляет собой соединение, которое функционально взаимодействует с GPCR и влияет на опосредованную активность GPCR передачи сигналов либо самостоятельно, либо посредством изменения способности другого соединения влиять на опосредованную активность GPCR передачи сигналов. Модуляторы включают активаторы и ингибиторы опосредованного GPCR пути передачи сигналов.

«Активатор» представляет собой соединение, которое увеличивает опосредованную GPCR передачу сигналов в пути передачи сигналов. Активаторы могут активировать рецептор напрямую (например, агонист) или могут увеличивать активацию рецептора посредством другого соединения (например, положительный аллостерический модулятор). Активаторы могут связывать рецептор и увеличивать активность рецептора, увеличивать, открывать, активировать, облегчать, усиливать активацию, сенсibiliзировать, агонизировать, переводить конформацию рецептора в активное состояние, или осуществлять повышающую регуляцию активности рецептор-белок. Активаторы включают агонисты, частичные агонисты и положительные аллостерические модуляторы.

«Агонист», который может представлять собой полный агонист или частичный агонист, связывает GPCR, активирует рецептор и инициирует ответ, как правило, посредством активации G-белка. Агонист увеличивает активность рецептора по сравнению с нормальным исходным уровнем. Соединение, по-видимому, является агонистом рецептора, если оно увеличивает активность опосредованного GPCR пути передачи сигналов по меньшей мере на 20% выше соответствующего контроля (например, фоновой или исходной активности) при концентрации вплоть до 50 мкМ. Полный агонист всегда является активатором. Частичный агонист имеет меньшую присущую ему активность, чем полный агонист, но увеличивает активность рецептора по сравнению с исходной активностью. Частичный агонист может действовать в качестве функционального ингибитора в присутствии полного агониста.

«Положительный аллостерический модулятор» или «РАМ» представляет собой соединение, которое связывает GPCR в участке, отличном от участков связывания лиганда и увеличивает опосредованную активность GPCR передачи сигналов в ответ на агонисты.

«Ингибитор» представляет собой соединение, которое уменьшает опосредованную

GPCR передачу сигналов в пути передачи сигналов. Ингибиторы представляют собой соединения, которые функционально взаимодействуют с GPCR и частично или полностью блокируют активность, уменьшают, предотвращают, замедляют активацию, инактивируют, антагонизируют, десенсибилизируют, переводят конформацию рецептора в неактивную конформацию, блокируют способность другого соединения (например, эндогенного агонистического лиганда) взаимодействовать с рецептором или иным образом осуществляют понижающую регуляцию активности рецептора. Ингибиторы могут уменьшать исходную активность рецептора (например, обратный агонист), или могут блокировать или уменьшать активность другого соединения (например, частичный агонист или антагонист). Ингибиторы включают антагонисты, обратные агонисты, частичные агонисты, частичные обратные агонисты и отрицательные аллостерические модуляторы. Ингибиторы не включают соединения, которые действуют единственно посредством уменьшения экспрессии нуклеиновой кислоты или белка рецептора.

«Антагонист» представляет собой ингибитор, который связывает GPCR, обычно в том же участке, что и лиганд или агонист. Сам по себе, антагонист не активирует или не ингибирует активность передачи сигналов посредством рецептора и не изменяет активность рецептора от исходных уровней. Однако, антагонист является способным ингибировать или блокировать активацию рецептора в присутствии агониста или лиганда, или ингибировать или блокировать ингибирование рецептора в присутствии обратного агониста. Соединение, по-видимому, является антагонистом рецептора или аллостерическим модулятором, если, при концентрации вплоть до 50 мкМ, оно имеет активность в анализе CRA, и оно увеличивает активность опосредованного GPCR-рецептором пути передачи сигналов с менее чем 20% увеличением, по сравнению с соответствующим контролем (например, фоновым или исходным), или уменьшает активность опосредованного GPCR пути передачи сигналов с менее чем 10% ингибированием, по сравнению с соответствующим контролем (например, фоновым или исходным). Кроме того, соединение, которое ингибирует эффект агониста или обратного агониста, можно считать антагонистом.

«Обратный агонист», который может представлять собой полный обратный агонист или частичный обратный агонист, представляет собой ингибитор, который связывает рецептор и уменьшает исходную передачу сигналов опосредованного GPCR пути передачи сигналов. Соединение, по-видимому, является обратным агонистом, если, при концентрации вплоть до 50 мкМ, оно уменьшает исходную передачу сигналов опосредованного GPCR пути передачи сигналов по меньшей мере на 10%. Частичный обратный агонист имеет меньшую присущую ему ингибирующую активность, чем полный обратный агонист.

«Отрицательный аллостерический модулятор» представляет собой соединение, которое связывает рецептор в участке, отдельном от участка связывания лиганда, и уменьшает опосредованную активность GPCR передачи сигналов в ответ на агонисты.

«Частичный агонист» может представлять собой функциональный активатор или функциональный ингибитор, в зависимости от присутствия или отсутствия полного агониста в данном биологическом окружении. Частичные агонисты связывают рецептор и увеличивают активность рецептора по сравнению с исходным уровнем активности, но имеют только частичную эффективность, по сравнению с полным агонистом. Например, в присутствии полного агониста, частичный агонист может уменьшать активацию рецептора, таким образом, действуя как функциональный ингибитор. В отсутствие полного агониста, частичный агонист может увеличивать активацию рецептора, таким образом, действуя как функциональный активатор.

«Частичный обратный агонист» может представлять собой функциональный активатор или функциональный ингибитор, в зависимости от присутствия или отсутствия полного обратного агониста в данном биологическом окружении. Частичные обратные агонисты связывают рецептор и уменьшают активность рецептора, по сравнению с исходным уровнем активности, но имеют только частичную эффективность, по сравнению с полным обратным агонистом. Например, в присутствии полного обратного агониста, частичный обратный агонист может увеличивать активацию рецептора, таким образом, действуя как функциональный активатор. В отсутствие полного обратного агониста, частичный обратный агонист может уменьшать активацию рецептора, таким образом, действуя как функциональный ингибитор.

В рамках изобретения, термин «исходный уровень активности» или «исходный уровень активности передачи сигналов», или «исходная активность» относится к уровню опосредованную активность GPCR передачи сигналов в отсутствие модулирующего соединения. В одном варианте осуществления, исходный уровень активности опосредованного GPR174 пути передачи сигналов определяют по отношению к специфической линии клеток, где линия клеток, как известно, имеет функциональную активность GPR174 или дефектную активность GPR174. В другом варианте осуществления, исходный уровень активности опосредованного GPR174 пути передачи сигналов определяют по отношению к клетке, сверхэкспрессирующей GPR174 (например, как описано в примерах 2, 3 и 4 в настоящем описании). В некоторых вариантах осуществления, исходный уровень активности опосредованного GPR174 пути передачи сигналов определяют по отношению к клетке, как известно, взаимодействующей с эндогенным лигандом, или, как известно, содержащей эндогенный лиганд GPR174, или по отношению к клетке, как известно, не содержащей эндогенный GPR174-лиганд, допуская, что такой эндогенный лиганд GPR174 будет идентифицирован позже.

«Лиганд» представляет собой соединение, которое связывает рецептор и модулирует активность рецептора.

«Эндогенный лиганд» представляет собой эндогенный объект (например, молекулу, пептид или ион), который модулирует рецептор в клетке, ткани или организме-источнике.

«Суррогатный лиганд» представляет собой неэндогенную молекулу, которая

связывает рецептор и модулирует его активность. Суррогатный лиганд может являться природным или может являться синтетическим. Суррогатный лиганд может активировать или ингибировать активность рецептора. В одном варианте осуществления, суррогатный лиганд представляет собой малую молекулу. В следующем варианте осуществления, суррогатный лиганд представляет собой малую органическую молекулу.

«Смещенный лиганд» представляет собой соединение, которое связывает GPCR и избирательно модулирует (более чем в 2 раза), активность одного из опосредованных GPCR путей передачи сигналов (например, пути передачи сигналов Gq, Gi, Gs, G12/13, $\beta\gamma$ или аррестина), по сравнению с другими опосредованными GPCR путем(путями) передачи сигналов.

В рамках изобретения, термин «кажущаяся аффинность связывания» относится к наблюдаемому изменению аффинности связывания соединения для GPR174 в присутствии дополнительного соединения, которое связывает GPR174, по сравнению с аффинностью связывания, наблюдаемой для соединения для GPR174 без присутствия дополнительного соединения. В некоторых вариантах осуществления, соединение и дополнительное соединение конкурируют за связывания с одним и тем же участком на GPR174. Хотя аффинности связывания каждого соединения для GPR174 не изменяются, определение аффинности связывания одного соединения для GPR174 в присутствии дополнительного соединения, которое связывает GPR174, могут приводить к уменьшению измеренной аффинности связывания соединения для GPR174. В некоторых вариантах осуществления, два соединения не связываются в одном и том же участке, и аллостерическое связывание одного соединения с GPR174 может приводить к уменьшению или увеличению аффинности связывания для GPR174 другого соединения. Это может быть обусловлено конформационными изменениями в GPR174, вызванными связыванием одного из соединений с GPR174, которые влияют на участок связывания другого соединения.

Соединение является «специфическим для» GPR174, если оно способно модулировать (например, ингибировать) активность GPR174, но не имеет сходную активность по отношению к другим белкам, такими как другие сопряженные с G-белком рецепторы, например, по сравнению с эталонной панелью белков (например, включающей GPCR, отличные от GPR174, и, необязательно, также включающей ионные каналы и/или другие типы транспортеров). В одном примере, эталонная панель включает следующие рецепторы: мускариновый M1, CCRL2, CMKOR1, GPR3, GPR4, GPR12, GPR17, GPR18, GPR19, GPR20, GPR21, GPR22, GPR25, GPR26, GPR27, GPR31, GPR32, GPR34, GPR37, GPR37L1, GPR39, GPR43, GPR45, GPR48, GPR50, GPR52, GPR61, GPR62, GPR63, GPR65, GPR68, GPR78, GPR80, GPR83, GPR85, GPR87, GPR88, GPR101, GPR132, GPR135, GPR139, GPR141, GPR146, GPR148, GPR149, GPR150, GPR151, GPR152, GPR153, GPR160, GPR161, GPR162, GPR173, GPR182, GPR183, LGR5, LGR6, MAS1, MRGD, MRGE, MRGF, MRGI4, OPN3, OPN4, OPN5, P2Y8, P2Y10, TAAR6 и TAAR8.

В другом примере, эталонная панель включает следующие рецепторы: человеческий

аденозина A1; человеческий аденозина A2A; крысиный адренергический $\alpha 1A$; крысиный адренергический $\alpha 1B$; человеческий адренергический $\alpha 2A$; человеческий адренергический $\beta 1$; человеческий адренергический $\beta 2$; крысиный кальциевого канала L-типа, чувствительный к дигидропиридину; человеческий дофамина D1; человеческий дофамина D2; и человеческий сопряженный с G белком рецептор, GPR103. В другом примере, эталонная панель включает следующие рецепторы: крысиный GABA A; крысиный глутамата NMDA; человеческий гистамина H₁; человеческий мускариновый M₂; человеческий никотиновый ацетилхолина α_1 ; человеческий опиата μ (OP3, MOR); человеческий калиевый канал [K_{ATP}]; человеческий калиевый канал hERG; человеческий сигма σ_1 ; крысиный сигма σ_2 ; крысиный натриевый канал, участок 2; и человеческий транспортер, норадреналина.

В конкретных вариантах осуществления, соединение, которое является специфическим для GPR174, имеет в 2, 5, 10, 25, 50, 100, 500, 1000, 5000 или 10000 раз большую активность при ингибировании активности GPR174, по сравнению с другими сопряженными с G-белком рецепторами, например, другими GPCR в одной или нескольких из эталонных панелей, описанных выше.

В конкретных вариантах осуществления, соединение, которое является специфическим для GPR174, имеет в 2, 5, 10, 25, 50, 100, 500, 1000, 5000 или 10000 раз большую активность в анализе передачи сигналов Gs, который проводят в клетке, экспрессирующей GPR174, по сравнению с активностью передачи сигналов Gs в клетке, экспрессирующей другие GPCR, например, другие GPCR в каждой из эталонных панелей, описанных выше.

«Одобренное агентством соединение» относится к соединению, которое было одобрено для клинического использования для человека или ветеринарных целей до 4 ноября 2016 г. Управлением США по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных средств (FDA) или сходным правительственным регуляторным агентством (например, Европейским агентством лекарственных средств (EMA), Министерством здравоохранения Канады, Министерством здравоохранения и благосостояния Японии).

Соединение, «не одобренное для использования при заболевании, ассоциированном с GPR174», относится к соединению, которое не одобрено до 4 ноября 2016 г. для терапевтического использования FDA или сходным правительственным регуляторным агентством (например, EMA, Министерством здравоохранения Канады и Министерством здравоохранения и благосостояния Японии) для показания, ассоциированного с активностью GPR174 (например, любого из описанных в настоящем описании, такого как злокачественная опухоль или заболевание или нарушение нервной системы).

Под соединением, «не одобренным как нацеливающее на GPR174», понимают соединение, не указанное в фармакологических данных, принятых в FDA США или сходном правительственном регуляторном агентстве (например, EMA, Министерстве здравоохранения Канады, и Министерстве здравоохранения и благосостояния Японии), как

нацеливающее на GPR174, до 4 ноября 2016 г. Указание на такое нацеливание часто обнаруживают в этикетке одобренного лекарственного средства.

Термин «соединение» или грамматические эквиваленты, в рамках изобретения, обозначает молекулы, либо природные, либо синтетические, например, белок; антитело, олигопептид (например, длиной от приблизительно 5 до приблизительно 25 аминокислот, например, длиной от приблизительно 10 до 20 или от 12 до 18 аминокислот, например, длиной 12, 15 или 18 аминокислот); нуклеотиды (например, ингибирующую РНК), которые ингибируют экспрессию GPR174, низкомолекулярное химическое соединение, например, малую органическую, металлоорганическую или неорганическую молекулу; полисахарид; олигонуклеотиды; липид; и жирную кислоту. Соединение может быть включено в библиотеку соединений, такую как комбинаторная, синтетическая, природная, гетероциклическая, подобная лекарственным средствам, подобная лидирующим соединениям, органическая, неорганическая, нерандомизированная или рандомизированная библиотека, которая обеспечивает достаточный диапазон разнообразия, или она может представлять собой сфокусированную или направленную коллекцию вышеуказанных соединений. Соединения, необязательно, связаны с партнером по слиянию, например, нацеливающими соединениями, восстанавливающими активность соединениями, димеризующими соединениями, стабилизирующими соединениями, адресуемыми соединениями и другими функциональными группами. Общепринятым образом, новые химические соединения с полезными свойствами получают посредством идентификации соединения (названного «лидирующим соединением»), имеющего некоторое желательное свойство или активность, например, ингибирующую активность, получения вариантов лидирующего соединения, и оценки свойств и активности этих вариантов соединения. Часто, способы высокопроизводительного скрининга («HTS») используют для такого анализа.

Термины «малая молекула», «малая органической молекула» и «малая неорганической молекула» относятся к молекулам (органическим, металлоорганическим или неорганическим), органическим молекулам и неорганическим молекулам, соответственно, которые являются либо природными, либо синтетическими, и которые имеют молекулярную массу более чем приблизительно 50 Да и менее чем приблизительно 2500 Да. Малые органические (например) молекулы могут составлять менее чем приблизительно 2000 Да, между приблизительно 100 Да и приблизительно 1000 Да, или между приблизительно 100 и приблизительно 600 Да, или между приблизительно 200 и 500 Да.

Термин «соединение, предварительно определенное как функционально взаимодействующее с GPR174», представляет собой соединение, которое определено, до приведения в контакт с клеткой, экспрессирующей GPR174, или введения соединения субъекту, как модулирующее опосредованный GPR174 путь передачи сигналов посредством функционального взаимодействия с GPR174. Это предварительное

определение можно осуществлять либо посредством

(i) прямого получения информации, что соединение функционально взаимодействует с GPR174, посредством физической демонстрации того, что соединение функционально взаимодействует с GPR174, посредством проведения анализа, измеряющего функциональное взаимодействие с GPR174, или посредством проведения анализа, измеряющего активность опосредованной GPR174 передачи сигналов, или

(ii) посредством опосредованного получения информации, что соединение функционально взаимодействует с GPR174, посредством приема или получения таких знаний или информации, применительно к результатам других исследователей, физически показывающих такое взаимодействие с использованием анализа, измеряющего функциональное взаимодействие соединения с GPR174 или измеряющего активность опосредованной GPR174 передачи сигналов, от другой группы или источника (например, знаний или информации, применительно к результатам исследования, проведенного другими исследователями, физически показывающих такое взаимодействие с использованием любого анализа, измеряющего функциональное взаимодействие соединения с GPR174 или измеряющего активность опосредованной GPR174 передачи сигналов, полученных, например, из публикации в научном журнале, или в опубликованной патентной заявке, или посредством прочтения инструкции по применению препарата, или полученных по частным каналам (например, посредством персонального сообщения), в каждом случае, до приведения в контакт с соединением клетки, экспрессирующей GPR174, или введения соединения субъекту. В одном варианте осуществления, соединение предварительно определено как функционально взаимодействующее с GPR174 человека, посредством прямого или опосредованного получения информации, что соединение функционально взаимодействует с GPR174 человека, показанным как SEQ ID NO:1, или природным вариантом GPR174, имеющим по меньшей мере 95% идентичность с SEQ ID NO:1.

Под «терапевтически эффективным количеством» понимают количество, оказывающее желательный эффект, для которого его вводят, например, улучшение или задержку по меньшей мере одного симптома, ассоциированного с заболеванием или состоянием, подвергаемым лечению. Точная доза может зависеть от цели лечения, и ее может определять специалист в данной области с использованием известных способов (см., например, Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); и Pickar, *Dosage Calculations* (1999)).

Под «в основном чистый» или «выделенный» понимают соединение (например, полипептид или конъюгат), отделенное от других химических компонентов. Как правило, соединение является в основном чистым, когда оно составляет по меньшей мере 30%, по массе, свободных от других компонентов. В конкретных вариантах осуществления, препарат составляет по меньшей мере 50%, 60%, 75%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% по массе, свободных от других компонентов. Очищенный полипептид можно

получать, например, посредством экспрессии рекомбинантного полинуклеотида, кодирующего такой полипептид, или посредством химического синтеза полипептида. Чистоту можно измерять посредством любого пригодного способа, например, хроматографии на колонке, электрофореза в полиакриламидном геле или посредством анализа HPLC.

В контексте природного соединения, термин «выделенное» представляет собой соединение, измененное или удаленное из природного состояния (например, посредством вмешательства человека).

Термин «млекопитающее» включает всех млекопитающих, включая, без ограничения, людей, нечеловекообразных приматов, собак, кошек, лошадей, овец, коз, коров, кроликов, свиней и грызунов.

В рамках изобретения, и как хорошо известно в данной области, «лечить» заболевание, нарушение или состояние, «лечение» заболевания, нарушения или состояния (например, состояний, описанных в настоящем описании, таких как воспалительные состояния), или «терапия» представляет собой способ получения обеспечивающих преимущество или желательных результатов, таких как клинические результаты, и может быть осуществлено либо для профилактики, либо в ходе течения клинической патологии. Обеспечивающие преимущество или желательные результаты могут включать, но без ограничения, смягчение или облегчение одного или нескольких симптомов или состояний; уменьшение степени заболевания, нарушения или состояния; уменьшение вероятности развития заболевания, нарушения или состояния; стабилизацию (т.е., отсутствие ухудшения) состояния заболевания, нарушения или состояния; предотвращение развития или распространения заболевания, нарушения или состояния; задержку или замедление прогрессирования заболевания, нарушения или состояния; облегчение или ослабление заболевания, нарушения или состояния; и ремиссию (либо частичную, либо полную), либо поддающиеся детекции, либо не поддающиеся детекции. «Облегчение» заболевания, нарушения или состояния означает, что степень и/или нежелательные клинические проявления заболевания, нарушения или состояния уменьшаются, и/или течение прогрессирования замедляется или удлиняется, по сравнению со степенью или течением в отсутствие лечения.

В рамках изобретения, термины «субъект» или «пациент» относятся к любому организму, которому соединение или композицию по настоящему изобретению можно вводить, например, для экспериментальных, диагностических, профилактических и/или терапевтических целей. Субъект, подлежащий лечению с использованием соединения или композиции, описанных в настоящем описании, может представлять собой субъекта, диагностированного практикующим специалистом в области медицины как имеющего заболевание, нарушение или состояние, описанное в настоящем описании, или подверженного риску развития заболевания, нарушения или состояния, описанного в настоящем описании. Диагностику можно осуществлять посредством любого способа или

метода, известных в данной области. Специалисту в данной области понятно, что субъекта можно диагностировать как имеющего заболевание, нарушение или состояние, с использованием стандартного теста или исследования, или можно идентифицировать, без исследования, как подверженного высокому риску из-за присутствия одного или нескольких факторов риска. Типичные субъекты включают животных (например, млекопитающих, таких как мыши, крысы, кролики, нечеловекообразные приматы и люди).

В рамках изобретения, термин «неоплазия» относится к любому новому и аномальному росту клеток, особенно росту, при котором размножение клеток является неконтролируемым и прогрессирующим. Неоплазии могут являться незлокачественными (т.е. доброкачественными) или злокачественными.

В рамках изобретения, термин «опухоли» означает неоплазии, включая солидные и жидкие (т.е., крови) неоплазии, и доброкачественные и злокачественные неоплазии, включая первичные и/или метастазирующие неоплазии.

Термин «алканоил», в рамках изобретения, относится к группе, имеющей структуру $-C(O)-R$, в которой R представляет собой алкил. Алканоил может являться незамещенным или замещенным (например, необязательно замещенный алканоил), как описано для алкила. Суффикс «оил» можно использовать для определения других групп, имеющих структуру $-C(O)-R$. Например, в алкеноильной группе, R представляет собой алкенил; в алкиноильной группе, R представляет собой алкинил; в циклоалканоильной группе, R представляет собой циклоалкил; в циклоалкеноильной группе, R представляет собой циклоалкенил; и в циклоалкиноильной группе, R представляет собой циклоалкинил (все группы являются такими, как определено в настоящем описании). Кроме того, группы, определенные с использованием суффикса «оил» можно дополнительно использовать для определения групп, имеющих структуру $-O-C(O)-R'$, посредством добавления суффикса «окси», например, когда R' представляет собой алкил, эта группа представляет собой «алканоилокси». Например, в алкеноилокси-группе, R' представляет собой алкенил; в алкиноилокси-группе, R' представляет собой алкинил; в циклоалканоилокси-группе, R' представляет собой циклоалканил; в циклоалкеноилокси-группе, R' представляет собой циклоалкенил; и в циклоалкиноилокси-группе, R' представляет собой циклоалкинил (все группы являются такими, как определено в настоящем описании). Каждая из этих групп может являться незамещенной или замещенной (например, необязательно замещенной), как описано для каждой соответствующей группы.

Термин «алкенил», в рамках изобретения, относится к моновалентному заместителю с линейной цепью или разветвленной цепью, включающему одну или две двойные связи углерод-углерод и содержащему только C и H при отсутствии замещения. Алкенильная группа может содержать, если не указано иное, 2, 3, 4, 5 или 6 атомов углерода, исключая атомы углерода из любых заместителей, если они присутствуют. Неограничивающие примеры алкенильных групп включают этенил, проп-1-енил, проп-2-енил, 1-метилэтенил, бут-1-енил, бут-2-енил, бут-3-енил, 1-метилпроп-1-енил, 2-метилпроп-1-енил и 1-

метилпроп-2-енил. Алкенил может являться незамещенным или замещенным (например, необязательно замещенный алкенил), как описано для алкила.

Термин «алкенилен», в рамках изобретения, относится к двухвалентному заместителю с линейной цепью или разветвленной цепью, включающему одну или две двойные связи углерод-углерод и содержащему только С и Н при отсутствии замещения. Алкениленовая группа может содержать, если не указано иное, 2, 3, 4, 5 или 6 атомов углерода, исключая атомы углерода из любых заместителей, если они присутствуют. Неограничивающие примеры алкениленовых групп включают этен-1,1-диил; этен-1,2-диил; проп-1-ен-1,1-диил, проп-2-ен-1,1-диил; проп-1-ен-1,2-диил, проп-1-ен-1,3-диил; проп-2-ен-1,1-диил; проп-2-ен-1,2-диил; бут-1-ен-1,1-диил; бут-1-ен-1,2-диил; бут-1-ен-1,3-диил; бут-1-ен-1,4-диил; бут-2-ен-1,1-диил; бут-2-ен-1,2-диил; бут-2-ен-1,3-диил; бут-2-ен-1,4-диил; бут-2-ен-2,3-диил; бут-3-ен-1,1-диил; бут-3-ен-1,2-диил; бут-3-ен-1,3-диил; бут-3-ен-2,3-диил; бута-1,2-диен-1,1-диил; бута-1,2-диен-1,3-диил; бута-1,2-диен-1,4-диил; бута-1,3-диен-1,1-диил; бута-1,3-диен-1,2-диил; бута-1,3-диен-1,3-диил; бута-1,3-диен-1,4-диил; бута-1,3-диен-2,3-диил; бута-2,3-диен-1,1-диил; и бута-2,3-диен-1,2-диил. Алкенилен может являться незамещенным или замещенным (например, необязательно замещенный алкенилен), как описано для алкилена.

Термин «алкокси» представляет собой химический заместитель формулы -OR, где R представляет собой необязательно замещенную алкильную группу (например, необязательно замещенную C₁-C₆ алкильную группу). Замещенная алкокси-группа может иметь 1, 2, 3, 4, 5 или 6 групп заместителей, как определено в настоящем описании. Подобным образом, термин «арилалкокси» представляет собой химический заместитель формулы -OR, где R представляет собой необязательно замещенную арилалкильную группу. Термин «циклоалкокси» представляет собой заместитель формулы -OR', где R' представляет собой необязательно замещенную циклоалкильную группу, как описано в настоящем описании. Подобным образом, термин «алкенокси» представляет собой химический заместитель формулы -OR'', где R'' представляет собой необязательно замещенную алкенильную группу, как описано в настоящем описании.

Термин «алкил», в рамках изобретения, относится к насыщенному моновалентному заместителю с линейной цепью или разветвленной цепью, содержащему только С и Н при отсутствии замещения. Алкильная группа может содержать, если не указано иное, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 атомов углерода, исключая атомы углерода из любых заместителей, если они присутствуют. Неограничивающие примеры алкильной группы включают метил, этил, изобутил, *трет-бутил* и т.п. Алкильная группа может являться незамещенной или замещенной (например, необязательно замещенный алкил) 1, 2, 3, 4, 5 или 6 заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из: гало (например, F, Cl, Br или I), CN, NO₂, CF₃, OCF₃, COOR', CONR'₂, OR', SR', SOR', SO₂R', NR'₂, NR'(CO)R', NR'C(O)OR', NR'C(O)NR'₂, NR'SO₂NR'₂, NR'SO₂R', оксо (=O) или оксимидо (=NOR''), где каждый R' независимо представляет собой H или необязательно замещенную группу, выбранную из

алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, циклоалкенила, циклоалкинила, гетероалкила, гетероалкенила, гетероалкинила, гетероарила и арила (все, как определено в настоящем описании); и R'' представляет собой H или необязательно замещенную группу, выбранную из алкила, алкенила, алкинила, гетероалкила, гетероалкенила, гетероалкинила, гетероарила и арила (все, как определено в настоящем описании). Альтернативно, замещенная алкильная группа может представлять собой перфторалкильную группу. В конкретных вариантах осуществления, когда по меньшей мере один из заместителей на алкильной группе представляет собой оксо, оксо-группа не связана с атомом углерода, связанным с исходной молекулярной группой.

Термин «алкилен», в рамках изобретения, относится к насыщенному двухвалентному заместителю с линейной цепью или разветвленной цепью, содержащему только C и H при отсутствии замещения. Алкиленовая группа может содержать, если не указано иное, 1, 2, 3, 4, 5 или 6 атомов углерода, исключая атомы углерода из любых заместителей, если они присутствуют. Неограничивающие примеры алкиленовой группы включают метилен, этан-1,2-диил, этан-1,1-диил, пропан-1,3-диил, пропан-1,2-диил, пропан-1,1-диил, пропан-2,2-диил, бутан-1,4-диил, бутан-1,3-диил, бутан-1,2-диил, бутан-1,1-диил и бутан-2,2-диил, бутан-2,3-диил. Алкиленовая группа может являться незамещенной или замещенной (например, необязательно замещенный алкилен) 1, 2, 3, 4, 5, или 6 заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из: гало (например, F, Cl, Br или I), CN, NO₂, CF₃, OCF₃, COOR', CONR'₂, OR', SR', SOR', SO₂R', NR'₂, NR'(CO)R', NR'C(O)OR', NR'C(O)NR'₂, NR'SO₂NR'₂, NR'SO₂R', оксо (=O) или оксимидо (=NOR''), где каждый R' независимо представляет собой H или необязательно замещенную группу, выбранную из алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, циклоалкенила, циклоалкинила, гетероалкила, гетероалкенила, гетероалкинила, гетероарила и арила (все, как определено в настоящем описании); и R'' представляет собой H или необязательно замещенную группу, выбранную из алкила, алкенила, алкинила, гетероалкила, гетероалкенила, гетероалкинила, гетероарила и арила (все, как определено в настоящем описании). Альтернативно, замещенная алкиленовая группа может представлять собой перфторалкиленовую группу.

Термин «алкилсульфинил» относится к группе, имеющей структуру алкил-S(O)-, в которой алкил является таким, как описано в настоящем описании. Алкилсульфинил может являться незамещенным или замещенным (например, необязательно замещенный алкилсульфинил), как описано для алкила.

Термин «алкилсульфонил» относится к группе, имеющей структуру алкил-S(O)₂-, в которой алкил является таким, как описано в настоящем описании. Алкилсульфонил может являться незамещенным или замещенным (например, необязательно замещенный алкилсульфонил), как описано для алкила.

Термин «алкинил», в рамках изобретения, относится к моновалентному заместителю с линейной цепью или разветвленной цепью, включающему одну или две тройные связи углерод-углерод и содержащему только C и H при отсутствии замещения. Алкинильная

группа может содержать, если не указано иное, 2, 3, 4, 5 или 6 атомов углерода, исключая атомы углерода из любых заместителей, если они присутствуют. Неограничивающие примеры алкинильных групп включают этинил, проп-1-инил, проп-2-инил, бути-1-нил, бут-2-инил, бут-3-инил, 1-метилпроп-2-инил и т.п. Алкинил может являться незамещенным или замещенным (например, необязательно замещенный алкинил), как описано для алкила.

Термин «алкинилен», в рамках изобретения, относится к двухвалентному заместителю с линейной цепью или разветвленной цепью, включающему одну или две тройные связи углерод-углерод и содержащему только С и Н при отсутствии замещения. Алкиниленовая группа может содержать, если не указано иное, 2, 3, 4, 5 или 6 атомов углерода, исключая атомы углерода из любых заместителей, если они присутствуют. Неограничивающие примеры алкениленовых групп включают этин-1,2-диил; проп-1-ин-1,3-диил; проп-2-ин-1,1-диил; бут-1-ин-1,3-диил; бут-1-ин-1,4-диил; бут-2-ин-1,1-диил; бут-2-ин-1,4-диил; бут-3-ин-1,1-диил; бут-3-ин-1,2-диил; бут-3-ин-2,2-диил; и бута-1,3-диин-1,4-диил. Алкенилен может являться незамещенным или замещенным (например, необязательно замещенный алкенилен), как описано для алкилена.

Термин «амидо», в рамках изобретения, относится к группе, имеющей структуру $-N(R^{N1})R^{N2}$, в которой R^{N1} представляет собой $-H$, OH , $-N(R^{N3})_2$, $-C(O)R^{N4}$, $-SO_2OR^{N4}$, $-SO_2R^{N4}$, $-SOR^{N4}$, алкил, алкенил, алкинил, алкокси, арил, арилалкил, циклоалкил, циклоалкилалкил, гетероциклил (например, гетероарил) или гетероциклилалкил (например, гетероарилалкил); R^{N2} представляет собой $C(O)R^{N5}$, SO_2OR^{N5} , SO_2R^{N5} или SOR^{N5} ; или R^{N1} и R^{N5} объединяются с формированием 5-, 6-, 7- или 8-членного кольца. R^{N3} представляет собой H , алкил, арил, арилалкил, циклоалкил, циклоалкилалкил, гетероциклил (например, гетероарил), или гетероциклилалкил (например, гетероарилалкил); каждый из R^{N4} и R^{N5} независимо представляет собой алкил, алкенил, алкинил, алкокси, арил, арилалкил, циклоалкил, циклоалкилалкил, гетероциклил (например, гетероарил) или гетероциклилалкил (например, гетероарилалкил). В предпочтительном варианте осуществления, R^{N1} представляет собой H . Амидо может являться незамещенным, когда R^{N1} представляет собой H , и группа в R^{N2} является незамещенной (например, R^{N3} представляет собой H , незамещенный алкил, незамещенный арил, незамещенный арилалкил, незамещенный циклоалкил, незамещенный циклоалкилалкил, незамещенный гетероциклил (например, незамещенный гетероарил) или незамещенный гетероциклилалкил (например, незамещенный гетероарилалкил); или каждый из R^{N4} и R^{N5} представляет собой незамещенный алкил, незамещенный алкенил, незамещенный алкинил, незамещенный алкокси, незамещенный арил, незамещенный арилалкил, незамещенный циклоалкил, незамещенный циклоалкилалкил, незамещенный гетероциклил (например, незамещенный гетероарил), или незамещенный гетероциклилалкил (например, незамещенный гетероарилалкил)). Альтернативно, амидо может являться замещенным, когда по меньшей мере одна из групп, перечисленных под R^{N3} , R^{N4} или R^{N5} , является замещенной, и/или когда R^{N1} не представляет собой H .

Термин «амино», в рамках изобретения, представляет собой $-N(R^{N1})_2$, где каждый R^{N1} независимо представляет собой H, OH, NO_2 , $N(R^{N2})_2$, *N*-защитную группу, алкил, алкенил, алкинил, алкокси, арил, арилалкил, циклоалкил, циклоалкилалкил, гетероциклил (например, гетероарил), гетероциклилалкил (например, гетероарилалкил), или два R^{N1} объединяются с формированием гетероциклила или *N*-защитной группы, и где каждый R^{N2} независимо представляет собой H, алкил или арил. Амино может являться незамещенным, когда каждый R^{N1} представляет собой H, или замещенным, когда по меньшей мере один R^{N1} не представляет собой H (например, необязательно замещенный амино). В предпочтительном варианте осуществления, амино представляет собой $-NH_2$ или $-NHR^{N1}$, где R^{N1} независимо представляет собой OH, NO_2 , NH_2 , NR^{N2}_2 , SO_2OR^{N2} , SO_2R^{N2} , SOR^{N2} , алкил или арил, и каждый R^{N2} может представлять собой H, алкил или арил.

Термины «ароматическая группа» и «арил», в рамках изобретения, относятся к карбоциклической моновалентной группе (моноциклической или бициклической с конденсированными кольцами), в котором карбоцикл удовлетворяет правилу Хюккеля ($4n+2$ электронов в одной системе π) и имеет характеристики ароматической стабилизации, по сравнению с гипотетической молекулой, не имеющей ароматической стабилизации (например, бензол по сравнению с циклогексатриеном). Арил может содержать 6-10 атомов углерода, исключая атомы углерода из любых заместителей, если они присутствуют. Неограничивающие примеры моноциклических и конденсированных бициклических ароматических групп включают фенил и нафтил, соответственно. Арил может являться незамещенным или замещенным, как определено в настоящем описании. Термин «арилен» относится к арильной группе, как описано в настоящем описании, за исключением того, что арилен представляет собой двухвалентный заместитель. Арилен может являться незамещенным или замещенным, как определено в настоящем описании.

Термин «арилалкил», в рамках изобретения, представляет собой химический заместитель (арил)-(алкилен)-, в котором каждая из арильной и алкиленовой группы является такой, как описано в настоящем описании. Арилалкильная группа может являться незамещенной или замещенной (например, необязательно замещенный C_6 - C_{10} арил C_1 - C_6 алкил). Неограничивающий пример арилалкила представляет собой фенилметил, обычно обозначаемый как бензил. Арилалкенил (например, C_6 - C_{10} арил C_2 - C_6 алкенил) и арилалкинил (например, C_6 - C_{10} арил C_2 - C_6 алкинил) сходным образом определяют как имеющие общую структуру (арил)-(алкенилен)- и (арил) (алкинилен)-, соответственно. Арилгетероалкил, арилгетероалкенил, и арилгетероалкинил сходным образом определяют как имеющие структуру (арил)-(гетероалкилен)-, (арил)-(гетероалкенилен)- и (арил)-(гетероалкинилен)-, соответственно. Подобным образом, другие группы можно определять посредством комбинации термина, определяющего группу, с «алкил». Например, «гетероарилалкил» представляет собой химический заместитель, имеющий общую структуру (гетероарил)-(алкилен)-, который может являться незамещенным или замещенным (например, необязательно замещенный C_1 - C_9 гетероарил C_1 - C_6 алкил)

согласно соответствующим определениям каждой части гетероарилалкильной группы. Каждая из групп может являться незамещенной или замещенной (например, необязательно замещенной). Заместители для арильной или гетероарильной части представляют собой заместители, описанные для ароматических групп. Заместители для алкильной, гетероалкильной, алкенильной, гетероалкенильной, алкинильной или гетероалкинильной части представляют собой заместители, описанные в соответствующих определениях этих групп.

Термин «арилоил», в рамках изобретения, относится к группе, имеющей структуру (C₆-C₁₀ арил)-C(O)-. Арилоил может являться незамещенным или замещенным в соответствии с определением арильной группы (например, необязательно замещенный арилоил). Типичный пример арилоильной группы представляет собой бензоильную группу. Подобным образом, термин «гетероарилоил», в рамках изобретения, относится к группе, имеющей структуру (C₁-C₉ гетероарил)-C(O)-. Гетероарилоил может являться незамещенным или замещенным (например, необязательно замещенный гетероарилоил), как описано для гетероарила.

Термин «арилокси», в рамках изобретения, относится к карбоциклической ароматической системе, связанной с другим остатком, через атом кислорода, например, (C₆-C₁₀ арил)-O-. Арилокси-группа может являться незамещенной или замещенной (например, необязательно замещенный арил), как описано для ароматических групп. Типичный пример арилокси представляет собой фенокси (например, необязательно замещенный фенокси).

Термин «арилоилокси», в рамках изобретения, относится к группе, имеющей структуру (C₆-C₁₀ арил)-C(O)-O-. Арилоилокси может являться незамещенным или замещенным в соответствии с определением арильной группы (например, необязательно замещенный арилоилокси). Типичный пример арилоилокси-группы представляет собой бензоат. Подобным образом, термин «гетероарилоилокси», в рамках изобретения, относится к группе, имеющей структуру (C₁-C₉ гетероарил)-C(O)-O-. Гетероарилоилокси может являться незамещенным или замещенным (например, необязательно замещенный гетероарилоилокси), как описано для гетероарила.

Термин «арилсульфинил» относится к группе, имеющей структуру (C₆-C₁₀ арил)-S(O)-. Арилсульфинильная группа может являться незамещенной или замещенной, как описано в настоящем описании (например, необязательно замещенный арилсульфинил). Неограничивающий пример арилсульфинила представляет собой фенилсульфинил.

Термин «арилсульфонил» относится к группе, имеющей структуру (C₆-C₁₀ арил)-S(O)₂-. Арилсульфонильная группа может являться незамещенной или замещенной, как описано в настоящем описании (например, необязательно замещенный арилсульфонил). Неограничивающий пример арилсульфонила представляет собой фенилсульфонил.

Термин «арилтио» относится к группе, имеющей структуру (C₆-C₁₀ арил)-S-. Арилтио-группа может являться незамещенной или замещенной, как описано в настоящем описании (например, необязательно замещенный арилтио). Неограничивающий пример

арилтио представляет собой фенилтио.

Термин «карбоциклический», в рамках изобретения, представляет собой необязательно замещенную C_{3-12} моноциклическую, бициклическую или трициклическую структуру, в которой кольца, которые могут являться ароматическими или неароматическими, сформированы посредством атомов углерода. Карбоциклические структуры включают циклоалкильные, циклоалкенильные, циклоалкинильные и арильные группы.

Термин «карбонил», в рамках изобретения, относится к двухвалентной группе, состоящей из $C=O$, в которой две валентности находятся на атоме углерода. Этот термин можно использовать для определения других групп, имеющих общую структуру $R-C(O)-$. Таким образом, в алкоксикарбонильной группе, R представляет собой алкокси; в арилоксикарбонильной группе, R представляет собой арилокси; в аминокарбонильной группе, R представляет собой амино; в гетероарилоксикарбонильной группе, R представляет собой гетероарилокси; в гетероциклоксикарбонильной группе, R представляет собой гетероциклокси; или в гидроксикарбонильной группе, R представляет собой гидрокси. Каждая из групп может являться незамещенной или замещенной в соответствии с определением представленных в настоящем описании. Например, алкоксикарбонильная группа может являться незамещенной или замещенной, как определено для алкокси-группы.

Термины «карбоксамид» и «амид карбоновой кислоты», в рамках изобретения, относятся к группе, имеющей структуру $CONR'R''$, где каждый R' и R'' выбран, независимо, из H , необязательно замещенного C_{1-6} алкила, необязательно замещенного C_3-C_{10} циклоалкила, необязательно замещенного C_1-C_9 гетероциклила, необязательно замещенного C_6-C_{10} арила, необязательно замещенного C_1-C_9 гетероарила, или R' и R'' объединяются с формированием необязательно замещенного гетероциклила. Карбоксамид может являться незамещенным, когда группа R' и группа R'' являются незамещенными или замещенными, когда по меньшей мере один из R' и R'' представляет собой замещенную группу, как определено в настоящем описании. Соответственно, необязательно замещенный карбоксамид представляет собой карбоксамид, который может являться незамещенным или замещенным.

Термины «сложный эфир карбоновой кислоты» и «сложный эфир», в рамках изобретения, относятся к группе, имеющей структуру $-CO_2R'$, где R' выбран из необязательно замещенного алкила, необязательно замещенного циклоалкила, необязательно замещенного гетероциклила, необязательно замещенного арила или необязательно замещенного гетероарила. Сложный эфир может являться незамещенным, когда группа R' представляет собой незамещенную группу, или замещенным, когда группа R' представляет собой замещенную группу, как определено в настоящем описании. Соответственно, необязательно замещенный сложный эфир представляет собой сложный эфир, который может являться незамещенным или замещенным.

Под «циано» понимают группу, имеющую структуру -CN.

Термин «циклоалкенил», в рамках изобретения, относится к неароматической карбоциклической группе, имеющей одну, две или три двойные связи углерод-углерод и имеющей от трех до десяти атомов углерода (например, C₃-C₁₀ циклоалкилен), если не указано иное. Неограничивающие примеры циклоалкенила включают циклопроп-1-енил, циклопроп-2-енил, циклобут-1-енил, циклобут-2-енил, циклопент-1-енил, циклопент-2-енил, циклопент-3-енил, норборнен-1-ил, норборнен-2-ил, норборнен-5-ил и норборнен-7-ил. Циклоалкенильная группа может являться незамещенной или замещенной (например, необязательно замещенный циклоалкенил), как описано для циклоалкила.

Термин «циклоалкенилен», в рамках изобретения, относится к двухвалентной неароматической карбоциклической группе, имеющей одну, две, или три двойные связи углерод-углерод и имеющей от трех до десяти атомов углерода (например, C₃-C₁₀ циклоалкенилен), если не указано иное. Неограничивающие примеры циклоалкенилена включают циклопроп-1-ен-1,2-диил; циклопроп-2-ен-1,1-диил; циклопроп-2-ен-1,2-диил; циклобут-1-ен-1,2-диил; циклобут-1-ен-1,3-диил; циклобут-1-ен-1,4-диил; циклобут-2-ен-1,1-диил; циклобут-2-ен-1,4-диил; циклопент-1-ен-1,2-диил; циклопент-1-ен-1,3-диил; циклопент-1-ен-1,4-диил; циклопент-1-ен-1,5-диил; циклопент-2-ен-1,1-диил; циклопент-2-ен-1,4-диил; циклопент-2-ен-1,5-диил; циклопент-3-ен-1,1-диил; циклопент-1,3-диен-1,2-диил; циклопент-1,3-диен-1,3-диил; циклопент-1,3-диен-1,4-диил; циклопент-1,3-диен-1,5-диил; циклопент-1,3-диен-5,5-диил; норборнадиен-1,2-диил; норборнадиен-1,3-диил; норборнадиен-1,4-диил; норборнадиен-1,7-диил; норборнадиен-2,3-диил; норборнадиен-2,5-диил; норборнадиен-2,6-диил; норборнадиен-2,7-диил; и норборнадиен-7,7-диил. Циклоалкенилен может являться незамещенным или замещенным (например, необязательно замещенный циклоалкенилен), как описано для циклоалкила.

Термин «циклоалкил», в рамках изобретения, относится к моновалентной карбоциклической группе, имеющей от трех до десяти атомов углерода (например, C₃-C₁₀ циклоалкил), если не указано иное. Циклоалкильные группы могут являться моноциклическими или бициклическими. Бициклические циклоалкильные группы могут принадлежать к типу бицикло[r.q.0]алкила, в котором каждый из r и q независимо представляет собой 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7, при условии, что сумма r и q составляет 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8. Альтернативно, бициклические циклоалкильные группы могут включать соединенные мостиком циклоалкильные структуры, например, бицикло[r.q.g]алкил, в котором g представляет собой 1, 2, или 3, каждый из r и q независимо представляет собой 1, 2, 3, 4, 5 или 6, при условии, что сумма r, q и g составляет 3, 4, 5, 6, 7 или 8. Циклоалкильная группа может представлять собой спироциклическую группу, например, спиро[r.q]алкил, в которой каждый из r и q независимо представляет собой 2, 3, 4, 5, 6 или 7, при условии, что сумма r и q составляет 4, 5, 6, 7, 8 или 9. Неограничивающие примеры циклоалкила включают циклопропил, циклобутил, циклопентил, циклогексил,

циклогептил, 1-бицикло[2,2,1]гептил, 2-бицикло[2,2,1]гептил, 5-бицикло[2,2,1]гептил, 7-бицикло[2,2,1]гептил и декалинил. Циклоалкильная группа может являться незамещенной или замещенной (например, необязательно замещенный циклоалкил) с 1, 2, 3, 4, 5 или 6 заместителями, независимо выбранными из группы, состоящей из: алкила, алкенила, алкинила, гетероалкила, гетероалкенила, гетероалкинила, арила, арилалкила, гетероарила, гало (например, F, Cl, Br или I), CN, NO₂, CF₃, OCF₃, COOR', CONR'₂, OR', SR', SOR', SO₂R', NR'₂, NR'(CO)R', NR'C(O)OR', NR'C(O)NR'₂, NR'SO₂NR'₂, NR'SO₂R', оксо (=O) или оксимидо (=NOR''), где каждый R' независимо представляет собой H или необязательно замещенную группу, выбранную из алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, циклоалкенила, циклоалкинила, гетероалкила, гетероалкенила, гетероалкинила, гетероарила и арила (все, как определено в настоящем описании); и R'' представляет собой H или необязательно замещенную группу, выбранную из алкила, алкенила, алкинила, гетероалкила, гетероалкенила, гетероалкинила, гетероарила и арила (все, как определено в настоящем описании). Альтернативно, замещенная циклоалкильная группа может представлять собой перфторциклоалкильную группу.

Термин «циклоалкилен», в рамках изобретения, относится к двухвалентной карбоциклической группе, имеющей от трех до десяти атомов углерода (например, C₃-C₁₀ циклоалкил), если не указано иное. Неограничивающие примеры циклоалкилена включают циклопропан-1,1-диил; циклопропан-1,2-диил; циклобутан-1,1-диил; циклобутан-1,2-диил; циклобутан-1,3-диил; бицикло[2,2,1]гепта-1,2-диил; бицикло[2,2,1]гепта-1,3-диил; бицикло[2,2,1]гепта-1,4-диил; бицикло[2,2,1]гепта-1,7-диил; бицикло[2,2,1]гепта-2,2-диил; бицикло[2,2,1]гепта-2,3-диил; бицикло[2,2,1]гепта-2,7-диил; декалин-1,2-диил; декалин-1,3-диил; декалин-1,4-диил; декалин-1,5-диил; декалин-1,6-диил; декалин-2,2-диил; декалин-2,3-диил; декалин-2,4-диил; и декалин-2,5-диил. Циклоалкиленовая группа может являться незамещенной или замещенной (например, необязательно замещенный циклоалкилен), как описано для циклоалкила.

Термин «циклоалкинил», в рамках изобретения, относится к моновалентной карбоциклической группе, имеющей одну или две несмежные тройные связи углерод-углерод и имеющие от восьми до десяти атомов углерода (например, C₈-C₁₀ циклоалкил), если не указано иное. Неограничивающие примеры циклоалкинила включают циклооктинил, циклононинил, циклодецинил и циклодекадинил. Циклоалкинильная группа может являться незамещенной или замещенной (например, необязательно замещенный циклоалкинил), как описано для циклоалкила.

Гало может представлять собой любой атом галогена, особенно F, Cl, Br или I, и более конкретно, он представляет собой фтор или хлор.

Термин «галоалкил», в рамках изобретения, представляет собой алкилбную группу, как определено в настоящем описании, замещенную группой галогена (т.е., F, Cl, Br или I). Галоалкил может являться замещенным одним, двумя, тремя, или, в случае алкильных групп из двух атомов углерода или более, четырьмя галогенами. Галоалкильные группы

включают перфторалкилы. В некоторых вариантах осуществления, галоалкильная группа может являться дополнительно замещенной 1, 2, 3 или 4 группами заместителей, как описано в настоящем описании для алкильных групп.

Термин «гетероалкенил», в рамках изобретения, относится к алкенильной группе, в которой алкенильная цепь прервана один раз одним, двумя или тремя гетероатомами; дважды, каждый раз, независимо, одним, двумя или тремя гетероатомами; три раза, каждый раз, независимо, одним, двумя или тремя гетероатомами; или четыре раза, каждый раз, независимо, одним, двумя или тремя гетероатомами. Каждый гетероатом независимо представляет собой O, N или S. Ни одна из гетероалкенильных групп не включает более двух смежных атомов кислорода. Гетероалкенильная группа может являться незамещенной или замещенной (например, необязательно замещенный гетероалкенил). Когда гетероалкенильная группа является замещенной, и заместитель связан с гетероатомом, заместитель выбран соответственно. Заместитель, связанный с гетероатомом, как позволяет валентность, выбран из группы, состоящей из: алкила, алканоила, алкенила, алкеноила, алкинила, алкиноила, циклоалкила, циклоалканоила, циклоалкенила, циклоалкеноила, циклоалкинила, циклоалкиноила, арила, арилоила, гетероарила, гетероарилоила, гетероциклила, гетероциклоила, амина, аминокарбонила, алкоксикарбонила, арилоксикарбонила, гетероарилоксикарбонила и гетероциклилоксикарбонила. Когда гетероалкенильная группа является замещенной, и заместитель связан с углеродом, заместитель выбран из заместителей, описанных для алкила, при условии, что заместитель на атоме углерода, связанном с гетероатомом, не представляет собой гало. В некоторых вариантах осуществления, гетероалкенильная группа имеет C на конце, присоединенном к другим группам. В некоторых вариантах осуществления, гетероатом представляет собой O или N.

Термин «гетероалкенилен», в рамках изобретения, относится к алкениленовой группе, в которой алкениленовая цепь прервана один раз одним, двумя или тремя гетероатомами; дважды, каждый раз, независимо, одним, двумя или тремя гетероатомами; три раза, каждый раз, независимо, одним, двумя или тремя гетероатомами; или четыре раза, каждый раз, независимо, одним, двумя или тремя гетероатомами. Каждый гетероатом независимо представляет собой O, N или S. Ни одна из гетероалкениленовых групп не включает более чем два смежных атома кислорода. Гетероалкениленовая группа может являться незамещенной или замещенной (например, необязательно замещенный гетероалкенилен). Когда гетероалкениленовая группа является замещенной, и заместитель связан с гетероатомом, заместитель выбран соответственно. Заместитель, связанный с гетероатомом, как позволяет валентность, выбран из группы, состоящей из: алкила, алканоила, алкенила, алкеноила, алкинила, алкиноила, циклоалкила, циклоалканоила, циклоалкенила, циклоалкеноила, циклоалкинила, циклоалкиноила, арила, арилоила, гетероарила, гетероарилоила, гетероциклила, гетероциклоила, амина, аминокарбонила, алкоксикарбонила, арилоксикарбонила, гетероарилоксикарбонила и

гетероциклилоксикарбонила. Когда гетероалкениленовая группа является замещенной, и заместитель связан с углеродом, заместитель выбран из заместителей, описанных для алкила, при условии, что заместитель на атоме углерода, связанный с гетероатомом, не представляет собой гало. В некоторых вариантах осуществления, гетероалкениленовая группа имеет С на каждом конце, присоединенном к другим группам. В некоторых вариантах осуществления, гетероатом представляет собой О или N.

Термин «гетероалкил», в рамках изобретения, относится к алкильной группе, в которой алкильная цепь прервана один раз одним, двумя или тремя гетероатомами; дважды, каждый раз, независимо, одним, двумя или тремя гетероатомами; три раза, каждый раз, независимо, одним, двумя или тремя гетероатомами; или четыре раза, каждый раз, независимо, одним, двумя или тремя гетероатомами. Каждый гетероатом независимо представляет собой О, N или S. Ни одна из гетероалкильных групп не включает более двух смежных атомов кислорода. Гетероалкильная группа может являться незамещенной или замещенной (например, необязательно замещенный гетероалкил). Когда гетероалкильная группа является замещенной, и заместитель связан с гетероатомом, заместитель выбран соответственно. Заместитель, связанный с гетероатомом, как позволяет валентность, выбран из группы, состоящей из: алкила, алканоила, алкенила, алкеноила, алкинила, алкиноила, циклоалкила, циклоалканоила, циклоалкенила, циклоалкеноила, циклоалкинила, циклоалкиноила, арила, арилоила, гетероарила, гетероарилоила, гетероциклила, гетероциклоила, амина, аминокарбонила, алкоксикарбонила, арилоксикарбонила, гетероарилоксикарбонила и гетероциклилоксикарбонила. Когда гетероалкильная группа является замещенной, и заместитель связан с углеродом, заместитель выбран из заместителей, описанных для алкила, при условии, что заместитель на атоме углерода, связанном с гетероатомом, не представляет собой гало. В некоторых вариантах осуществления, гетероалкильная группа имеет С на конце, присоединенном к другой группе. В некоторых вариантах осуществления, гетероатом представляет собой О или N.

Термин «гетероалкилен», в рамках изобретения, относится к алкиленовой группе, в которой алкиленовая цепь прервана один раз одним, двумя или тремя гетероатомами; дважды, каждый раз, независимо, одним, двумя или тремя гетероатомами; три раза, каждый раз, независимо, одним, двумя или тремя гетероатомами; или четыре раза, каждый раз, независимо, одним, двумя или тремя гетероатомами. Каждый гетероатом независимо представляет собой О, N или S. Ни одна из гетероалкиленовых групп не включает более двух смежных атомов кислорода. Гетероалкиленовая группа может являться незамещенной или замещенной (например, необязательно замещенный гетероалкилен). Когда гетероалкиленовая группа является замещенной, и заместитель связан с гетероатомом, заместитель выбран соответственно. Заместитель, связанный с гетероатомом, как позволяет валентность, выбран из группы, состоящей из: алкила, алканоила, алкенила, алкеноила, алкинила, алкиноила, циклоалкила, циклоалканоила, циклоалкенила, циклоалкеноила,

циклоалкинила, циклоалкиноила, арила, арилоила, гетероарила, гетероарилоила, гетероциклила, гетероциклоила, амина, аминокарбонила, алкоксикарбонила, арилоксикарбонила, гетероарилоксикарбонила и гетероциклилоксикарбонила. Когда гетероалкиленовая группа является замещенной, и заместитель связан с углеродом, заместитель выбран из заместителей, описанных для алкилена, при условии, что заместитель на атоме углерода, связанном с гетероатомом, не представляет собой гало. В некоторых вариантах осуществления, гетероалкиленовая группа имеет С на каждом конце, присоединенном к другим группам. В некоторых вариантах осуществления, гетероатом представляет собой О или N.

Термин «гетероалкинил», в рамках изобретения, относится к алкиниловой группе, в которой алкинильная цепь прервана один раз одним, двумя или тремя гетероатомами; дважды, каждый раз, независимо, одним, двумя или тремя гетероатомами; три раза, каждый раз, независимо, одним, двумя или тремя гетероатомами; или четыре раза, каждый раз, независимо, одним, двумя или тремя гетероатомами. Каждый гетероатом независимо представляет собой О, N или S. Ни одна из гетероалкинильных групп не включает более двух смежных атомов кислорода. Гетероалкинильная группа может являться незамещенной или замещенной (например, необязательно замещенный гетероалкинил), как описано для гетероалкенила.

Термин «гетероалкинилен», в рамках изобретения, относится к алкиниленовой группе, в которой алкиниленовая цепь прервана один раз одним, двумя или тремя гетероатомами; дважды, каждый раз, независимо, одним, двумя или тремя гетероатомами; три раза, каждый раз, независимо, одним, двумя или тремя гетероатомами; или четыре раза, каждый раз, независимо, одним, двумя или тремя гетероатомами. Каждый гетероатом независимо представляет собой О, N или S. Ни одна из гетероалкиниленовых групп не включает более двух смежных атомов кислорода. Гетероалкиниленовая группа может являться незамещенной или замещенной (например, необязательно замещенный гетероалкинилен). Гетероалкиниленовая группа может являться незамещенной или замещенной (например, необязательно замещенный гетероалкинилен), как описано для гетероалкенилена.

Термины «гетероароматическая группа» и «гетероарил», в рамках изобретения, относятся к гетероциклической структуре (моноциклический или конденсированной бициклической), удовлетворяющей правилу Хюккеля ($4n+2$ электронов в одной системе π) и таким образом, имеющей характеристики ароматической стабилизации. Исключая гетероатомы из любых заместителей, если они присутствуют, гетероарильная группа содержит один, два, три, или четыре гетероатома, выбранные из группы, состоящей из О, S и N. Гетероарильная группа содержит 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 атомов углерода, исключая атомы углерода из любых заместителей, если они присутствуют. Включение гетероатома позволяет включение 5-членных колец, рассматриваемых как ароматические, так же как 6-членных колец. Таким образом, неограничивающие примеры гетероароматических групп

включают пиридил, пиримидил, индолил, бензимидазолил, бензотриазолил, изохинолил, хинолил, бензотиазолил, бензофуранил, тиенил, фурил, пирролил, тиазолил, оксазолил, изоксазолил, бензоксазолил, бензоизоксазолил и имидазолил. Поскольку таутомеры являются теоретически возможными, фталимидо также рассматривают как ароматический. Как правило, гетероарильные кольцевые системы содержат 5-12 атомов - членов кольца. Например, гетероарильная группа может представлять собой пяти- - двенадцати-членную кольцевую систему. В некоторых вариантах осуществления, гетероароматическая группа представляет собой 6-членную ароматическую кольцевую систему, содержащую 1-2 атома азота. В некоторых вариантах осуществления, гетероарильная группа представляет собой необязательно замещенный пиридил, индолил, пиримидил, пиридазинил, бензотиазолил, бензимидазолил, пиразолил, имидазолил, изоксазолил, тиазолил, бензотиазолил или индолил. В конкретных вариантах осуществления, гетероароматическая группа представляет собой пиридил или пиримидил. Термин «гетероарилен» относится к гетероарильной группе, как описано в настоящем описании, за исключением того, что гетероарилен представляет собой двухвалентный заместитель.

Термин «гетероарилалкилтио», в рамках изобретения, представляет собой химический заместитель формулы $-SR$, где R представляет собой гетероарилалкильную группу. В некоторых вариантах осуществления, гетероарилалкил группа может являться дополнительно замещенной 1, 2, 3 или 4 группами заместителей, как описано в настоящем описании.

Термин «гетероарилсульфинил» относится к группе, имеющей структуру гетероарил-S(O)-, в которой гетероарил является таким, как описано в настоящем описании. Гетероарилсульфинильная группа может являться незамещенной или замещенной, как описано в настоящем описании.

Термин «гетероарилсульфонил» относится к группе, имеющей структуру гетероарил-S(O)₂-, в которой гетероарил является таким, как описано в настоящем описании. Гетероарилсульфонильная группа может являться незамещенной или замещенной, как описано в настоящем описании.

Термин «гетероарилтио» относится к группе, имеющей структуру гетероарил-S-, в которой гетероарил является таким, как описано в настоящем описании. Гетероарилтио-группа может являться незамещенной или замещенной, как описано в настоящем описании.

Термин «гетероциклил», в рамках изобретения, представляет собой циклический гетероалкил или гетероалкенил, то есть, например, 3-, 4-, 5-, 6- или 7-членное кольцо, если не указано иное. Исключая гетероатомы из любых заместителей, если они присутствуют, гетероциклическая группа содержит один, два, три, или четыре гетероатома, выбранные из группы, состоящей из O, S и N. Гетероциклическая группа содержит, если не указано иное, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 атомов углерода (например, C₁-C₉ гетероциклил), исключая атомы углерода из любых заместителей, если они присутствуют. Сера может быть включена как двухвалентная сера (-S-), четырехвалентная сера (-S(=O)-) или шестивалентная сера (-

S(=O)₂-). 5-членное кольцо имеет от нуля до двух двойных связей, и 6- и 7-членные кольца имеют от нуля до трех двойных связей. Термин «гетероциклил» также представляет собой гетероциклическое соединение, имеющее соединенную мостиком мультициклическую структуру, в которой один или несколько атомов углерода и/или гетероатомов соединяют мостиком два несмежных члена моноциклического кольца, например, хинуклидинильную группу. Термин «гетероциклил» включает бициклические, трициклические и тетрациклические группы, в котором любое из вышеуказанных гетероциклических колец конденсировано с одним, двумя или тремя карбоциклическими кольцами, например, арильным кольцом, циклогексановым кольцом, циклогексеновым кольцом, циклопентановым кольцом, циклопентеновым кольцом, или другим моноциклическим гетероциклическим кольцом, таким как индолил, хинолил, изохинолил, тетрагидрохинолил, бензофурил, бензотиенил и т.п. Иллюстративные гетероциклы включают пирролил, пирролинил, пирролидинил, пиразолил, пиразолинил, пиразолидинил, имидазолил, имидазолинил, имидазолидинил, пиридил, пиперидинил, гомопиперидинил, пиразинил, пиперазинил, пиримидинил, пиридазинил, оксазолил, оксазолидинил, изоксазолил, изоксазолидинил, морфолинил, тиоморфолинил, тиазолил, тиазолидинил, изотиазолил, изотиазолидинил, индолил, хинолинил, изохинолинил, бензимидазолил, бензотиазолил, бензоксазолил, фурил, тиенил, тиазолидинил, изотиазолил, изоиндазоил, триазолил, тетразолил, оксадиазолил, пуридил, тиадиазолил (например, 1,3,4-тиадиазол), тетрагидрофуранил, дигидрофуранил, тетрагидротиенил, дигидротиенил, дигидроиндолил, тетрагидрохинолил, тетрагидроизохинолил, пиранил, дигидропиранил, дитиазолил, бензофуранил, бензотиенил и т.п. Другие иллюстративные гетероциклилы включают: 2,3,4,5-тетрагидро-2-оксо-оксазолил; 2,3-дигидро-2-оксо-1H-имидазолил; 2,3,4,5-тетрагидро-5-оксо-1H-пиразолил (например, 2,3,4,5-тетрагидро-2-фенил-5-оксо-1H-пиразолил); 2,3,4,5-тетрагидро-2,4-диоксо-1H-имидазолил (например, 2,3,4,5-тетрагидро-2,4-диоксо-5-метил-5-фенил-1H-имидазолил); 2,3-дигидро-2-тиоксо-1,3,4-оксадиазолил (например, 2,3-дигидро-2-тиоксо-5-фенил-1,3,4-оксадиазолил); 4,5-дигидро-5-оксо-1H-триазолил (например, 4,5-дигидро-3-метил-4-амино 5-оксо-1H-триазолил); 1,2,3,4-тетрагидро-2,4-диоксопиридинил (например, 1,2,3,4-тетрагидро-2,4-диоксо-3,3-диэтилпиридинил); 2,6-диоксо-пиперидинил (например, 2,6-диоксо-3-этил-3-фенилпиперидинил); 1,6-дигидро-6-оксопиридинил; 1,6-дигидро-4-оксопиримидинил (например, 2-(метилтио)-1,6-дигидро-4-оксо-5-метилпиримидин-1-ил); 1,2,3,4-тетрагидро-2,4-диоксопиримидинил (например, 1,2,3,4-тетрагидро-2,4-диоксо-3-этилпиримидинил); 1,6-дигидро-6-оксо-пиридазинил (например, 1,6-дигидро-6-оксо-3-этилпиридазинил); 1,6-дигидро-6-оксо-1,2,4-триазинил (например, 1,6-дигидро-5-изопропил-6-оксо-1,2,4-триазинил); 2,3-дигидро-2-оксо-1H-индолил (например, 3,3-диметил-2,3-дигидро-2-оксо-1H-индолил и 2,3-дигидро-2-оксо-3,3'-спиропропан-1H-индол-1-ил); 1,3-дигидро-1-оксо-2H-изо-индолил; 1,3-дигидро-1,3-диоксо-2H-изо-индолил; 1H-бензопиразолил (например, 1-(этоксикарбонил)- 1H-бензопиразолил); 2,3-дигидро-2-оксо-1H-бензимидазолил

(например, 3-этил-2,3-дигидро-2-оксо-1*H*-бензимидазол); 2,3-дигидро-2-оксо-бензоксазол (например, 5-хлор-2,3-дигидро-2-оксо-бензоксазол); 2,3-дигидро-2-оксо-бензоксазол; 2-оксо-2*H*-бензопиран; 1,4-бензодиоксан; 1,3-бензодиоксан; 2,3-дигидро-3-оксо-4*H*-1,3-бензотиазин; 3,4-дигидро-4-оксо-3*H*-хиназолин (например, 2-метил-3,4-дигидро-4-оксо-3*H*-хиназолин); 1,2,3,4-тетрагидро-2,4-диоксо-3*H*-хиназол (например, 1-этил-1,2,3,4-тетрагидро-2,4-диоксо-3*H*-хиназол); 1,2,3,6-тетрагидро-2,6-диоксо-7*H*-пурин (например, 1,2,3,6-тетрагидро-1,3-диметил-2,6-диоксо-7*H*-пурин); 1,2,3,6-тетрагидро-2,6-диоксо-1*H*-пурин (например, 1,2,3,6-тетрагидро-3,7-диметил-2,6-диоксо-1*H*-пурин); 2-оксобенз[*c, d*]индол; 1,1-диоксо-2*H*-нафт[1,8-*c, d*]изотиазол; и 1,8-нафтилендикарбоксамида. Гетероциклическая группа может являться незамещенной или замещенной (например, необязательно замещенный гетероцикл). Термин «гетероциклическая группа» относится к гетероциклической группе, как описано в настоящем описании, за исключением того, что гетероциклическая группа представляет собой двухвалентный заместитель.

Термин «гетероциклокси», в рамках изобретения, относится к группе, имеющей структуру (C₁-C₉ гетероцикл)-O-. Гетероциклокси может являться незамещенным или замещенным (например, необязательно замещенный гетероциклокси), в соответствии с определением гетероцикла.

Термин «гетероциклоил», в рамках изобретения, относится к группе, имеющей структуру (C₁-C₉ гетероцикл)-C(O). Гетероциклоил может являться незамещенным или замещенным (например, необязательно замещенный гетероциклоил), в соответствии с определением гетероцикла.

Термин «гетероциклоилокси», в рамках изобретения, относится к группе, имеющей структуру (C₁-C₉ гетероцикл)-C(O)-O-. Гетероциклоилокси может являться незамещенным или замещенным (например, необязательно замещенный гетероциклоилокси), в соответствии с определением гетероцикла.

Термин «гетероциклсульфинил» относится к группе, имеющей структуру гетероцикл-S(O)-, в которой гетероцикл является таким, как описано в настоящем описании. Гетероциклсульфинильная группа может являться незамещенной или замещенной, как описано в настоящем описании.

Термин «гетероциклсульфонил» относится к группе, имеющей структуру гетероцикл-S(O)₂-, в которой гетероцикл является таким, как описано в настоящем описании. Гетероциклсульфонильная группа может являться незамещенной или замещенной, как описано в настоящем описании.

Термин «гетероциклтио» относится к группе, имеющей структуру гетероцикл-S-, в которой гетероцикл является таким, как описано в настоящем описании. Гетероциклтио-группа может являться незамещенной или замещенной, как описано в настоящем описании.

Термин «гидрокси», в рамках изобретения, представляет собой -ОН-группу.

Термин «гидроксиалкил», в рамках изобретения, представляет собой алкильную группу, как определено в настоящем описании, замещенную от одной до трех гидроксигрупп, при условии, что не более одной гидроксигруппы может быть присоединено к одному атому углерода алкильной группы, и его примерами являются гидроксиметил, дигидроксипропил и т.п.

Термин «нитро», в рамках изобретения, относится к группе $-\text{NO}_2$.

Термин «*n*-членное кольцо», в котором *n* представляет собой 5, 6, 7 или 8, в рамках изобретения, относится к карбоциклической или гетероциклической структуре, которая может являться ароматической или неароматической. Когда *n*-членное кольцо является карбоциклическим ароматическим, оно подлежит определению как ароматическая группа. Когда *n*-членное кольцо является карбоциклическим неароматическим, оно подлежит определению как циклоалкилен. Когда *n*-членное кольцо является гетероциклическим ароматическим, оно подлежит определению как гетероарилен. Когда *n*-членное кольцо является гетероциклическим неароматическим, оно подлежит определению как гетероциклилен. *n*-членное кольцо может являться незамещенным или замещенным (например, необязательно замещенное *n*-членное кольцо), в соответствии с соответствующим определением, представленным в настоящем описании, если не указано иное. В некоторых вариантах осуществления, *n*-членное кольцо может являться замещенным 1, 2, 3, 4 или 5 заместителями, где каждый заместитель независимо выбран из группы, состоящей из H, гало, гидроксигруппы, необязательно замещенного амина, необязательно замещенного амидо, тиол, циано, необязательно замещенного $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкила, необязательно замещенного $\text{C}_2\text{-C}_6$ алкенила, необязательно замещенного $\text{C}_2\text{-C}_6$ алкинила, необязательно замещенного $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкокси, необязательно замещенного $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ арилокси, необязательно замещенного $\text{C}_1\text{-C}_9$ гетероарилокси, необязательно замещенного $\text{C}_2\text{-C}_6$ алканоила, необязательно замещенного $\text{C}_7\text{-C}_{11}$ арилоила, необязательно замещенного $\text{C}_2\text{-C}_{10}$ гетероарилоила, необязательно замещенного $\text{C}_2\text{-C}_{10}$ гетероциклилоила, гидроксикарбонила, необязательно замещенного сложного эфира, необязательно замещенного карбоксамида, необязательно замещенного $\text{C}_1\text{-C}_6$ алканоилокси, необязательно замещенного $\text{C}_7\text{-C}_{11}$ арилоилокси, необязательно замещенного $\text{C}_2\text{-C}_{10}$ гетероарилоилокси, необязательно замещенного $\text{C}_2\text{-C}_{10}$ гетероциклилоилокси, необязательно замещенного $\text{C}_1\text{-C}_6$ тиоалкила, необязательно замещенного $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкилсульфинила, необязательно замещенного $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкилсульфонила, необязательно замещенного $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ арилтио, необязательно замещенного $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ арилсульфинила, необязательно замещенного $\text{C}_6\text{-C}_{10}$ арилсульфонила, необязательно замещенного $\text{C}_1\text{-C}_9$ гетероарилтио, необязательно замещенного $\text{C}_1\text{-C}_9$ гетероарилсульфинила, необязательно замещенного $\text{C}_1\text{-C}_9$ гетероарилсульфонила, необязательно замещенного $\text{C}_1\text{-C}_9$ гетероциклилсульфинила, необязательно замещенного $\text{C}_1\text{-C}_9$ гетероциклилсульфонила, необязательно замещенного сульфамоида, необязательно замещенного $\text{C}_1\text{-C}_6$ гетероалкила, необязательно замещенного $\text{C}_2\text{-C}_6$ гетероалкенила, необязательно замещенного $\text{C}_2\text{-C}_6$

гетероалкинила, необязательно замещенного C_3-C_{10} циклоалкила, необязательно замещенного C_4-C_{10} циклоалкенила, необязательно замещенного C_8-C_{10} циклоалкинила, необязательно замещенного C_6-C_{10} арила, необязательно замещенного C_6-C_{10} арил C_1-C_6 алкила, необязательно замещенного C_6-C_{10} арил C_2-C_6 алкенила, необязательно замещенного C_6-C_{10} арил C_2-C_6 алкинила, необязательно замещенного C_1-C_9 гетероарила, необязательно замещенного C_1-C_9 гетероарил C_1-C_6 алкила, необязательно замещенного C_1-C_9 гетероарил C_2-C_6 алкенила, необязательно замещенного C_1-C_9 гетероарил C_2-C_6 алкинила, необязательно замещенного C_1-C_9 гетероциклила, необязательно замещенного C_1-C_9 гетероциклил C_1-C_6 алкила, необязательно замещенного C_1-C_9 гетероциклил C_2-C_6 алкенила и необязательно замещенного C_1-C_9 гетероциклил C_2-C_6 алкинила.

«Оксо»-группа представляет собой двухвалентный заместитель, состоящий из атома кислорода, например, =O.

Термин «фармацевтически приемлемая соль», в рамках изобретения, представляет соли, которые, в рамках обоснованного врачебного решения, пригодны для использования в контакте с тканями человека и животных без избыточной токсичности, раздражения, аллергического ответа и т.п., и являются сообразными с целесообразным соотношением польза/риск. Фармацевтически приемлемые соли хорошо известны в данной области. Например, S. M. Berge et al. подробно описали фармацевтически приемлемые соли в *J. Pharm. Sci.* 66:1-19, 1977. Соли можно получать *in situ* в ходе конечного выделения и очистки соединений по настоящему изобретению или отдельно посредством реакции группы свободного основания с подходящей органической кислотой. Репрезентативные кислотно-аддитивные соли включают соли ацетат, адипат, альгинат, аскорбат, аспартат, бензолсульфонат, бензоат, бисульфат, борат, бутират, камфорат, камферсульфонат, цитрат, циклопентанпропионат, диглюконат, додецилсульфат, этансульфонат, фумарат, глюкогептонат, глицерофосфат, гемисульфат, гептонат, гексаноат, гидробромид, гидрохлорид, гидроиодид, 2-гидроксиэтансульфонат, лактобионат, лактат, лаурат, лаурилсульфат, малат, малеат, малонат, метансульфонат, 2-нафталинсульфонат, никотинат, нитрат, олеат, оксалат, пальмитат, памоат, пектинат, персульфат, 3-фенилпропионат, фосфат, пикрат, пивалат, пропионат, стеарат, сукцинат, сульфат, тартрат, тиоцианат, толуолсульфонат, ундеканоат, валерат и т.п. Репрезентативные соли щелочных или щелочноземельных металлов включают катионы натрия, лития, калия, кальция, магния и т.п., так же как нетоксичные катионы аммония, четвертичного аммония и амина, включая, но без ограничения, аммоний, тетраметиламмоний, тетраэтиламмоний, метиламмоний, диметиламмоний, триметиламмоний, триэтиламмоний, этиламмоний и т.п.

Термин «защитная группа», в рамках изобретения, представляет собой группу, предназначенную для защиты функциональной группы (например, гидрокси, amino или карбонила) от участия в одной или нескольких нежелательных реакциях в ходе химического синтеза (например, полинуклеотидного синтеза). Термин «O-защитная группа», в рамках изобретения, представляет собой группу, предназначенную для защиты

содержащей кислород (например, фенольной, гидроксильной или карбонильной) группы от участия в одной или нескольких нежелательных реакциях в ходе химического синтеза. Термин «*N*-защитная группа», в рамках изобретения, представляет собой группу, предназначенную для защиты содержащей азот (например, амино- или гидразиновой) группы от участия в одной или нескольких нежелательных реакциях в ходе химического синтеза. Общепринятые *O*- и *N*-защитные группы описаны в Greene, «Protective Groups in Organic Synthesis», 3rd Edition (John Wiley & Sons, New York, 1999), содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки. Иллюстративные *O*- и *N*-защитные группы включают ацильные, арилоильные или карбамильные группы, такие как формил, ацетил, пропионил, пивалоил, *t*-бутилацетил, 2-хлорацетил, 2-бромацетил, трифторацетил, трихлорацетил, фталил, *o*-нитрофеноксиацетил, α -хлорбутирил, бензоил, 4-хлорбензоил, 4-бромбензоил, *m*-бутилдиметилсилил, три-*изо*-пропилсилилоксиметил, 4,4'-диметокситритил, изобутирил, феноксиацетил, 4-изопропилфеноксиацетил, диметилформамино и 4-нитробензоил.

Иллюстративные *O*-защитные группы для защиты содержащих карбонил групп, включают, но без ограничения: ацетали, ацилалы, 1,3-дитианы, 1,3-диоксаны, 1,3-диоксоланы и 1,3-дитиоланы.

Другие *O*-защитные группы включают, но без ограничения: замещенные алкиловые, ариловые и арил-алкиленовые эфиры (например, тритил; метилтиометил; метоксиметил; бензилоксиметил; силоксиметил; 2,2,2-трихлорэтоксиметил; тетрагидропиранил; тетрагидрофуранил; этоксиэтил; 1-[2-(триметилсилил)этокси]этил; 2-триметилсилилэтил; *t*-бутиловый эфир; *p*-хлорфенил, *p*-метоксифенил, *p*-нитрофенил, бензил, *p*-метоксибензил, и нитробензил); силиловые эфиры (например, триметилсилил; триэтилсилил; триизопропилсилил; диметилизопропилсилил; *t*-бутилдиметилсилил; *t*-бутилдифенилсилил; трибензилсилил; трифенилсилил; и дифенилметилсилил); карбонаты (например, метил, метоксиметил, 9-флуоренилметил; этил; 2,2,2-трихлорэтил; 2-(триметилсилил)этил; винил, аллил, нитрофенил; бензил; метоксибензил; 3,4-диметоксибензил; и нитробензил).

Другие *N*-защитные группы включают, но без ограничения, хиральные вспомогательные реагенты, такие как защищенные или незащищенные *D*, *L* или *D*, *L*-аминокислоты, такие как аланин, лейцин, фенилаланин и т.п.; содержащие сульфонил группы, такие как бензолсульфонил, *p*-толуолсульфонил, и т.п.; формирующие карбамат группы, такие как бензилоксикарбонил, *p*-хлорбензилоксикарбонил, *p*-метоксибензилоксикарбонил, *p*-нитробензилоксикарбонил, 2-нитробензилоксикарбонил, *p*-бромбензилоксикарбонил, 3,4-диметоксибензилоксикарбонил, 3,5-диметоксибензилоксикарбонил, 2,4-диметоксибензилоксикарбонил, 4-метоксибензилоксикарбонил, 2-нитро-4,5-диметоксибензилоксикарбонил, 3,4,5-триметоксибензилоксикарбонил, 1-(*p*-бифенилил)-1-метилэтоксикарбонил, α,α -диметил-3,5-диметоксибензилоксикарбонил, бензгидрилоксикарбонил, *t*-бутилоксикарбонил,

диизопропилметоксикарбонил, изопропилоксикарбонил, этоксикарбонил, метоксикарбонил, аллилоксикарбонил, 2,2,2,-трихлорэтоксикарбонил, феноксикарбонил, 4-нитрофеноксикарбонил, флуоренил-9-метоксикарбонил, циклопентилоксикарбонил, адамантилоксикарбонил, циклогексилоксикарбонил, фенилтиокарбонил, и т.п., арил-алкиленовые группы, такие как бензил, трифенилметил, бензилоксиметил, и т.п., и силиловые группы, такие как триметилсилил и т.п. Полезные *N*-защитные группы представляют собой формил, ацетил, бензоил, пивалоил, *t*-бутилацетил, аланил, фенилсульфонил, бензил, *t*-бутилоксикарбонил (Boc) и бензилоксикарбонил (Cbz).

Термин «сульфамоил», в рамках изобретения, относится к группе, имеющей структуру $-SO_2-N(R^{N1})_2$, где каждый R^{N1} независимо представляет собой H, алкил, алкенил, алкинил, арил, арилалкил, циклоалкил, циклоалкилалкил, гетероциклил (например, гетероарил), гетероциклилалкил (например, гетероарилалкил), или два R^{N1} объединяются с формированием гетероциклила. Сульфамоильная группа может являться незамещенной, когда каждый R^{N1} представляет собой H, или замещенной, когда по меньшей мере один R^{N1} не представляет собой H (например, необязательно замещенный сульфамоил). В предпочтительном варианте осуществления, сульфамоил представляет собой $-SO_2NH_2$ или $-SO_2NHR^{N1}$, где R^{N1} независимо представляет собой алкил, арил, арилалкил, циклоалкил, циклоалкилалкил, гетероциклил (например, гетероарил), гетероциклилалкил (например, гетероарилалкил).

Термин «тиоалкил», в рамках изобретения, представляет собой химический заместитель формулы $-SR$, где R представляет собой алкильную группу. В некоторых вариантах осуществления, алкильная группа может являться дополнительно замещенной 1, 2, 3 или 4 группами заместителей, как описано в настоящем описании.

Термин «тиол» представляет собой группу $-SH$.

Типичные необязательные заместители на ароматических или гетероароматических группах независимо включают гало (например, F, Cl, Br или I), необязательно замещенный алкил, необязательно замещенный алкенил, необязательно замещенный алкинил, необязательно замещенный циклоалкил, необязательно замещенный циклоалкенил, необязательно замещенный циклоалкинил, CN, NO₂, CF₃, OCF₃, COOR', CONR'₂, OR', SR', SOR', SO₂R', NR'₂, NR'(CO)R', NR'C(O)OR', NR'C(O)NR'₂, NR'SO₂NR'₂ или NR'SO₂R', где каждый R' независимо представляет собой H или необязательно замещенную группу, выбранную из алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, циклоалкенила, циклоалкинила, гетероалкила, гетероалкенила, гетероалкинила, гетероарила и арила (все как определено выше); или заместитель может представлять собой необязательно замещенную группу, выбранную из алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, циклоалкенила, циклоалкинила, гетероалкила, гетероалкенила, гетероалкинила, арила, гетероарила, O-арила, O-гетероарила и арилалкила.

Если не указано иное, типичные необязательные заместители на неароматических группах включают, независимо, гало (например, F, Cl, Br или I), CN, NO₂, CF₃, OCF₃,

COOR', CONR'₂, OR', SR', SOR', SO₂R', NR'₂, NR'(CO)R', NR'C(O)OR', NR'C(O)NR'₂, NR'SO₂NR'₂ или NR'SO₂R', где каждый R' независимо представляет собой H или необязательно замещенную группу, выбранную из алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, циклоалкенила, циклоалкинила, гетероалкила, гетероалкенила, гетероалкинила, гетероарила и арила (все как определено выше); или заместитель может представлять собой необязательно замещенную группу, выбранную из алкила, алкенила, алкинила, циклоалкила, циклоалкенила, циклоалкинила, гетероалкила, гетероалкенила, гетероалкинила, арила, гетероарила, O-арила, O-гетероарила и арилалкила. Неароматическая группа может также включать заместитель, выбранный из =O и =NOR', где R' представляет собой H или необязательно замещенную группу, выбранную из алкила, алкенила, алкинила, гетероалкила, гетероалкенила, гетероалкинила, гетероарила и арила (все как определено выше).

Как правило, группа заместителя (например, алкил, алкенил, алкинил, или арил (включая все гетероформы, определенные выше) сама может являться необязательно замещенной дополнительными заместителями. Характер этих заместителей является сходным с заместителями, перечисленными применительно к заместителям на основных структурах выше. Таким образом, где вариант осуществления заместителя представляет собой алкил, этот алкил может являться необязательно замещенным остальными заместителями, перечисленными в качестве заместителей, где это имеет химический смысл, и где это не нарушает предела размера самого алкила; например, алкил, замещенный алкилом или алкенилом, просто может превышать верхний предел количества атомов углерода для этих вариантов осуществления, и не включен. Однако, алкил, замещенный арилом, амино, гало и т.п., может быть включен. Например, где группа является замещенной, группа может являться замещенной 1, 2, 3, 4, 5 или 6 заместителями. Необязательные заместители включают, но без ограничения: C1-C6 алкил или гетероалкил, C2-C6 алкенил или гетероалкенил, C2-C6 алкинил или гетероалкинил, галоген; арил, гетероарил, азидо(-N₃), нитро (-NO₂), циано (-CN), ацилокси(-OC(=O)R'), ацил (-C(=O)R'), алкокси (-OR'), амидо (-NR'C(=O)R''), карбоксамид (например, -C(=O)NRR'), амино (-NRR'), карбоновую кислоту (-CO₂H), карбоновый сложный эфир (-CO₂R'), карбамоил (-OC(=O)NR'R'' или -NRC(=O)OR'), гидроксид (-OH), изоциано (-NC), сульфат (-S(=O)₂OR), сульфонамид (-S(=O)₂NRR' или -NRS(=O)₂R'), или сульфонил (-S(=O)₂R), где каждый R или R' выбран, независимо, из H, C1-C6 алкила или гетероалкила, C2-C6 алкенила или гетероалкенила, C2-C6 алкинила или гетероалкинила, арила или гетероарила. Замещенная группа может иметь, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или 9 заместителей.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к группам, представляющим собой аминокислотные остатки. Аминокислотный остаток может представлять собой природную аминокислоту (например, Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr или Val), или аминокислотный остаток может представлять собой не природную аминокислоту.

«Неприродная аминокислота» представляет собой аминокислоту, которая не продуцирована или не обнаружена у млекопитающего в природе. Примеры неприродных аминокислот включают D-аминокислоты; аминокислоту, имеющую ацетиламинотетильную группу, присоединенную к атому серы цистеина; пэгилированную аминокислоту; омега-аминокислоты формулы $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$ где n представляет собой 2-6, нейтральные неполярные аминокислоты, такие как саркозин, т-бутилаланин, т-бутилглицин, N-метилизолейцин и норлейцин; фенилглицин; цитруллин; метионинсульфоксид; цистеиновую кислоту; орнитин; и гидроксипролин.

Ингибирующие антитела против GPR174

В конкретных вариантах осуществления, ингибирующее GPR174 соединение представляет собой антитело или фрагмент антитела, связывающие GPR174. В конкретных вариантах осуществления, антитело против GPR174 или связывающий фрагмент рецептора связывается с эпитопом, связываемым любым из соединений, идентифицированным в настоящем описании. Такие антитела включают поликлональные, моноклональные и рекомбинантные антитела, происходящие из любого продуцирующего антитела позвоночного, и могут представлять собой мультиспецифические, химерные, гуманизированные, антиидиотипические антитела и фрагменты антител. Фрагменты антител включают Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, фрагменты Fv, фрагменты scFv и одноцепочечные антитела.

Ингибирующие антитела против GPR174 можно получать с использованием любых способов, известных в данной области. Поликлональные антитела, например, можно получать посредством иммунизации животного полипептидом GPR174 или его иммуногенной частью. Ингибирующие GPR174 моноклональные антитела включают не только интактные моноклональные антитела и полноразмерные моноклональные антитела, но также их фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), одноцепочечные антитела (ScFv), их варианты, слитые белки, включающие антигенсвязывающую часть, гуманизированные моноклональные антитела, химерные моноклональные антитела, и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенсвязывающий фрагмент (узнающий эпитоп участок) требуемой специфичности и имеет способность связывать эпитоп. Это не является ограничивающим применительно к источнику антитела или способу, которым оно получено (например, посредством гибридомы, отбора фагов, рекомбинантной экспрессии, трансгенных животных и т.д.). Термин включает полноразмерные иммуноглобулины, так же как фрагменты и т.д., описанные выше под определением «антитело».

Ингибирующие GPR174 моноклональные антитела можно получать из наивных или иммунизированных животных, или происходящих из них линий клеток В-лимфоцитов с использованием хорошо известной технологии гибридомы, или посредством скрининга популяций культивированных или иммортализованных клеток от этих животных. Моноклональные антитела можно получать напрямую из отобранных гибридом или можно

получать рекомбинантным способом. Гуманизированные моноклональные антитела получают посредством переноса не относящихся к человеку (например, мышинных) определяющих комплементарность областей (CDR) из тяжелых и легких переменных цепей иммуноглобулина мыши в человеческий переменный домен. Человеческие моноклональные антитела можно также получать посредством использования трансгенных мышей, сконструированных для продукции специфических человеческих антител в ответ на антигенную стимуляцию. Кроме того, человеческие моноклональные антитела можно получать посредством скрининга культивированных В-лимфоцитов человека или скрининга библиотек человеческих антител, экспонированных в различных контекстах, включая фаги, дрожжи или клетки позвоночных. Гуманизированные или полностью человеческие антитела, специфические для GPR101 человека, состоящие из изотипов IgG2 или IgG4, можно получать одним из нескольких способов, известных специалисту в данной области, как описано в Vaughan et al., *Nature Biotechnical* 16:535-539, 1998.

Образование антител против GPR174 можно индуцировать с использованием полипептидов GPR174 (например, полноразмерного GPR174 человека, указанного как SEQ ID NO:1) или с использованием несущих антигенный эпитоп GPR174 пептидов (например, части полипептида GPR174). Иммуногенные пептиды могут являться настолько малыми, как пять аминокислотных остатков. Например, полипептид GPR174, включающий полную аминокислотную последовательность из SEQ ID NO:1, можно использовать для индукции образования антител против GPR174, которые можно использовать в способе по настоящему изобретению. Конкретные домены GPR174, как известно, вовлеченные во взаимодействия рецептор-лиганд, можно экспрессировать в форме рекомбинантных полипептидов и использовать в качестве антигенов. Кроме того, пептиды, включающие часть из по меньшей мере 6 аминокислот из полипептида GPR174 (SEQ ID NO:1), также можно использовать для индукции образования антител против GPR174. Пептиды и полипептиды GPR174, использованные для индукции образования антител, можно выделять в форме природных, рекомбинантных или синтетических полипептидов.

Антигены, которые можно использовать для индукции образования антител против GPR174, включают также слитые полипептиды, такие как продукты слияния GPR174 или его части с полипептидом иммуноглобулина или со связывающим мальтозу белком. Полипептидный иммуноген может представлять собой полноразмерную молекулу или ее часть. Если часть полипептида является подобной гаптену, такая часть может быть преимущественно соединена или связана с макромолекулярным носителем (таким как гемоцианин морского блюдечка (KLH), бычий сывороточный альбумин (BSA), или токсин столбняка) для иммунизации.

Антигены GPR174 могут также включать полипептид или его часть, представленные внутри липидной мембраны или детергента. Как сопряженный с G-белком рецептор, GPR174 содержит семь гидрофобных трансмембранных доменов, которые делают белок труднорастворимым в водном окружении. Можно принимать различные способы для

адаптации к гидрофобному характеру GPR174. Например, такие способы включают иммунизацию животного или скрининг библиотеки антител с использованием гидрофильных субдоменов рецептора в водных растворах. Альтернативно, иммуногены, включающие полноразмерный белок или субдомены, содержащие гидрофобные фрагменты, можно солубилизовать в детергенте, или можно представлять животному или библиотеке антител в мембране цельных клеток, модифицированных для сверхэкспрессии белка, или в препаратах мембраны или экзосомах, происходящих из таких клеток, или в липосомах.

В некоторых вариантах осуществления, ингибирующее GPR174 соединение представляет собой моноклональное антитело против GPR174. Моноклональные антитела против GPR174 являются высоко специфическими, будучи направленными против единичного эпитопа GPR174. В рамках изобретения, определение «моноклональные» указывает на характер антитела, как полученного из по существу гомогенной популяции антител, и не подразумевает необходимость получения антитела каким-либо конкретным способом. Моноклональные антитела можно получать с использованием любого способа, который обеспечивает продукцию молекул антител в культуре стабильных клеточных линий, такого как способ гибридомы, описанный в Kohler et al., *Nature* 256:495, 1975, или их можно получать способами рекомбинантной ДНК (см., например, Патент США No. 4816567 от Cabilly). Моноклональные антитела можно также выделять из фаговых библиотек антител с использованием способов, описанных в Clackson et al., *Nature* 352:624 8, 1991, и Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581 97, 1991. Такие антитела могут принадлежать к любому классу иммуноглобулинов, включая IgG, IgM, IgE, IgA, IgD, и к любому их подклассу.

Например, моноклональные антитела можно получать посредством инъекции подходящему млекопитающему (например, мыши BALB/c) композиции, содержащей полипептид GPR174 или его часть. После предопределенного периода времени, у мыши выделяют спленоциты и ресуспендируют их в культуральной среде. Затем спленоциты сливают с иммортализованной линией клеток для формирования гибридомы. Сформированные гибридомы выращивают в культуре клеток и подвергают скринингу по их способности продуцировать моноклональное антитело против GPR174. (См. также *Current Protocols in Immunology*, Vol. 1., John Wiley & Sons, pages 2.5.1 2.6.7, 1991.)

Ряд способов дисплея *ex vivo* разработаны для обнаружения человеческих или не относящихся к человеку моноклональных антител. В таких способах, полинуклеотидные библиотеки антител получают посредством клонирования репертуара тяжелых и легких цепей природного или синтетического иммуноглобулина в векторы, содержащие элементы для экспрессии в хозяине, такие как энхансер и промотор для транскрипции, и сигнальная последовательность полиаденилирования, так же как полинуклеотидную последовательность, кодирующую домен, такой как белок поверхности фага или трансмембранный домен, для обеспечения экспрессии антитела на поверхности хозяина.

Библиотеку антител вводят в клетки-хозяева посредством таких способов как трансфекция, трансдукция или сайт-специфическое геномное нацеливание. Способы, такие как вышеупомянутые, использовали для экспонирования библиотек антител на фаге (см., например, Clackson et al., *Nature* 352:624-8, 1991; Marks et al., *J Mol Biol* 222:581-97, 1991), дрожжах (см., например, Barnard et al., *J Ind Microbiol Biotechnol* 37:961-71, 2010), клетках млекопитающих (см., например, Bowers et al., *PNAS* 108:20455-60, 2011) и кур (см., например, Yabuki et al. *PLoS One* 7:e36032, 2012). Моноклональные антитела можно выделять и очищать из культур гибридом посредством множества хорошо разработанных способов. Такие способы выделения включают аффинную хроматографию с использованием сефарозы с белком А, эксклюзионной хроматографии и ионообменной хроматографии (см., например, Coligan at pages 2.7.1-2.7.12 и pages 2.9.1-2.9.3; Baines et al., «Purification of Immunoglobulin G (IgG)», in *Methods in Molecular Biology*, The Humana Press, Inc., Vol. 10, pages 79 104, 1992).

После получения, поликлональные, моноклональные или полученные с использованием фагов антитела сначала тестируют по специфическому связыванию с GPR174. Множество анализов, известных специалисту в данной области, можно использовать для детекции антител, специфически связывающихся с GPR174. Иллюстративные анализы включают анализ вестерн-блоттинга или иммунопреципитации посредством стандартных способов (например, как описано в Ausubel et al.), иммуноэлектрофорез, ферментные иммуносорбентные анализы, виды дот-блоттинга, анализы ингибирования или конкуренции, и сэндвич-анализы (как описано в Harlow and Land, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988). После идентификации антител, которые специфически связываются с GPR174, антитела тестируют по способности функционировать в качестве ингибирующего GPR174 соединения в одном из нескольких анализов, например, таких как описанные в настоящем описании.

Химерные/гуманизированные антитела

Ингибирующие GPR174 моноклональные антитела, которые можно использовать в способе по изобретению, включают химерные антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи является идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям в антителах, полученных из конкретных видов или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, в то время, как остальная часть цепи(цепей) является идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям в антителах, полученных из других видов или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, так же как фрагменты таких антител (Патент США No. 4816567, от Cabilly; и Morrison, S.L., et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 81:6851 6855, (1984)). Одной из форм химерного антитела, которое можно использовать по настоящему изобретению, является гуманизированное моноклональное антитело против GPR174. Гуманизированные формы не относящихся к человеку (например, мышинных) антител представляют собой

химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, происходящую из не относящегося к человеку иммуноглобулина. Гуманизированные моноклональные антитела получают посредством переноса не относящихся к человеку (например, мышинных) определяющих комплементарность областей (CDR), из тяжелых и легких переменных цепей иммуноглобулина мыши в человеческий переменный домен. Как правило, затем проводят замены на остатки человеческих антител в каркасных областях не относящихся к человеку эквивалентов. Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, не обнаруженные в реципиентном антителе или в донорном антителе. Эти модификации осуществляют для дополнительного уточнения активности антитела. Как правило, гуманизированное антитело содержит в основном все из по меньшей мере одного, и как правило, двух переменных доменов, в которых все или в основном все из гиперпеременных петель соответствуют петлям из не относящегося к человеку иммуноглобулина, и все или в основном все из каркасных областей Fv представляют собой области из последовательности человеческого иммуноглобулина. Гуманизированное антитело, необязательно, содержит также по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, из человеческого иммуноглобулина. Дополнительные подробности, см. в Jones, P.T., et al., *Nature* 321:522-525, (1986); Reichmann, L., et al., *Nature* 332:323-329, (1988); и Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596, (1992).

Гуманизированные антитела, которые можно использовать по изобретению, включают человеческие моноклональные антитела, содержащие по меньшей мере связывающую GPR174 область CDR3. Кроме того, части Fc можно заменять таким образом, чтобы получать IgA или IgM, так же как человеческие антитела IgG. Такие гуманизированные антитела могут иметь особую клиническую полезность, поскольку они специфически узнают GPR174 человека, но не провоцируют иммунный ответ у человека против самого антитела. Следовательно, они лучше подходят для введения человеку *in vivo*, особенно, когда необходимо повторяющееся или долгосрочное введение. Способы получения гуманизированных моноклональных антител описаны также, например, в Jones, P.T., et al., *Nature* 321:522, (1986); Carter, P., et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 89:4285, (1992); Sandhu, J.S., *Crit. Rev. Biotech.* 12:437, (1992); Singer, I.I., et al., *J. Immun.* 150:2844, (1993); Sudhir (ed.), *Antibody Engineering Protocols*, Humana Press, Inc., (1995); Kelley, «Engineering Therapeutic Antibodies», in *Protein Engineering: Principles and Practice*, Cleland et al. (eds.), John Wiley & Sons, Inc., pages 399-434, (1996); и в Патенте США No. 5693762, от Queen, 1997. Кроме того, существуют коммерческие организации, которые синтезируют гуманизированные антитела из специфических областей мышиного антитела, такие как Protein Design Labs (Mountain View, CA).

Рекомбинантные антитела

Ингибирующие GPR174 моноклональные антитела можно также получать с использованием рекомбинантных способов. Например, человеческие антитела можно получать с использованием экспрессирующих человеческие иммуноглобулины библиотек

(доступных, например, из Stratagene, Corp., La Jolla, CA) для получения фрагментов человеческих антител (VH, VL, Fv, фактора D, Fab или F(ab')₂). Эти фрагменты затем используют для конструирования полностью человеческих антител с использованием способов, сходных со способами получения химерных антител.

Фрагменты иммуноглобулинов

Ингибирующие GPR174 соединения, которые можно использовать в способе по настоящему изобретению, включают не только интактные молекулы иммуноглобулинов, но также хорошо известные фрагменты, включая фрагменты Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂ и фрагменты Fv, фрагменты scFv, диатела, линейные антитела, одноцепочечные молекулы антител и мультиспецифические (например, биспецифические и триспецифические) антитела, сформированные из фрагментов антител. В данной области хорошо известно, что только небольшая область молекулы антитела, паратоп, вовлечена в связывание антитела с его эпитопом (см., например, Clark, W.R., *The Experimental Foundations of Modern Immunology*, Wiley & Sons, Inc., NY, 1986). Области pFc' и Fc антитела являются эффекторами классического пути активации комплемента, но не вовлечены в связывание антигена. Антитело, из которого при помощи ферментов вырезана область pFc', или которое получено без области pFc', обозначено как фрагмент F(ab')₂ и сохраняет оба антигенсвязывающих участка интактного антитела. Выделенный фрагмент F(ab')₂ обозначен как бивалентный моноклональный фрагмент из-за его двух антигенсвязывающих участков. Подобным образом, антитело, из которого при помощи ферментов вырезана область Fc, или которое получено без области Fc, обозначено как фрагмент Fab, и сохраняет один из антигенсвязывающих участков интактной молекулы антитела. Фрагменты антител можно получать посредством протеолитического гидролиза, такого как расщепление полноразмерных антител пепсином или папаином посредством общепринятых способов. Например, фрагменты антител можно получать посредством ферментного расщепления антител с использованием пепсина для получения 5S фрагмента, обозначенного F(ab')₂. Этот фрагмент можно далее расщеплять с использованием тиольного восстанавливающего средства для получения 3,5S моновалентных фрагментов Fab'. Необязательно, реакцию расщепления можно проводить с использованием блокирующей группы для сульфгидрильных групп, которые образуются в результате расщепления дисульфидных связей. В качестве альтернативы, ферментное расщепление с использованием пепсина напрямую образует два моновалентных фрагмента Fab и фрагмент Fc. Эти способы описаны, например, в Патенте США No. 4331647 от Goldenberg; Nisonoff, A., et al., *Arch. Biochem. Biophys.* 89:230, (1960); Портер, R.R., *Biochem. J.* 73:119, (1959); Edelman, et al., in *Methods in Enzymology* 1:422, Academic Press, (1967); и в Coligan at pages 2.8.1-2.8.10 и 2.10.-2.10.4.

Одноцепочечные фрагменты антител

Альтернативно, можно получать связывающие молекулы с единичной полипептидной цепью, специфические для GPR174, в которых области Fv тяжелой и легкой

цепи соединены. Фрагменты Fv можно соединять посредством пептидного линкера для формирования одноцепочечного антигенсвязывающего белка (scFv). Эти одноцепочечные антигенсвязывающие белки получают посредством конструирования структурного гена, содержащего последовательности ДНК, кодирующие домены VH и VL, соединенные посредством олигонуклеотида. Структурный ген вставляют в экспрессирующий вектор, который затем вводят в клетку-хозяина, такую как *E. coli*. Рекомбинантные клетки-хозяева синтезируют одиночную полипептидную цепь с пептидным линкером, соединяющим мостиком два домена V. Способы получения scFv описаны, например, в Whitlow, et al., «Methods: A Companion to Methods in Enzymology» 2:97, (1991); Bird, et al., *Science* 242:423, (1988); Патент США No. 4946778, от Ladner; Pack, P., et al., *Bio/Technology* 11:1271, (1993).

В качестве иллюстративного примера, специфический для GPR174 scFv можно получать посредством подвергания лимфоцитов воздействию полипептида GPR174 *in vitro* и отбора из библиотек дисплея антител в фаговых или сходных векторах (например, посредством использования иммобилизованного или меченого белка или пептида GPR174). Гены, кодирующие полипептиды, имеющие потенциальные связывающие полипептид GPR174 домены, можно получать посредством скрининга библиотек случайных пептидов, экспонированных на фаге или на бактериях, таких как *E. coli*. Эти библиотеки дисплея случайных пептидов можно использовать для скрининга пептидов, которые взаимодействуют с GPR174. Способы получения и скрининга таких библиотек дисплея случайных пептидов хорошо известны в данной области (Патент США No. 5223409, от Lardner; Патент США No. 4946778, от Ladner; Патент США No. 5403484, от Lardner; Патент США No. 5571698, от Lardner; и Kay et al., *Phage Display of Peptides and Proteins* Academic Press, Inc., 1996), и библиотеки дисплея случайных пептидов и наборы для скрининга таких библиотек являются коммерчески доступными, например, от CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, Calif.), Invitrogen Inc. (San Diego, Calif.), New England Biolabs, Inc. (Ipswich, Mass.), и Pharmacia LKB Biotechnology Inc. (Piscataway, N.J.).

В. Способы скрининга

Как описано в настоящем описании, авторы настоящего изобретения идентифицировали ряд соединений, способных ингибировать активность опосредованной GPR174 передачи сигналов, и идентифицировали пути передачи сигналов G-белка, поддающиеся модуляции посредством GPR174. Ниже описаны способы скрининга, которые можно использовать для идентификации таких соединений, и способы измерения активации пути передачи сигналов.

1. CRA

Одним из способов идентификации соединений, способных модулировать рецептор, является использование анализа клеточного перераспределения («CRA»). Иллюстративные способы CRA обнаружены в Патенте США No. 7309576, выданном O'Dowd et al., и в O'Dowd et al., *J. Biomol. Screen.* 12:175-85, 2007. Кратко, этот способ включает вставку последовательности ядерной локализации (NLS) в трансмембранный белок, который не

содержит эндогенную функциональную NLS. Вставка NLS изменяет клеточную локализацию GPCR, таким образом, что большинство модифицированного посредством NLS рецептора присутствует внутри клетки. Модифицированный посредством NLS GPCR, когда взаимодействует с функционально активным соединением, по большей части локализован на поверхности клетки. Таким образом, становится возможным идентификация модуляторов рецепторов без знания эндогенного лиганда или суррогатного лиганда.

Авторы настоящего изобретения идентифицировали ряд соединений, которые ингибируют GPR174, с использованием анализа CRA, сходного с описанным в Патенте США No. 7309576 и в O'Dowd et al., *J. Biomol. Screen.* 12:175-85, 2007. Эти соединения подробно описаны ниже.

2. Подтверждение CRA

Чтобы показать, что соединения, идентифицированные в анализе CRA, являются способными модулировать пути передачи сигналов G-белка, авторы настоящего изобретения тестировали соединения, идентифицированные в анализах CRA, измеряющих передачу сигнала нескольких не орфанных рецепторов. Как показано в примере 1, авторы настоящего изобретения показали, что все из соединений, идентифицированных посредством скрининга библиотек соединений против рецепторов CHRM1, NPSR и ADRA1a с использованием CRA, модулировали нижестоящие пути передачи сигналов этих рецепторов. Эти результаты показывают, что «наилучшие кандидаты» скрининга CRA, как правило, являются важными для активности рецептора.

3. Обзор регулируемых сопряженным с G-белком рецептором путей передачи сигналов

В то время как идентифицированы сотни белков GPCR, только небольшое количество гетеротримерных G-белков активируются посредством белков GPCR. Гетеротримерные G-белки включают три субъединицы, субъединицы альфа, бета и гамма. Номенклатуру G-белков определяют по альфа-субъединицам, например, *Gaq*, *Gas*, *Gai*, *Gaz*, *Gao*, *Ga12*, *Ga13*, *Ga15* и *Ga16*. G-белки сгруппированы в семейства на основании гомологии, которые также разделяют некоторые характеристики передачи сигналов. Пути передачи сигналов G-белка включают пути передачи сигналов *Gq*, *Gs*, *Gi* и *Ga12/13*. В дополнение к путям передачи сигналов G-белка, GPCR могут передавать сигналы посредством комплексов субъединиц $\beta\gamma$, аррестина 1, аррестина 2, аррестина 3 и аррестина 4.

Многочисленные анализы разработаны для измерения стимуляции GPCR и путей передачи сигналов, активированных посредством GPCR (Siehler S., *Biotechnology* 3:471-83, 2008 и ссылки в этом документе). Существуют несколько общих технологий анализа, измеряющих активацию GPCR. Связывание гуанозин-5'-O-(3'-[³⁵S]тио)-трифосфата ([³⁵S]GTP γ S) с субъединицами *Ga* широко использовали для измерения активации рецептора (Milligan, *Trends Pharmacol. Sci.* 24:87-90, 2003).

Другим общепринятым способом измерения активации рецептора является измерение индуцированной лигандом интернализации рецептора. GPCR, как правило, интернализуется в пределах 1-2 часов после стимуляции агонистом посредством процесса фосфорилирования GPCR и последующего связывания β -аррестина, который действует в качестве адаптора для связывания рецептора с окаймленными клатрином ямками и нацеливает рецептор для интернализации в эндосомы (Kahout et al., *Mol. Pharmacol.* 63:9-18, 2003). Разработано несколько технологий, в которых используют некоторый аспект интернализации рецептора, чтобы показать индуцируемую агонистом активацию рецептора (Siehler, *Biotechnology* 3:471-83, 2008 и ссылки в этом документе). Эти общие анализы ограничены измерением индуцированной агонистом активации рецептора и не рассматривают, какие G-белки сопряжены с GPCR и таким образом, пути передачи сигналов, которые GPCR активирует для вызова своего биологического ответа.

а. Путь передачи сигналов Gq

G-белки G α q, G α 11, G α 14, G α 15/16 (в совокупности, семейство Gq) активируют путь передачи сигналов Gq и ассоциированы с активацией фермента PLC, который, в свою очередь, гидролизует фосфолипид PIP₂, высвобождая два внутриклеточных мессенджера: DAG и IP₃. IP₃ является растворимым и диффундирует через цитоплазму и взаимодействует с рецепторами IP₃ на эндоплазматическом ретикулуме, вызывая высвобождение кальция и увеличение уровня цитозольного кальция. Это увеличение можно измерять напрямую посредством детектирующих внутриклеточный кальций флуоресцентных красителей. DAG остается связанным с внутренним листком плазматической мембраны из-за его гидрофобного характера, где он привлекает протеинкиназу C (PKC), которая становится активированной в сочетании со связыванием ионов кальция. Это приводит к клеточным ответам у хозяина посредством стимуляции чувствительных к кальцию белков, таких как кальмодулин (Kawakami et al., *J. Biochem.* 132:677-82, 2002).

Увеличение накопления IP₃ ассоциировано с активацией ассоциированных с Gq рецепторов. Анализы, детектирующие накопление IP₃, можно использовать для определения того, является ли соединение-кандидат, например, агонистом ассоциированного с Gq рецептора (т.е., такое соединение может увеличивать уровни IP₃). Ассоциированные с Gq рецепторы также можно анализировать с использованием анализа репортера транскрипции. Например, зависящая от Gq PLC вызывает активацию генов, содержащих элементы ответа на белок-активатор 1 (AP1), также известные как элементы AP-1; таким образом, активированные ассоциированные с Gq рецепторы могут свидетельствовать в пользу увеличения экспрессии таких генов. Обратные агонисты ассоциированного с Gq рецептора могут приводить к уменьшению такой экспрессии, и агонисты могут приводить к увеличению такой экспрессии. AP1 и другие регулируемые Gq активаторы транскрипции, такие как элемент ответа сыворотки (SRE) и элемент ответа на ядерный фактор активированных T-клеток (NFAT), могут являться функционально связанными с нуклеиновой кислотой, кодирующей поддающийся удобному анализу

репортерный фермент, такой как люцифераза, β -галактозидаза, щелочная фосфатаза или другой поддающийся детекции выход. Анализы для такой детекции являются коммерчески доступными, например, от Promega и Stratagene.

b. Путь передачи сигналов Gs

Активированный белок Gs ($G\alpha_s$ и $G\alpha_{olf}$) стимулирует фермент AC, катализирующий превращение АТФ в сАМР. GPCR, сопряженные с белком Gs, ассоциированы с увеличением клеточных уровней сАМР, которое можно измерять напрямую. Увеличение уровня сАМР активирует протеинкиназу А (РКА) и имеет другие нижестоящие эффекты. РКА например, фосфорилирует и таким образом, активирует транскрипцию генов, регулируемых посредством связывающих элемент ответа на сАМР (CREB) белков (Neves et al., *Science* 296:1636-39, 2002). Активность Gs можно анализировать в анализе репортера транскрипции с использованием элемента CREB, функционально связанного с нуклеиновой кислотой, кодирующей поддающийся удобному анализу репортерный фермент, такой как люцифераза, β -галактозидаза, или другой поддающийся детекции выход. Кроме того, анализы, детектирующие внутриклеточные уровни сАМР, можно использовать для оценки активности передачи сигналов Gs. Можно использовать множество способов, известных в данной области для измерения сАМР; в некоторых вариантах осуществления, предпочтительный способ основан на использовании антител против сАМР в формате на основе ELISA.

c. Пути передачи сигналов Gi

G-белки G1 ($G\alpha_i1$, $G\alpha_i2$, и $G\alpha_i3$), $G\alpha_o$, $G\alpha_t1$, $G\alpha_t2$, $G\alpha_{gust}$, $G\alpha_z$ (в совокупности, семейство Gi) активируют путь передачи сигналов Gi и ассоциированы с ингибированием AC и супрессией образования сАМР. Сенсорный белок Gi, $G\alpha_t$, активирует зависимую от сGMP фосфодиэстеразу, вызывая уменьшение внутриклеточного уровня сGMP, и $G\alpha_{gust}$ активирует PLC. Таким образом, анализы, детектирующие внутриклеточные уровни сАМР, как описано выше, можно использовать для оценки активности пути передачи сигналов Gi. Некоторые клетки имеют относительно низкие уровни сАМР, таким образом, увеличение клеточного уровня сАМР может способствовать определению исходного уровня активности передачи сигналов Gi. Специалист в данной области способен увеличивать клеточные уровни сАМР посредством приведения клеток в контакт, например, с фторболовыми сложными эфирами или форсколином. Альтернативно, активность рецептора Gi можно анализировать с использованием гибридных G-белков для перенацеливания передачи сигналов Gi либо на Gq, либо на Gs, и с использованием способов, описанных в настоящем описании. Все члены семейства Gi, за исключением $G\alpha_z$, являются чувствительными к ингибированию токсином коклюша посредством ADP-рибозилирования их соответствующей субъединицы α (Siehler S., *Biotechnology* 3:471-83 (2008)).

d. Другие пути передачи сигналов G-белка

Белки $G\alpha_{12/13}$ вовлечены в передачу сигналов GTPазы семейства Rho (посредством

RhoGEF) и контроль ремоделирования клеточного цитоскелета, таким образом, регуляцию миграции клеток. Белки Rho-GEF катализируют обмен GTP на GDP для активации RhoA. RhoA, в свою очередь, активирует Rho-киназу, что далее приводит к активации активирующего фактора транскрипции 2 (ATF2) и приводит к клеточным ответам (Liu et al., *Methods Mol. Biol.* 237:145-9, 2004).

е. Роль β - и γ -субъединиц

В дополнение к 16 субъединицам $G\alpha$, существуют пять различных β - и 12 γ -субъединиц, которые описаны (Milligan et al., *Br. J. Pharmacol.* 147:S46-S55, 2006). Субъединицы $\beta\gamma$ формируют гетеродимер, и их первоначально считали являющимися не более чем партнером по связыванию для субъединицы $G\alpha$ для супрессии спонтанной передачи сигналов и для обеспечения якоря в мембране для субъединицы $G\alpha$. Хотя роль субъединиц $\beta\gamma$ еще проявляется, понятно, что субъединицы $\beta\gamma$ играют более важную роль в передаче сигналов GPCR и могут напрямую активировать ферменты и ионные каналы (Dupre et al., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 49:31-56, 2009).

ф. Пути передачи сигналов аррестина

В дополнение к путям передачи сигналов на основе G-белка, GPCR могут передавать сигналы через аррестин 1, аррестин 2, аррестин 3 и аррестин 4. В дополнение к роли в терминации передачи сигналов G-белка и интернализации GPCR, аррестины вовлечены в передачу сигналов через ERK, JNK, p38, Akt, киназу PI3 и RhoA (DeWire et al., *Annu. Rev. Physiol.* 69:483-510, 2007).

4. Тестирование начальных наилучших кандидатов CRA по активности передачи сигналов

Авторы настоящего изобретения подтвердили, что начальные наилучшие кандидаты, идентифицированные с использованием анализа CRA для соединений, взаимодействующих с GPR174, являются способными ингибировать путь передачи сигналов G_s посредством GPR174. Соответственно, авторы настоящего изобретения однозначно определили, что идентифицированные соединения функционально взаимодействуют с GPR174. В частности (применительно к таблице 1), обнаружено, что соединения 1, 2, 5-18 и 22-56 ингибируют исходную активность GPR174, показывая, что, в этой системе, эти соединения представляют собой обратные агонисты GPR174. Эти результаты подробно описаны в примере 4 ниже. Обнаружено, что соединения 3, 19-21 и 57-58 имеют активность в CRA и как обнаружено, не являются модуляторами в анализе передаче через GPR174 сигналов G_s , таким образом, эти соединения характеризуют как антагонисты GPR174 или аллостерические модуляторы. Обнаружено, что соединение 4, имеющее активность в CRA, как обнаружено, не является модулятором в анализе передачи через GPR174 сигналов G_s и, как обнаружено, конкурирует с агонистом GPR174 LysoPS, таким образом, соединение 4 характеризуется как антагонист GPR174. Эти результаты подробно описаны в примере 4 ниже.

С. GPR174

GPCR имеют семь трансмембранных альфа-спиралей. GPCR имеют внеклеточный N-конец, три внеклеточных петли, три внутриклеточные петли и внутриклеточный C-конец. Внеклеточные петли и трансмембранные домены вовлечены в связывание лиганда, в то время как трансмембранные домены и внутриклеточные петли способствуют передаче сигнала. См., например, Luttrell, *Methods Mol. Biol.* 332:3-49, 2006. Большинство белков GPCR имеют консервативные остатки цистеина, формирующие дисульфидные мостики во внеклеточных петлях. Многие белки GPCR являются гликозилированными на N-конце. Консервативные остатки цистеина обнаружены также на C-конце и могут служить в качестве участка для пальмитоилирования. См., например, Luttrell, выше. Структуры разрешены для некоторых белков GPCR, и консенсусные модели структуры GPCR являются доступными. См., например, Lagerström and Schiöth, *Nat. Rev.* 7:339-57, 2008.

GPR174, также известный как FKSG79 и GPCR17, представляет собой орфанный сопряженный с G белком рецептор (GPCR) (Davenport et al., IUPHAR/BPS, орфаны класса A: GPR174, доступ предоставлен 11/1/2016). Белок GPR174 человека имеет 333 аминокислоты, как указано в SEQ ID NO:1 (NP_115942.1), показанной на ФИГУРЕ 1А, кодируемой SEQ ID NO:2 (NM_032553.1), как показано на ФИГУРЕ 1В. Белок GPR174 имеет семь трансмембранных доменов. Ген GPR174 человека имеет один кодирующий экзон (Takeda et al., *FEBS Lett* 520:97-101, 2002) и картирован на хромосоме Xq21.1 (Sugita et al., *Biochem Biophys Res Commun* 430:190-195, 2013). Аминокислотная последовательность мышинного белка GPR174 (NP_001028423.1) указана как SEQ ID NO:3 (показано на ФИГУРЕ 1С). Аминокислотная последовательность белка GPR174 крысы (NP_001100408.1) указана как SEQ ID NO:4 (показано на ФИГУРЕ 1D).

GPR174 экспрессируется в относительно малом количестве тканей. Посредством количественной ПЦР с детекцией в реальном времени (qПЦР), обнаружено, что GPR174 наиболее обильно экспрессируется в тимусе, лимфатических узлах, селезенке и костном мозге, как показано на ФИГУРЕ 22 (см. также Regard et al., *Cell* 135:561-71, 2008; Chu et al., *J Med Genet* 50:479-85, 2013; Sugita et al., *Biochem Biophys Res Commun* 430:190-195, 2013). В лимфоидных тканях, GPR174 экспрессируется на высоких уровнях в наивных В и Т-клетках, особенно в регуляторных Т-клетках, как показано на ФИГУРЕ 23 (см. также Barnes et al., *J Exp Med* 212:1011-20, 2015). В недавнем сообщении идентифицирован лизофосфатидилсерин (LysoPS) в качестве лиганда для GPR174 (Inoue et al., *Nat Methods* 9:1021-9, 2012). LysoPS представляет собой лизофосфолипидный медиатор, образованный посредством ферментного гидролиза мембранного фосфолипида, фосфатидилсерина (PS). LysoPS секретируется клетками иммунной системы и может индуцировать множественные клеточные ответы, включая супрессию Т-клеток и дегрануляцию тучных клеток (Makide et al., *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 89:135-9, 2009). EC₅₀ LysoPS для GPR174 меняется от 80 нМ до 520 нМ, в зависимости от используемого анализа (Inoue et al., *Nat Methods* 9:1021-9, 2012; Uwamizu et al., *J Biochem* 157(3):151-160, 2015; Ikubo et al., *J Med Chem* 58(10):4204-19, 2015). Кроме того, LysoPS является лигандом для двух других GPCR - а именно, GPR34

и P2Y10. EC_{50} LysoPS для P2Y10 составляет 28 нМ при условии, что EC_{50} для GPR174 составляет 520 нМ. Следует отметить, что Международный союз фундаментальной и клинической фармакологии (IUPHAR) продолжает перечислять GPR174 как орфаный GPCR (guidetopharmacology.org/GRAC).

GPR174 ассоциирован с несколькими аутоиммунными заболеваниями. Ген GPR174 локализован на хромосоме X, где кластер однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) около или внутри гена ассоциирован с чувствительностью к болезни Грэйва как в азиатских, так и в европеоидных популяциях (Chu et al., *J Med Genet* 50:479-85, Szymanski et al., *Tissue Antigens* 83:41-4, 2014). Сила ассоциации лидирующего SNP, rs3827440, с болезнью Грэйва является сходной с силой ассоциации для конкретного аллеля HLA-DRB1, наиболее сильного известного генетического фактора риска для заболевания (Kula et al., *Thyroid* 16:447-53, 2006; Barlow et al., *Clin Endocrinol (Oxf)* 44:73-7, 1996). Тот же самый SNP также является значимо ассоциированным с аутоиммунной болезнью Аддисона, другой аутоиммунной эндокринопатией, возникающей в результате повреждения надпочечников (Napier et al., *J Clin Endocrinol Metab* 100:E187-90, 2015).

Barnes et al. (*J Exp Med* 212:1011-20, 2015) показали, что у мыши GPR174 экспрессируется в наивных В- и Т-клетках и также высоко и предпочтительно экспрессируется в подгруппе Т-клеток, известных как регуляторные Т-клетки (Т-рег). У самцов мышей, лишенных GPR174 (*Gpr174*^{-Y}), количества Т-рег клеток являлись значимо увеличенными в конкретных тканях, в соответствии с наблюдением, что пролиферация и дифференцировка CD4⁺ Т-клеток в Т-рег клетках является супрессированной как следствие передачи сигналов GPR174 (Barnes et al., 2015 выше). В модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита, пик тяжести заболевания являлся значимо уменьшенным у *Gpr174*^{-Y} мышей (Barnes et al., 2015 выше). Совместно, эти результаты подчеркивают важность GPR174 в модуляции Т-рег клеток и позволяет предполагать возможную терапевтическую полезность для использования антагонистов GPR174 в супрессии аутоиммунитета.

Опубликована связь между GPR174 и конкретными злокачественными опухолями. Qin et al., (2011) открыли, что GPR174 экспрессируется в метастазирующей меланоме, в частности, в подкожных метастазах, по сравнению либо с лимфатическим узлом, либо метастазами в мозге (Qin et al., *Pigment Cell Melanoma Res* 24:207-18, 2011). Sugita et al., (2013, выше), наблюдали, что эктопическая сверхэкспрессия GPR174 в клетках СНО приводит к удлинённой, веретенообразной морфологии и замедленной пролиферации, показывая, что рецептор может влиять на фенотипическое изменение. Также, умеренная экспрессия матричной РНК GPR174 отмечена при лимфоме (база данных Unigene EST Profile).

Принимая во внимание онкогенный вклад внутриопухолевых Т-рег (Savage et al., 2013, выше), авторы настоящего изобретения исследовали потенциал ингибиторов GPR174 для модуляции количества и/или активности Т-рег. Как описано в примере 6 и показано на

ФИГУРАХ 24А, 24В, 25 и 26, авторы настоящего изобретения неожиданно определили, что в РВМС человека, ингибирование GPR174 усиливает активацию иммунной системы, в то время как также уменьшает содержание Т-рег клеток. Это является неожиданным обнаружением, принимая во внимание данные для мышей, описанные в Barnes et al. (2015, выше), показывающие, что у самцов мышей, лишенных GPR174, количества Т-рег клеток являлись значимо увеличенными в конкретных тканях.

Как далее описано в настоящем описании в примерах 3 и 4, показанных в таблице 1 и на ФИГУРАХ 5-21, авторы настоящего изобретения определили, что GPR174 представляет собой сопряженный с Gs рецептор, который, как ожидают, либо конститутивно, либо посредством активации лигандом, увеличивает внутриклеточные уровни сАМР. сАМР является ключевым регулятором иммунной системы (Mosenden and Tasken, *Cellular Signaling* 23:1009-1016, 2011). Известно, что сАМР ингибирует продукцию IL-2 и опосредованную Т-клеточным рецептором (TCR) передачу сигналов, и впоследствии ингибирует активацию Т-клетки (см. Vang et al., *J Exp Med* 193:497-507, 2001; Ruppelt et al., *J Immunol* 179:5159-5168, 2007). IL-2 является главным цитокином, который определяет выживаемость и дифференцировку Т-клетки в эффекторных Т-клетках, Т-клетках памяти и регуляторных Т-клетках. Ожидают, что ингибиторы GPR174, такие как описанные в настоящем описании, уменьшают концентрацию сАМР и таким образом, стимулируют активацию Т-клетки посредством стимуляции передачи сигналов TCR и секреции IL-2, механизма, который объясняет понижающую регуляцию Т-рег клеток и активацию эффекторных Т-клеток, таким образом, общую стимуляцию опосредованного Т-клетками иммунитета, критический компонент в иммунотерапии злокачественных опухолей. Ожидают, что большое количество злокачественных опухолей могут являться более чувствительными к более активной иммунной системе, стимулированной средством, таким как ингибитор GPR174, который стимулирует опосредованный Т-клетками иммунитет (см. Jiang et al., *Oncimmunology* 5(6):e1163462, 2016; Papaioannou et al., *Ann Transl Med* 4(14):261, 2016; Park et al., Immune checkpoint inhibitors for cancer treatment, *Arch Pharm Res*, Oct 21, 2016; Sukari et al., *Anticancer Res* 36:5593-5606, 2016).

Как далее описано в настоящем описании в примерах 16 и 17, авторы настоящего изобретения открыли, что фосфатидилсерин (PS) является агонистом опосредованной GPR174 передачи сигналов Gs. В примере 17 представлены экспериментальные результаты, показывающие, что апоптотические клетки стимулируют путь передачи через GPR174 сигналов Gs в клетках, экспрессирующих GPR174. Как далее описано в примере 16 и показано на ФИГУРАХ 47А-47F, опосредованную PS передачу через GPR174 сигналов Gs ингибируют посредством репрезентативных ингибирующих GPR174 соединений 6, 10, 11, 20, 23 и 30, принадлежащих к различным химическим классам (т.е., группы I, II и IV). Эти данные показывают, что соединения 6, 10, 11, 20, 23 и 30 действуют в качестве антагонистов GPR174 и ингибируют опосредованную PS-липосомой передачу сигналов сАМР. Таким образом, передачу сигналов PS-липосомой через GPR174 ингибируют посредством

множества ингибирующих GPR174 низкомолекулярных соединений с разнообразными химическими структурами. Как описано в настоящем описании, внеклеточный PS является высоко обогащенным в микроокружении опухолей и обнаружен на поверхности клеток опухолей так же как эндотелиальных клеток кровеносных сосудов, проникающих в солидные опухоли. Кроме того, апоптотические нейтрофилы и активированные тромбоциты, где и те, и другие экспонируют PS, также привлекаются в солидные опухоли (см. A.K and Rao D.A., *Blood* 120:4667-4668, 2012; Schlesinger, M., *Journal of Hematology and Oncology* (11) 125, 2018; Treffers L.W. et al., *Immunological Reviews* vol 273: 312-328, 2016; и Gregory A. D. and Houghton A. M., *Cancer Research* Vol 71 (7): 2411-6, 2011). Таким образом, высокие концентрации PS считаются основным источником опосредованной опухолью иммуносупрессии и могут играть роль в устойчивости к иммунотерапевтическим средствам против злокачественных опухолей, таким как ингибиторы контрольных точек.

Соответственно, один вариант осуществления относится к способу лечения злокачественной опухоли, включающему введение пациенту терапевтически эффективного количества ингибитора GPR174, которое ингибирует передачу через GPR174 сигналов G-альфа-s таким образом, стимуляцию иммунного ответа у пациента. В другом более конкретном варианте осуществления, GPR174, экспрессированный на иммунocyтах, приводят в контакт с фосфатидилсерин (PS) или лизофосфатидилсерин (lysoPS) в микроокружении опухолей или ассоциированных лимфоидных тканей, и при этом указанный ингибитор GPR174 ингибирует опосредованную PS или lysoPS передачу сигналов GPR174. В конкретных вариантах осуществления, злокачественная опухоль содержит живые клетки, умирающие клетки или внеклеточные везикулы, имеющие фосфатидилсерин (PS) на своей поверхности.

В некоторых вариантах осуществления, пациент представляет собой пациента-млекопитающего. В конкретных вариантах осуществления, способ дополнительно включает введение по меньшей мере одного дополнительного средства, выбранного из группы, состоящей из:

- i. антагониста рецептора аденозина-A2A (A2A);
- ii. антагониста рецептора аденозина-A2B (A2B);
- iii. ингибитора CD73;
- iv. ингибитора CD38;
- v. ингибитора CD39; или

vi. ослабляющего T-рег средства, где ингибитор GPR174 и по меньшей мере одно дополнительное средство вводят одновременно, или последовательно в любом порядке, при условии, что эффекты первого вышеупомянутого ингибитора или антагониста остаются присутствующими на время введения второго ингибитора или антагониста.

Кроме того, в одном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к способу стимуляции опосредованного T-клетками иммунитета у субъекта, страдающего злокачественной опухолью, включающему введение ингибитора GPR174 указанному

субъекту в количестве, эффективном для стимуляции опосредованного Т-клетками иммунитета. В некоторых вариантах осуществления, субъект страдает от злокачественной опухоли, выбранной из группы, состоящей из: рака молочной железы, меланомы, рака ободочной кишки, урологической злокачественной опухоли, рака легкого, мелкоклеточного и немелкоклеточного рака легкого, рецидивирующих или невосприимчивых злокачественных новообразований, неходжскинских лимфом и лимфом Ходжкина, лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфоцитарной лимфомы, лимфомы ЦНС, Т-клеточной лимфомы, связанной со СПИД лимфомы, острого лимфобластного лейкоза, злокачественных опухолей желудочно-кишечного тракта, рака печени, печеночноклеточной карциномы, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака желчного протока, рака предстательной железы, карциномы почки, рака мочевого пузыря, колоректального рака, множественной миеломы, мезотелиомы, рака шейки матки, рака влагалища, рака анального канала, рака ротоглотки, миелогенного лейкоза, хронического миелоидного лейкоза, рака желудка, носоглоточной карциномы, карциномы головы и шеи, глиобластомы, глиосаркомы, плоскоклеточной злокачественной опухоли мозга, злокачественной глиомы, диффузных глиом ствола головного мозга, рака пищевода, рака щитовидной железы, астроцитомы, злокачественной опухоли грудной клетки, рака эндометрия, карциномы клеток кожи, лейкоза, ацинарноклеточной карциномы, аденокарциномы, бронхиолоальвеолярной карциномы, холангиокарциномы, хордомы, гигантоклеточной карциномы, карциномы кишечника, карциномы большой слюнной железы, злокачественной одонтогенной неоплазии, злокачественной опухоли оболочки периферического нерва, рака кожи, рака яичка, опухоли зародышевых клеток, нейроэндокринной карциномы, карциномы парашитовидной железы, карциномы гипофиза, хориокарциномы плаценты, злокачественной опухоли мошонки, карциномы трахеи, переходноклеточной карциномы, рака тела матки, рака вульвы, рака почки, рака прямой кишки, карциномы фаллопиевых труб, перитонеальной карциномы, эпителиальной злокачественной опухоли, плевральной мезотелиомы, саркоматоидной карциномы, синовиальной саркомы, нефробластомы, нейробластомы, острого миелоидного лейкоза взрослых, миелодиспластической/миелолипролиферативной неоплазии, эмбриональной карциномы, саркомы Капоши, злокачественной опухоли кости, рака тела матки, рака желудка, карциномы эндометрия, злокачественной опухоли тонкого кишечника, злокачественной опухоли эндокринной системы, рака парашитовидной железы, рака надпочечника, саркомы мягких тканей, рака мочеиспускательного канала, рака полового члена, рака мочеоточника, карциномы почечной лоханки, неоплазии центральной нервной системы, ангиогенеза первичной опухоли, опухоли оси позвоночника, эпидермоидной злокачественной опухоли, индуцированных внешней средой опухолей, включая опухоли, индуцированные асбестом, аденосаркомы, аденосквамозной карциномы, адренкортикальной карциномы, астроцитарных опухолей, базальноклеточной карциномы, хондросаркомы, саркомы Юинга, рака желчного пузыря, гипотарингеальной

злокачественной опухоли, внутриглазной меланомы, рака гортани, лейомиосаркомы, злокачественной опухоли губ и полости рта, злокачественных мезотелиальных опухолей, злокачественной тимомы, медуллобластомы, медуллоэпителиомы, карциномы из клеток Меркеля, мукоэпидермоидной карциномы, миелодиспластического синдрома, рака носовой полости и околоносовых пазух, остеосаркомы, пульмональной бластомы, пинеальных и супратенториальных примитивных нейроэктодермальных опухолей, неоплазии плазматических клеток, ретинобластомы, рабдомиосаркомы, саркомы, нейроэктодермальных опухолей и опухоли Вильмса.

Эксперименты на животных показали, что, в дополнение к их иммунной функции, Т-клетки и цитокины также вносят вклад в функции ЦНС. Недостаточность Т-клеток приводит к когнитивным нарушениям (Kipnis et al., *PNAS* 101:8180-8185, 2004), эффект опосредован IL-4, продуцированным Т-клетками, находящимися в оболочках головного мозга (Derecki et al., *J Exp Med* 207:1067-1080, 2010). IL-4 вовлечен также в стимуляцию повторного роста аксонов после повреждения спинного мозга или зрительного нерва (Walsh et al., *J Clin Invest* 125:699-714, 2015). Мыши с недостаточностью лимфоцитов являются менее социальными, и этот эффект опосредован IFN- γ , продуцированным Т-клетками, находящимися в хориоидном сплетении (Filano et al., *Nature* 535:425-429, 2016). Стимуляция Т-клеток либо посредством истощения Т-рег (Baruch et al., *Nat Commun* 6:7967, 2015), либо посредством блокирования белка контрольной точки Т-клеток PD-1 (Baruch et al., *Nat Med* 22:135-137, 2016), уменьшала бляшки амилоида- β в головном мозге мышей и улучшала показатели обучения и памяти. Эти данные показывают вовлечение Т-клеток и соответствующих им цитокинов в нормальное функционирование ЦНС, в нейродегенеративные заболевания, и в репарацию нервной ткани после повреждения. Таким образом, ингибирующие GPR174 соединения, влияющие на активность, дифференцировку и продукцию цитокинов Т-клетки, как показано в примерах 3 и 4, имеют терапевтический потенциал для лечения психических заболеваний и нейродегенеративных заболеваний, таких как шизофрения, болезнь Паркинсона, аутизм, легкие когнитивные нарушения, возрастное снижение когнитивных функций, болезнь Альцгеймера, лобно-височная деменция, боковой амиотрофический склероз, так же как травматического повреждения спинного мозга и головного мозга.

Клетки естественные киллеры (клетки NK) играют критическую роль в врожденной иммунной системе, и в отличие от других клеток в иммунной системе, клетки NK могут являться цитотоксическими без предварительной стимуляции (Mandal et al., *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* (2):47-55, 2015). Например, они могут атаковать клетки опухолей, даже когда экспрессия молекул МНС класса I отсутствует или подвергается понижающей регуляции. Клетки опухолей могут также подвергаться атаке клетками NK, когда лиганды NKG2D на клетках опухолей подвергаются повышающей регуляции (Mandal et al., *Hematol Oncol Stem Cell Ther.* (2):47-55, 2015). Однако, клетки NK могут подвергаться супрессии посредством Т-рег клеток, и существует корреляция между увеличенной частотой Т-рег клеток и

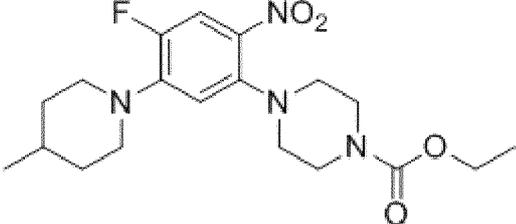
прогрессированием злокачественной опухоли (Pedroza-Pacheco, et al., *Cell Mol Immunol.* 10(3):222-9, 2013). Соответственно, многие виды терапии считают супрессирующими Т-рег клетки для стимуляции клеток НК и улучшения прогноза для пациента. Клетки НК также являются важными для иммунного ответа против вирусов и других патогенов, так же как вовлеченными в аутоиммунные процессы (Zwimer, et al., *Front Immunol.* 8: 25, 2017). Функция, дифференцировка, рост и/или пролиферация клеток НК могут быть активированы посредством цитокинов, таких как IL-2, IL-21, IL-12, IL-15, IL-18, IL-10, IFN-альфа, IFN-бета и TGF- β (Wu, et al., *Front Immunol.* 8: 930, 2017). Таким образом, функция, дифференцировка, рост и/или пролиферация клетки НК может подвергаться влиянию ингибирующих GPR174 соединений, например, посредством эффектов ингибирования GPR174 на дифференцировку Т-клетки и/или продукцию цитокина. Таким образом, ингибирующие GPR174 соединения могут иметь дополнительный терапевтический потенциал для таких заболеваний, как злокачественная опухоль.

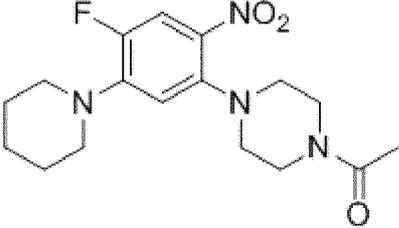
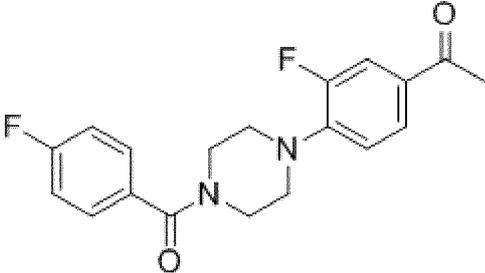
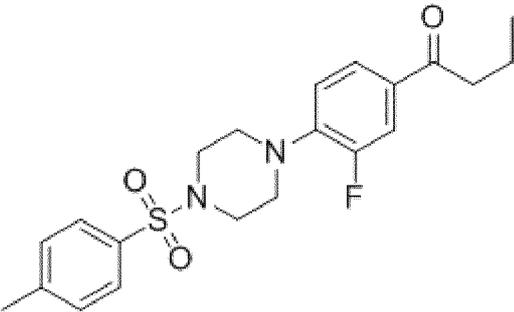
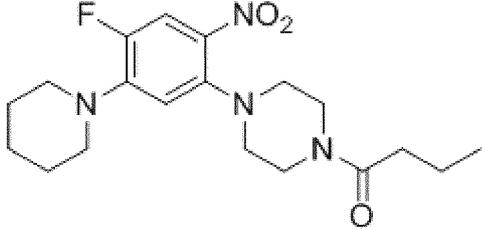
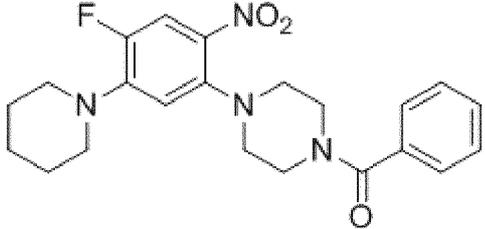
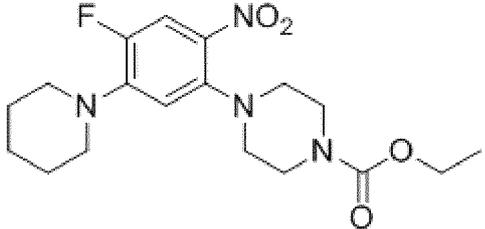
В соответствии с вышеуказанным, в одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу лечения, предотвращения и/или уменьшения вероятности развития злокачественной опухоли у субъекта, нуждающегося в таком лечении. Способ включает введение соединения, которое ингибирует опосредованный GPR174 путь передачи сигналов, субъекту или в клетки, полученные от субъекта, и повторно введенные субъекту, где ингибирование опосредованного GPR174 пути передачи сигналов приводит к лечению или предотвращению, или уменьшению тяжести заболевания, нарушения или состояния. Примеры показаний, которые можно лечить или предотвращать с использованием способов по настоящему описанию, обсуждают ниже.

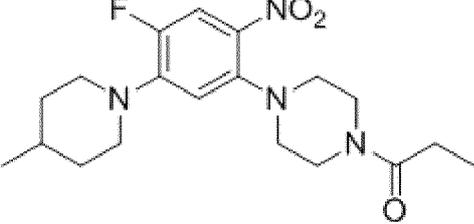
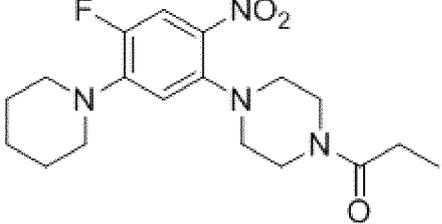
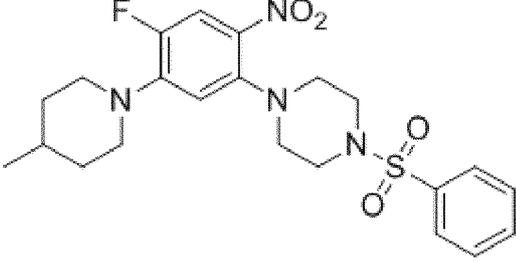
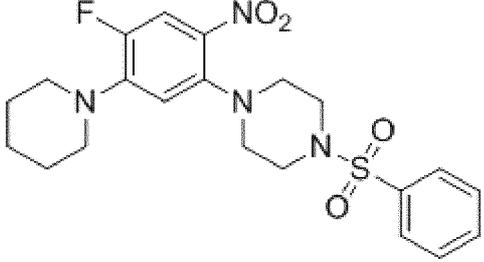
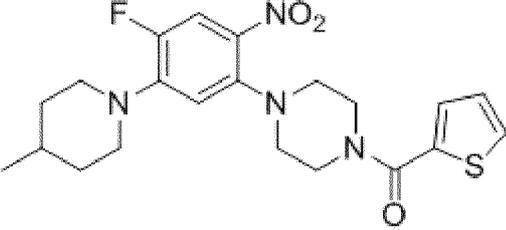
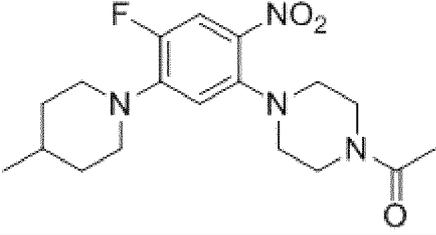
D. Взаимодействующие с GPR174 соединения

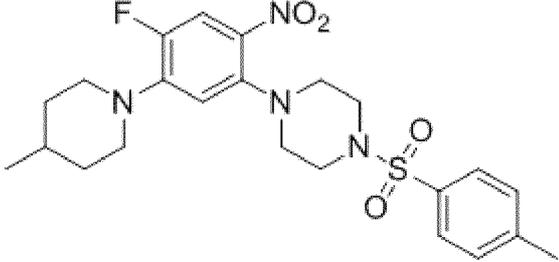
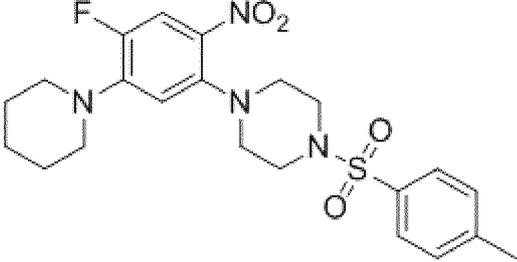
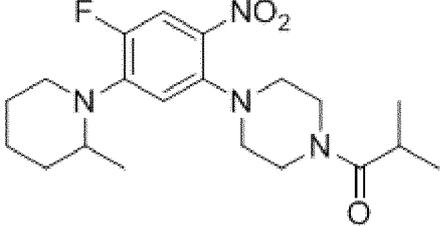
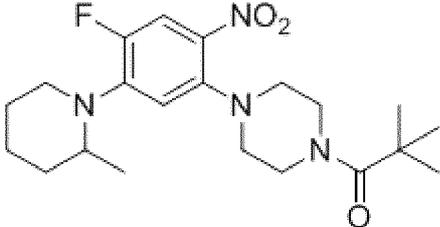
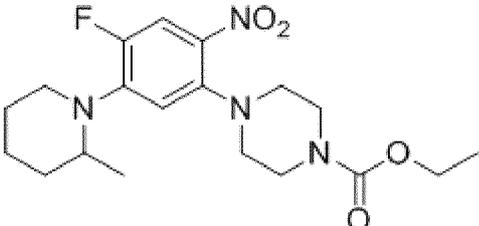
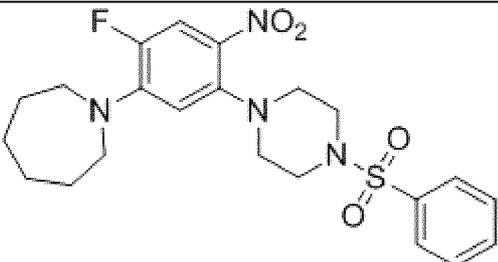
Авторы настоящего изобретения идентифицировали следующие соединения как функционально взаимодействующие с рецептором GPR174, с использованием модифицированной формы анализа CRA, описанного выше. Структуры идентифицированных репрезентативных соединений указаны ниже в таблице 1.

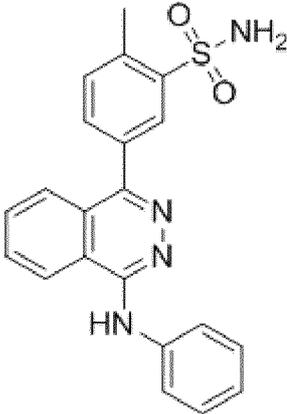
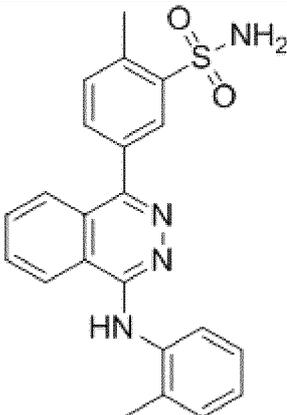
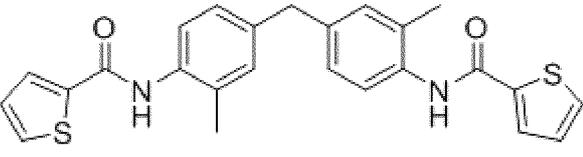
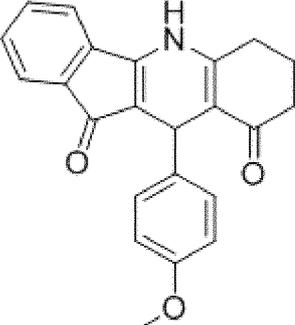
Таблица 1: Репрезентативные соединения

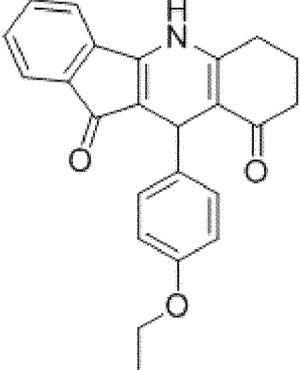
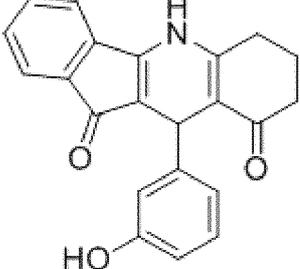
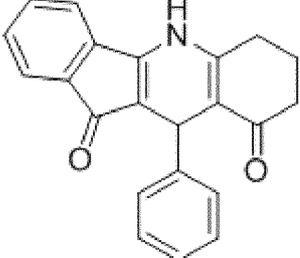
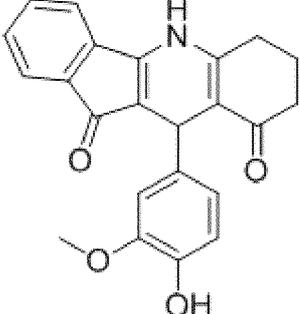
No. соединения/ группа формул	Структура	CRA EC ₅₀ (мкМ)	Активность CRE GPR174 человека, EC ₅₀ ; Кратность уменьшения активности передачи сигналов Gs
1 (группа I)		2,1, 2,1, 1,5, 0,9	IA; кратность уменьшения 0,4, 0,8; 2,9

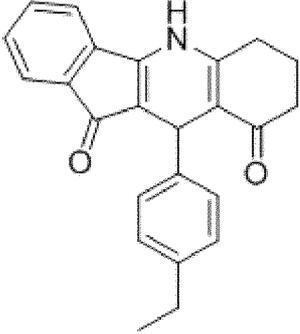
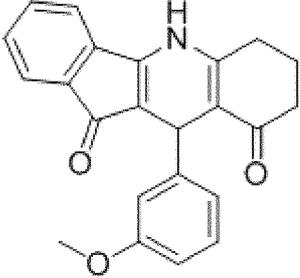
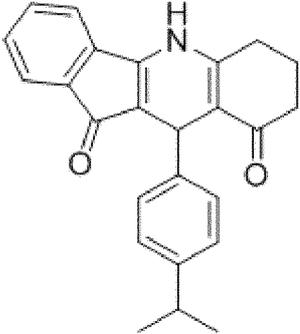
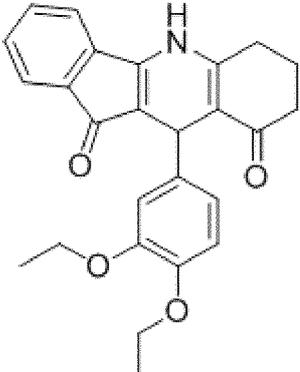
No. соединения/ группа формул	Структура	CRA EC ₅₀ (мкМ)	Активность CRE GPR174 человека, EC ₅₀ ; Кратность уменьшения активности передачи сигналов Gs
2 (группа I)		3,3, 3,0, 5,1, 0,4	IA; кратность уменьшения 0,4, 0,3; 1,7
3 (группа I)		4,1. 2,0, >10	Антагонист или аллостерический модулятор
4 (группа I)		0,2, 2,0, >1	Антагонист
5 (группа I)		>1,2	IA; 0,9, кратность уменьшения 2,4
6 (группа I)		1,4, >0,4	IA; 0,4, 0,3; кратность уменьшения 3,8
7 (группа I)		>0,6, >0,7	IA; 0,3, 0,5; кратность уменьшения 2,4

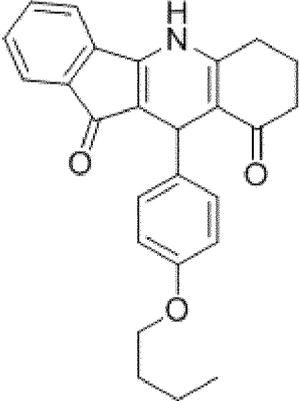
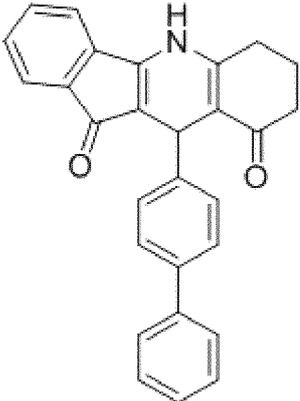
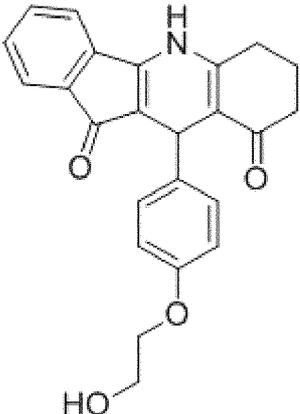
No. соединения/ группа формул	Структура	CRA EC ₅₀ (мкМ)	Активность CRE GPR174 человека, EC ₅₀ ; Кратность уменьшения активности передачи сигналов Gs
8 (группа I)		>0,7, >1,6	IA; 0,7, 0,4; кратность уменьшения 3,3
9 (группа I)		>2	IA; 0,7, 0,5; кратность уменьшения 2,1
10 (группа I)		0,6, 0,5	IA, 0,2, 0,5; кратность уменьшения 5,1
11 (группа I)		1,5, >1,1	IA, 0,5, 1,3, 0,6; кратность уменьшения 3,1
12 (группа I)		0,3	IA, 0,4, 0,7, кратность уменьшения 3,9
13 (группа I)		>2	IA, 0,8, 1,2; кратность уменьшения 2,2

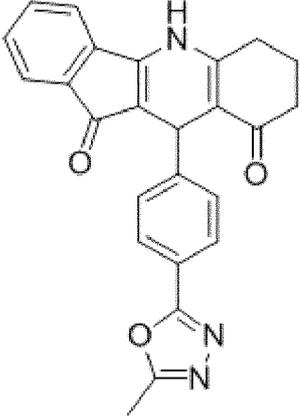
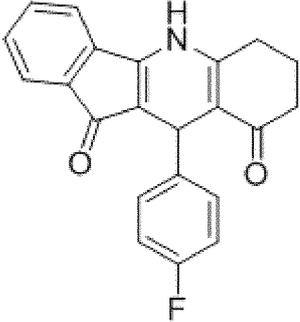
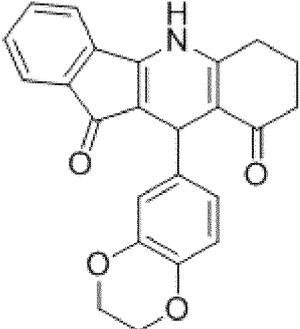
No. соединения/ группа формул	Структура	CRA EC ₅₀ (мкМ)	Активность CRE GPR174 человека, EC ₅₀ ; Кратность уменьшения активности передачи сигналов Gs
14 (группа I)		ND	IA, 1,1; кратность уменьшения 3
15 (группа I)		ND	IA, 1,7; кратность уменьшения 2,6
16 (группа I)		ND	IA, 0,8; кратность уменьшения 2,1
17 (группа I)		ND	IA, 3,0; кратность уменьшения 2,0
18 (группа I)		ND	IA, 1,0; кратность уменьшения 1,9
53 (группа I)		ND	IA, 1,8; кратность уменьшения 3,4

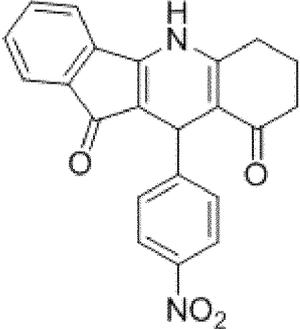
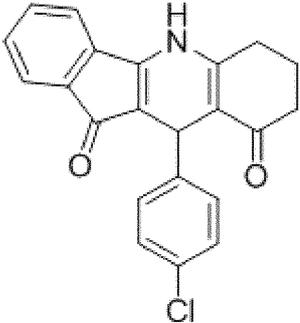
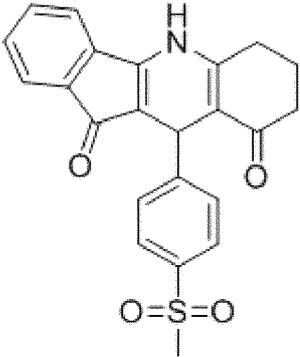
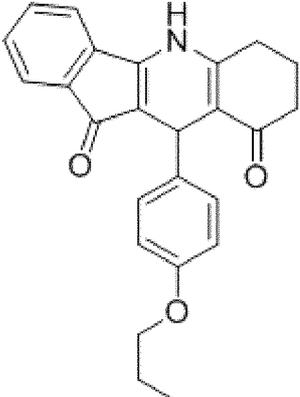
No. соединения/ группа формул	Структура	CRA EC ₅₀ (мкМ)	Активность CRE GPR174 человека, EC ₅₀ ; Кратность уменьшения активности передачи сигналов Gs
19 (группа II)		1,0, 2,0, 1,6	Антагонист или аллостерический модулятор
20 (группа II)		0,5, 1,0, 5,0	Антагонист или аллостерический модулятор
21 (группа III)		2,7, 0,5, >0,5	Антагонист или аллостерический модулятор
22 (группа IV)		6,7, 5,3	IA, 1,0, 1,5; кратность уменьшения 10,2

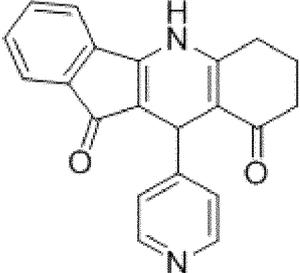
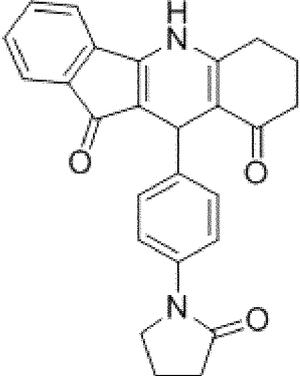
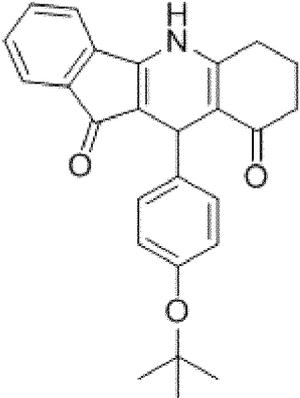
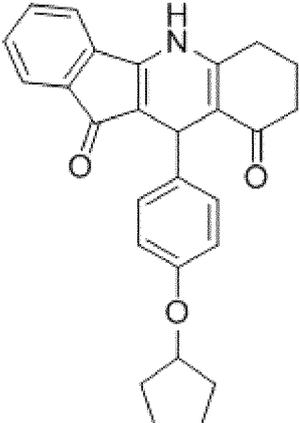
No. соединения/ группа формул	Структура	CRA EC ₅₀ (мкМ)	Активность CRE GPR174 человека, EC ₅₀ ; Кратность уменьшения активности передачи сигналов Gs
23 (группа IV)		>10, 2,9	IA, 0,4, 0,9, 1,2, 1,0; кратность уменьшения 14,1
24 (группа IV)		ND	IA, 4,4; кратность уменьшения 2,8
25 (группа IV)		ND	IA, 4,6, кратность уменьшения 4,2
26 (группа IV)		ND	IA, 3,6, кратность уменьшения 1,7

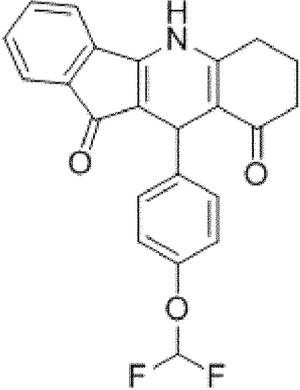
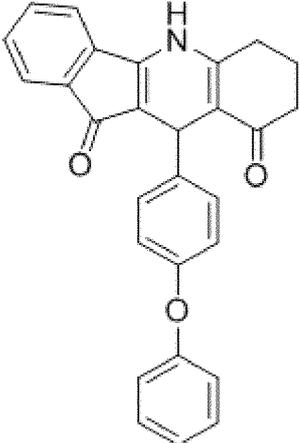
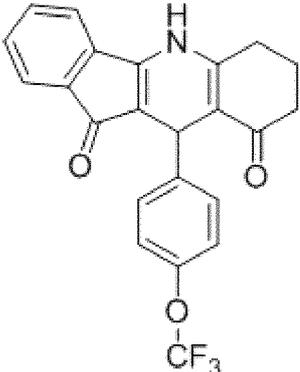
No. соединения/ группа формул	Структура	CRA EC ₅₀ (мкМ)	Активность CRE GPR174 человека, EC ₅₀ ; Кратность уменьшения активности передачи сигналов Gs
27 (группа IV)		ND	IA, 0,8, 0,5, кратность уменьшения 6,2
28 (группа IV)		ND	IA, 3,6, кратность уменьшения 1,9
29 (группа IV)		ND	IA, 1,2, кратность уменьшения 5,3
30 (группа IV)		ND	IA, 3,8, кратность уменьшения 2,2

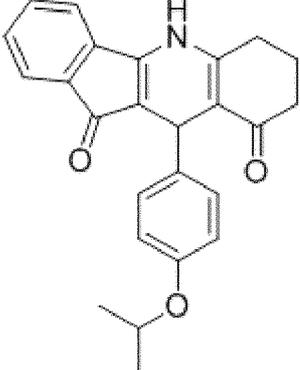
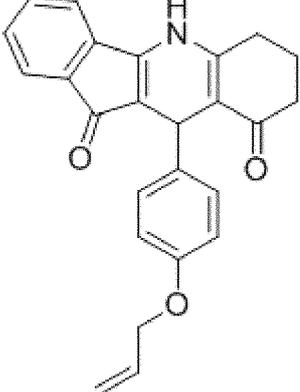
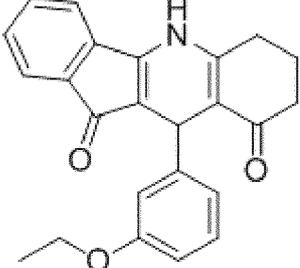
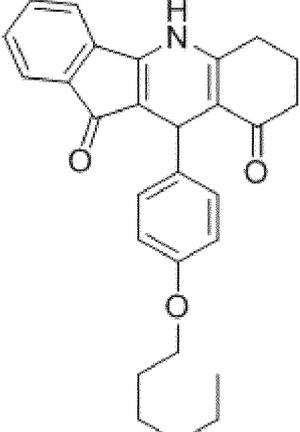
No. соединения/ группа формул	Структура	CRA EC ₅₀ (мкМ)	Активность CRE GPR174 человека, EC ₅₀ ; Кратность уменьшения активности передачи сигналов Gs
31 (группа IV)		ND	IA, 1,2, кратность уменьшения 8,9
32 (группа IV)		ND	IA, 2,5, кратность уменьшения 3,9
33 (группа IV)		ND	IA, 4,4, кратность уменьшения 9,2

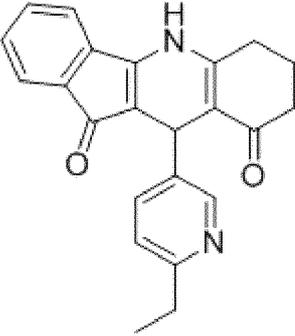
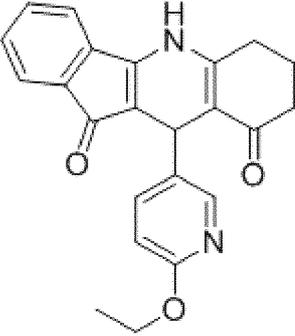
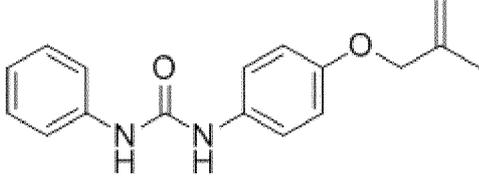
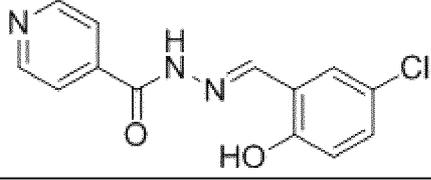
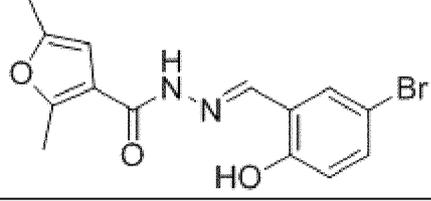
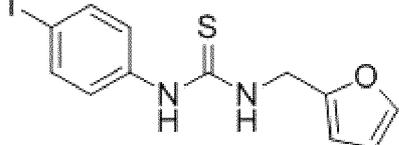
No. соединения/ группа формул	Структура	CRA EC ₅₀ (мкМ)	Активность CRE GPR174 человека, EC ₅₀ ; Кратность уменьшения активности передачи сигналов Gs
34 (группа IV)		ND	IA, 2,8, кратность уменьшения 8,4
35 (группа IV)		ND	IA, 4,3, кратность уменьшения 2,8
36 (группа IV)		ND	IA, 2,6, кратность уменьшения 8,3
37 (группа IV)		ND	IA, 5,4, кратность уменьшения 2,8

No. соединения/ группа формул	Структура	CRA EC ₅₀ (мкМ)	Активность CRE GPR174 человека, EC ₅₀ ; Кратность уменьшения активности передачи сигналов Gs
38 (группа IV)		ND	IA, 2,7, кратность уменьшения 8,6
39 (группа IV)		ND	IA, 3, кратность уменьшения 7,8
40 (группа IV)		ND	IA, 3,3, кратность уменьшения 8,8
41 (группа IV)		ND	IA, 1,0; кратность уменьшения 13,7

No. соединения/ группа формул	Структура	CRA EC ₅₀ (мкМ)	Активность CRE GPR174 человека, EC ₅₀ ; Кратность уменьшения активности передачи сигналов Gs
42 (группа IV)		ND	IA, 6,6, кратность уменьшения 4,3
43 (группа IV)		ND	IA, 5,2, кратность уменьшения 5,1
44 (группа IV)		ND	IA, 1,3, кратность уменьшения 4,7
45 (группа IV)		ND	IA, 1,0; кратность уменьшения 7,6

No. соединения/ группа формул	Структура	CRA EC ₅₀ (мкМ)	Активность CRE GPR174 человека, EC ₅₀ ; Кратность уменьшения активности передачи сигналов Gs
46 (группа IV)		ND	IA, 1,2, кратность уменьшения 8,1
47 (группа IV)		ND	IA, 1,0, кратность уменьшения 7,1
48 (группа IV)		ND	IA, 1,2, кратность уменьшения 5

No. соединения/ группа формул	Структура	CRA EC ₅₀ (мкМ)	Активность CRE GPR174 человека, EC ₅₀ ; Кратность уменьшения активности передачи сигналов Gs
49 (группа IV)		ND	IA, 0,6; кратность уменьшения 14,3
50 (группа IV)		ND	IA, 1,2; кратность уменьшения 10,1
51 (группа IV)		ND	IA, 1,6; кратность уменьшения 1,7
52 (группа IV)		ND	IA, 0,5; кратность уменьшения 3,1

No. соединения/ группа формул	Структура	CRA EC ₅₀ (мкМ)	Активность CRE GPR174 человека, EC ₅₀ ; Кратность уменьшения активности передачи сигналов Gs
54 (группа IV)		ND	IA, 2,0, кратность уменьшения 7
55 (группа IV)		ND	IA, 0,6, кратность уменьшения 7
56 (группа V)		0,5	IA, 0,5, кратность уменьшения 3
57 (группа VI)		5,6	Антагонист или аллостерический модулятор
58 (группа VI)		3,7	Антагонист или аллостерический модулятор
59 (группа Va)		ND	NM

*Для значений EC₅₀, следует отметить, что для всех соединений, включенных в таблицу 1, показан по меньшей мере минимальный уровень активности более 3-кратного

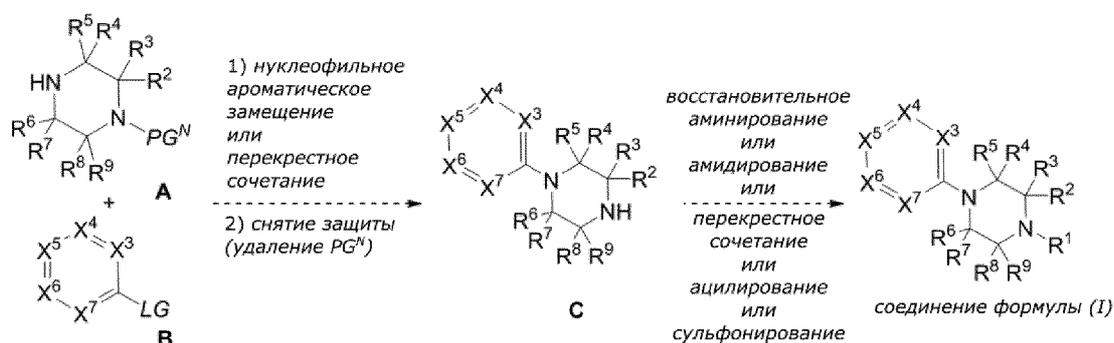
среднего фона анализа, при тестировании при 40 мкМ. Когда они присутствуют, множество значений EC_{50} соответствуют значениям, полученным в отдельных экспериментах. «IA» обозначает «обратный агонист». «NM» обозначает «не-модулятор». Соединение 4 помечено как антагонист, поскольку обнаружено, что оно конкурирует с агонистом GPR174 LysoPS (см. пример 4).

Взаимодействующие с GPR174 соединения, описанные в настоящем описании (например, соединение в соответствии с любой из формул I, II, III, IV, V или VI (или (I), (II), (III), (IV), (V), (Va) или (VI)) или любое из иллюстративных соединений 1-59 из таблицы 1) можно получать в соответствии со способами, известными в данной области с использованием общепринятых исходных материалов. Иллюстративные синтезы представлены в настоящем описании.

Соединения формулы (I) можно получать в соответствии со способами, известными в данной области. Как показано на схеме 1A, производное пиперазина A и электрофил B можно подвергать реакции перекрестного сочетания или реакции нуклеофильного ароматического замещения (например, когда один или оба из X^3 и X^7 представляет собой N). Реакции перекрестного сочетания могут представлять собой реакции перекрестного сочетания C-C (например, сочетания Сузуки, сочетания Хияма, сочетания Стилла, сочетания Негиши, сочетания Тамао-Кумада или сочетания Мурахаси), реакции перекрестного сочетания C-N (например, сочетания Бухвальда-Хартвига или сочетания Ульмана), реакции перекрестного сочетания C-O и т.д. Типичные реакции перекрестного сочетания состоят из реакции между электрофилом (например, соединением B) и нуклеофилом (например, соединением A) в присутствии каталитических количеств соли металла, например, соли палладия, меди, железа или никеля (например, $PdCl_2$, $Pd(OAc)_2$, $CuBr$, CuI , комплекса $(CuOTf)_2$ толуола, $Fe(OTf)_3$, $FeCl_3$, $FeBr_3$, $NiCl_2$ или $NiBr_2$). Необязательные лиганды, например, фосфин (например, PPh_3 , $P(2\text{-фурил})_3$, $P(t\text{-Bu})_3$, $dppf$, $dppb$ или $BINAP$), *N*-гетероциклический карбен (например, $SIMes$ или $SIPr$) или дипиридин (например, 2,2'-бипиридил или 1,10-фенантролин), можно добавлять для стимуляции реакции. Альтернативно, металлоорганический комплекс, например, $Pd(PPh_3)_4$ или $(dppf)PdCl_2$, можно использовать непосредственно в присутствии или в отсутствие дополнительных лигандов. Добавки, например, фторид тетрабутиламмония, $LiCl$, $KOAc$ или $AgOTf$, можно добавлять для минимизации дегалогенирования или для облегчения реакции перекрестного сочетания. Специалист в данной области является способным определять подходящий растворитель для реакции посредством общепринятого скрининга. Неограничивающие примеры растворителей, используемых в реакциях перекрестного сочетания, представляют собой воду, этанол, ацетон, тетрагидрофуран, толуол, 1,4-диоксан и их смеси. Неограничивающие примеры условий и катализаторов, которые можно использовать в химических реакциях перекрестного сочетания, см. в Miyaura et al., «Cross-Coupling Reactions: A Practical Guide» in *Topics in Current Chemistry*, Springer, 2002; Nicolaou et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 44:4442-4489, 2005; Maiti et al., *Chem. Sci.*, 2:57-68, 2011, полное

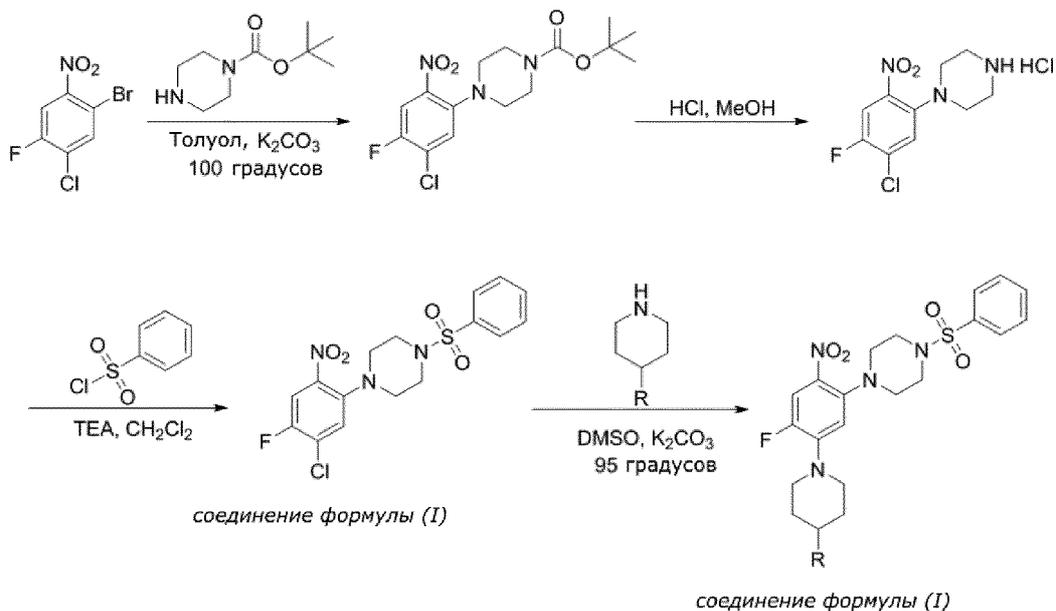
содержание которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки. Соответствующее основание может также являться необходимым для оборота катализатора, например, в перекрестном сочетании Сузуки или перекрестном сочетании Бухвальда-Хартвига. Типичные основания включают K_3PO_4 , Na_2CO_3 , Cs_2CO_3 , триалкиламин (например, основание Хунига или триэтиламин), и пиридин или замещенный пиридин (например, лутидин или коллидин). Условия реакции нуклеофильного ароматического замещения хорошо известны в данной области и обычно включают использование F или Cl в качестве уходящей группы (LG). Неограничивающий пример условий реакции нуклеофильного ароматического замещения представлен в Petit and Vo-Thanh, *15th International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry*, Section C004, 2011, полное содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки. Продукт этой трансформации можно подвергать снятию защиты (удалению PG^N) для получения C, который можно далее функционализировать для включения R^1 , который не представляет собой H, посредством восстановительного аминирования, амидирования, перекрестного сочетания, ацилирования или сульфирования. Типичные условия амидирования включают использование реагентов, таких как EDC/DMAP, NATU/HOAt или HBTU/HOAt. Специалисту в данной области известны условия восстановительного аминирования состояния и подходящие источники гидрида (например, $NaBH(OAc)_3$ или $NaBH_3CN$). Иллюстративные синтетические способы получения соединений формулы (I) можно обнаружить в Sythana S. et al, *Organic Process Research and Development*, (2014), 18, 912-918 и Garino et al., *J. Med. Chem.* (2006), 49, 4275-4285, содержание которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки. Кроме того, соединения формулы (I) можно дополнительно модифицировать для получения других соединений формулы (I), изображенных на схеме 1B.

СХЕМА 1А



LG = галид или псевдогалид (например, фосфат, OTf, ONf, OTs или OMs)
 PG^N = N-защитная группа

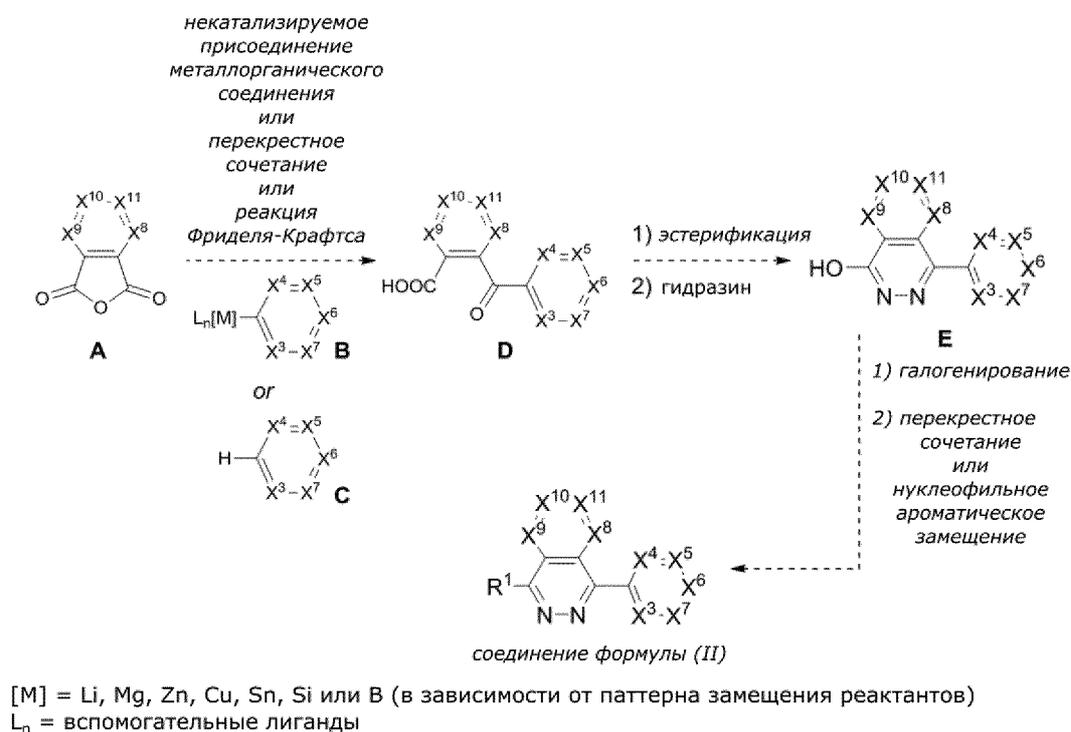
СХЕМА 1B



Соединения формулы (II) можно получать в соответствии со способами, известными в данной области. Как показано на схеме 2, циклический ангидрид А можно подвергать алкилированию с использованием В или С для получения соединения D. Реакцию с В можно проводить в условиях реакции перекрестного сочетания, как описано в настоящем описании (например, когда [М] представляет собой Cu, Sn, Si или В). Неограничивающий пример условий реакций перекрестного сочетания, пригодных для этой трансформации, представлен в Xin et al., *Synthesis*, 1970-1978, 2007, полное содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки. Когда [М] из В представляет собой Li, Mg или Zn (например, диарил-Zn или дигетероарил-Zn), реакция между А и В может проходить без катализатора. Специалист в данной области является способным выбирать подходящие условия на основании присутствия или отсутствия конкретных заместителей (например, присутствие карбонильных групп, которые не являются частью группы, подвергаемой реакции, может исключать использование, например, Li, Mg и реагентов диарил- или дигетероарил-Zn). Альтернативно, когда D получают из циклического ангидрида А и соединения С, соответствующие условия могут представлять собой условия реакции Фриделя-Крафтса (например, в присутствии каталитических или стехиометрических количеств оксофильной кислоты Льюиса (например, AlCl₃ или BF₃)). Соединение D после эстерификации и конденсации с гидразином (например, гидратом гидразина) может образовывать соединение E. Условия реакций эстерификации могут включать эстерификацию Стеглиха (например, EDC/DMAP) или обработку соединения D изобутилхлорформиатом и N-метилморфолином для получения промежуточного смешанного ангидрида, который затем подвергают реакции с нуклеофилом (например, спиртом). Альтернативно, реакция эстерификации может включать использование слабого основания (например, K₂CO₃) и электрофила (например, Me₂SO₄) в полярном апротонном растворителе (например, ацетоне). Неограничивающий пример условий реакции для

образования фталазина из сложного эфира *o*-ацилбензойной кислоты представлен в Li et al., *Molecules*, 11:574-582, 2006, полное содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки. Соединение E можно подвергать реакции галогенирования (например, с использованием PCl_5 , POCl_3 , PCl_3 или смеси двух реагентов или трех реагентов) и последующего нуклеофильного ароматического замещения или перекрестного сочетания для введения R^1 , с получением таким образом соединения формулы (II). Условия реакций перекрестного сочетания и реакций нуклеофильного ароматического замещения являются такими, как описано в настоящем описании.

СХЕМА 2

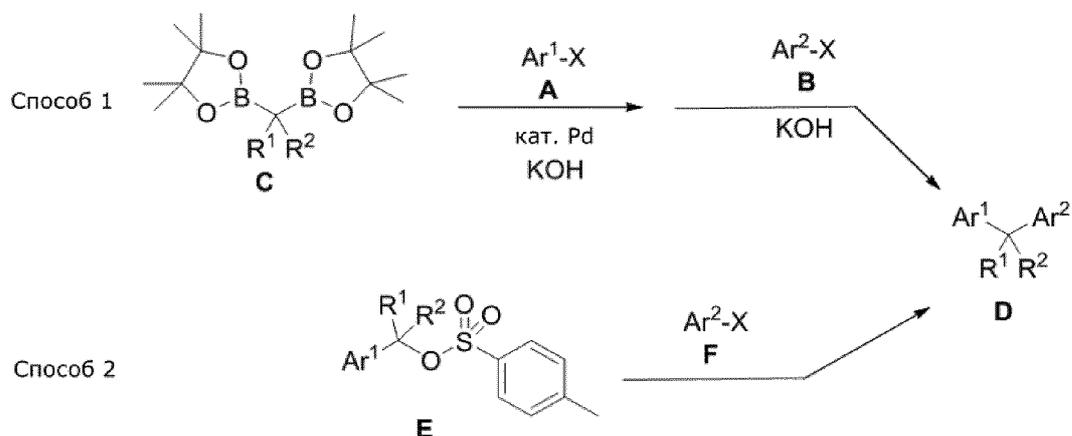


Соединения формулы (III) можно получать в соответствии со способами, известными в данной области. Общие способы получения соединений формулы (III) описаны в Endo et al., *Journal of Organic Chemistry*, 77(17): 7223-7231 2012; полное содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки. Неограничивающий пример способа синтеза до соединения формулы (III) показан на схеме 3, способ 1.

Как показано на схеме 3, соединение формулы (III) (например, соединение D) можно получать из простых исходных материалов, таких как арилгалогениды, предпочтительно, бромиды, A и B, посредством последовательного перекрестного сочетания Сузуки-Мияура в одном реакционном сосуде с использованием диборилметана C. Соединение D можно дополнительно модифицировать, например, посредством удаления необязательных защитных групп или модификации заместителей в арильных кольцах. Альтернативно, как показано на схеме 3, способ 2, соединение E можно использовать в качестве исходного материала, как описано в Wang et al., *Organic & Biomolecular Chemistry*, (2015), 13(17), 4925-

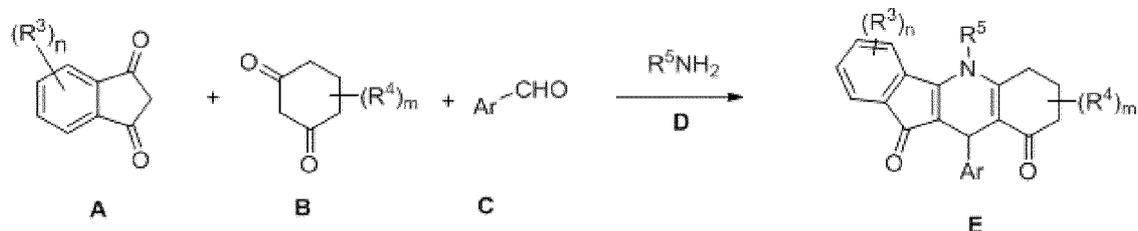
4930; полное содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

СХЕМА 3



Соединения формулы (IV) можно получать в соответствии со способами, известными в данной области. Например, как показано на схеме 4, соединение А и соединение В можно подвергать реакции с арилальдегидом С и амином D в подходящих условиях для получения соединения Е (соединение формулы (IV)). Неограничивающие примеры условий реакций, который можно использовать в синтезе соединения Е, представлены в Tu et al., *Organic & Biomolecular Chemistry*, 4(21): 3980-3985; 2006; Kosal et al., *Angew. Chem. Int. Ed.*, 51, 12036-12040, 2012; и Heravi et al., *Synthetic Communications*, 40(15): 2191-2200; 2010; Chen et al., *Journal of Heterocyclic Chemistry*, (2007), 44(5), 1201-1205; Abdolmohammadi, *Chinese Chemical Letters*, 24(4), 318-320; 2013; Heravi et al., *Synthetic Communications* (2010), 40(15), 2191-2200; Quang et al., *Bulletin of the Korean Chemical Society*, (2012), 33(4), 1170-1176; Laengle et al., *European J. Med. Chem*, (2015), 95, 249-266, и Shirini et al., *Dyes and Pigments* (2013), 97, 19-25, полное содержание которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

СХЕМА 4



В реакциях, описанных выше, может являться необходимым защищать реакционноспособные функциональные группы (например, гидрокси, амино, тио или карбокси-группы), чтобы избежать их нежелательного участия в реакциях. Включение таких групп и способы, необходимые для их введения и удаления, известны специалисту в данной области (например, Greene, выше). Стадия снятия защиты может являться конечной стадией в синтезе, так что удаление защитных групп приводит к получению соединений

формулы (I), (II), (III), (IV), (V), (Va) или (VI), как описано в настоящем описании. Исходные материалы, используемые в любой из схем выше, можно закупать или получать способами, описанными в химической литературе, или посредством их адаптаций, с использованием способов, известных специалисту в данной области. Порядок, в котором осуществляют стадии, можно менять, в зависимости от введенных групп и используемых реагентов, но он очевиден специалисту в данной области.

Соединения любой из формул (I), (II), (III), (IV), (V), (Va) или (VI), или любое из промежуточных соединений, описанных в схемах выше, можно дополнительно дериватизировать с использованием одного или нескольких стандартных способов синтеза, известных специалисту в данной области. Такие способы могут включать реакции замещения, окисления или восстановления. Эти способы можно также использовать для получения или модификации соединений формул (I), (II), (III), (IV), (V), (Va) или (VI), или любых предшествующих промежуточных соединений посредством модификации, введения или удаления подходящих функциональных групп. Конкретные способы замещения включают способы алкилирования, арилирования, гетероарилирования, ацилирования, тиоацилирования, галогенирования, сульфонилирования, нитрирования, формилирования, гидролиза и сочетания. Эти способы можно использовать для введения функциональной группы в исходную молекулу (например, нитрирования или сульфонилирования ароматического кольца) или для связывания двух молекул вместе (например, для связывания амина с карбоновой кислотой для получения амида; или для формирования связи углерод-углерод между двумя гетероциклами). Например, группы спирта или фенола можно переводить в группы эфира, связывая фенол со спиртом в растворителе, например, тетрагидрофуране, в присутствии фосфина (например, трифенилфосфина) и дегидратирующего средства (например, диэтил-, диизопропил- или диметилазодикарбоксилата). Альтернативно, группы эфира можно получать посредством депротонизации спирта, с использованием подходящего основания (например, гидрида натрия) с последующим добавлением алкилирующего средства (например, алкилгалогенида или алкилсульфоната).

В другом примере, первичный или вторичный амин можно алкилировать с использованием способа восстановительного алкилирования. Например, амин можно обрабатывать альдегидом и борогидридом (например, триацетоксиборогидридом натрия или цианоборогидридом натрия) в растворителе (например, галогенированном углеводороде, например, дихлорметане или спирте, например, этаноле) и, где необходимо, в присутствии кислоты (например, уксусной кислоты).

В другом примере, -ОН-группы можно получать из соответствующего сложного эфира, кислоты, кислого хлорида или альдегида посредством восстановления с использованием подходящего восстанавливающего средства, например, комплексного гидрида металла, например, алюмогидрида лития, в растворителе (например, тетрагидрофуране).

В другом примере, гидроксигруппы (включая фенольные ОН-группы) можно переводить в уходящие группы, например, атомы галогена или сульфонилоксигруппы (например, алкилсульфонилокси, например, трифторметилсульфонилокси, или арилсульфонил, например, *n*-толуолсульфонилокси) с использованием условий, известных специалисту в данной области. Например, алифатический спирт можно подвергать реакции с тионилхлоридом в галогенированном углеводороде (например, дихлорметане) для получения соответствующего алкилхлорида. Основание (например, триэтиламин) также можно использовать в реакции.

В другом примере, сложный эфир можно переводить в соответствующую карбоновую кислоту посредством катализируемого кислотой или основанием гидролиза, в зависимости от характера группы сложного эфира. Катализируемый кислотой гидролиз можно получать посредством обработки органической или неорганической кислотой (например, трифторуксусной кислотой в водном растворителе, или неорганической кислотой, например, соляной кислотой в растворителе, например, диоксане). Катализируемый основанием гидролиз можно получать посредством обработки гидроксидом щелочного металла (например, гидроксидом лития в водном спирте, например, метаноле).

В другом примере, ароматические галогеновые заместители в соединениях можно подвергать обмену галоген-металл посредством обработки основанием (например, литиевым основанием, например, *n*-бутил- или *m*-бутиллитием) необязательно, при низкой температуре (например, -78°C) в растворителе (например, тетрагидрофуране), и реакцию в смеси можно затем останавливать с использованием электрофила для введения желательного заместителя. Таким образом, например, формильную группу можно вводить с использованием диметилформамида в качестве электрофила. Ароматические галогеновые заместители также можно подвергать катализируемым палладием реакциям для введения групп, например, карбоновых кислот, сложных эфиров, циано- или амино-заместителей.

В другом примере, ароматические галогеновые заместители в соединениях могут участвовать в ряде катализируемых металлом реакций для введения альтернативных функциональных групп, например, аминов, амидов, эфиров, тиолов, арильных групп или гетероарильных групп.

Конкретные способы окисления включают дегидрогенизацию и ароматизацию, и добавление кислорода к конкретным функциональным группам. Например, альдегидные группы можно получать посредством окисления соответствующего спирта с использованием условий, хорошо известных специалисту в данной области. Например, спирт можно обрабатывать окисляющим средством (например, реагентом Десса-Мартина) в растворителе (например, галогенированном углеводороде, например, дихлорметане). Можно использовать альтернативные условия окисления, например, обработку оксалилхлоридом и активирующим количеством диметилсульфооксида и последующую остановку реакции посредством добавления амина (например, триэтиламина). Такую

реакцию можно проводить в подходящем растворителе (например, галогенированном углеводороде, например, дихлорметане) и в подходящих условиях (например, охлаждение ниже комнатной температуры, например, до -78°C , с последующим нагревом до комнатной температуры). В другом примере, атомы серы можно окислять до соответствующего сульфоксида или сульфона с использованием окисляющего средства (например, пероксикислоты, например, 3-хлорпероксибензойной кислоты) в инертном растворителе (например, галогенированном углеводороде, например, дихлорметане) приблизительно при температуре окружающей среды.

Конкретные способы восстановления включают удаление атомов кислорода из конкретных функциональных групп, насыщение (или частичное насыщение) ненасыщенных соединений, включая ароматические кольца. Например, первичные спирты можно получать из соответствующего сложного эфира или альдегида посредством реакции, использующей гидрид металла (например, алюмогидрид лития или борогидрид натрия в растворителе, например, метаноле). Альтернативно, $-\text{OH}$ -группы можно получать из соответствующей карбоновой кислоты посредством восстановления, с использованием гидрида металла (например, алюмогидрида лития в растворителе, например, тетрагидрофуране). В другом примере, нитрогруппу можно восстанавливать до амина посредством каталитической гидрогенизации в присутствии металлического катализатора (например, палладия на твердой подложке, например, углероде) в растворителе (например, эфире, например, тетрагидрофуране, или спирте, например, метаноле), или посредством химического восстановления с использованием металла (например, олова или железа) в присутствии кислоты (например, соляной кислоты). В следующем примере, амин можно получать посредством восстановления нитрила, например, посредством каталитической гидрогенизации в присутствии металлического катализатора (например, палладия на твердой подложке, например, углероде) или никеля Ренея в растворителе (например, тетрагидрофуране) и в других пригодных условиях (например, при охлаждении ниже комнатной температуры, например, до -78°C , или нагревания, например, для кипячения с обратным холодильником).

Взаимодействующие с GPR174 эталонные соединения

Как описано в настоящем описании, в различных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к эталонным соединениям, однозначно предварительно определенным как функционально взаимодействующие с GPR174, содержащим структуру, в соответствии с формулой I, II, III, IV, V или VI (например, такую как соединения 1-59 в таблице 1 или формула (I), (II), (III), (IV), (V), (Va) или (VI)), и необязательно, дополнительно содержащим поддающуюся детекции группу, также обозначенными в настоящем описании как «эталонные соединения, включающие поддающуюся детекции группу». Взаимодействующие с GPR174 эталонные соединения, включающие поддающуюся детекции группу, например, такую как радиоактивный изотоп, флуоресцентная метка, биолюминесцентная метка, хемилюминесцентная метка,

фотоаффинная метка, и т.п., можно получать в соответствии со способами, известными в данной области, с использованием общепринятых исходных материалов.

Например, в одном варианте осуществления, взаимодействующее с GPR174 эталонное соединение метят с использованием, или синтезируют в условиях, пригодных для включения молекулярной метки(меток), включающих радиоактивный изотоп, такой как ^{125}I , ^{14}C , ^3H , ^{11}C , ^{18}F , $^{99\text{m}}\text{Tc}$ или другая пригодная радиометрическая метка, с использованием способов, известных в данной области. См., например, Seevers R. H and Counsell, R.E., «Radioiodination Techniques for Small Organic Molecules, *Chem Rev* 82:575-590, 1982; Voges R. et al., «Preparation of Compounds Labeled with Tritium and Carbon-14», John Wiley & Sons, 2009; Ametamey, S.M., et al., «Molecular Imaging with PET», *Chem Rev* 108:1501-1516, 2008; и Cheng Y. et al., *J Med Chem*, 55:2279-2286, 2012, содержание каждого из которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

В другом варианте осуществления, взаимодействующее с GPR174 эталонное соединение метят с использованием, или синтезируют в условиях, пригодных для включения фотоаффинной метки, с использованием способов, известных в данной области. См., например, Spletstoser J.T. et al., *J. Med. Chem.* 47:6459-6465, 2004, содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

В другом варианте осуществления, взаимодействующее с GPR174 эталонное соединение метят с использованием, или синтезируют в условиях, пригодных для включения флуоресцентной метки, такой как 6-карбоксихлорофлуоресцеин (FAM), Alexa Fluor® (Molecular Probes, Inc), флуоресцеинизотиоцианат (FITC), и т.п., с использованием способов, известных в данной области. См., например, Goncalves, M.S., *Chem Rev* 109:190-212, 2009, содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

В другом варианте осуществления, взаимодействующее с GPR174 эталонное соединение метят с использованием биолюминесцентной или хемилюминесцентной метки, такой как изолюминол, или сложный эфир акридиния, или ферментной метки, такой как пероксидаза хрена (HRP) или щелочная фосфатаза (AP), для дополнительного усиления считывания, с использованием субстратов для усиленной хемилюминесценции (ECL), с использованием способов, известных в данной области. См., например, Barton V. et al., *J Med Chem* 53:4555-4559, 2010, содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

Е. Путь передачи сигналов GPR174

Как описано в настоящем описании, авторы настоящего изобретения открыли, что GPR174 модулирует путь передачи сигналов Gs. Отнесение GPR174 к пути передачи сигналов Gs произошло после определения исходной активности GPR174 в анализе панели репортеров транскрипции, с последующим подтверждением этого отнесения в присутствии и в отсутствие низкомолекулярных суррогатных лигандов для GPR174, которые были идентифицированы в отдельном анализе скрининга по их способности функционально взаимодействуют со связанным с мембраной GPR174 в CRA. Как подробно описано в

настоящем описании, CRA основан на наблюдении, что замена с использованием NLS частичной последовательности во внутриклеточной части GPCR эффективно удаляет модифицированный и несвязанный рецептор с поверхности клетки и что этот эффект обратим посредством присутствия специфического для рецептора лиганда.

Кратко, для определения исходной активности GPR174 в пути передачи сигналов Gs, GPR174 сверхэкспрессировали в культуре клеток ткани млекопитающих, которые также включали экспрессирующую кассету с люциферазой, репортерным белком, под транскрипционным контролем одного из пяти промоторов. Промоторы представляли собой элемент ответа на cAMP (CRE), NFAT, AP1, элемент ответа сыворотки (SRE) и фактор ответа сыворотки (SRF). Путь передачи сигналов Gs индуцирует транскрипцию с промотора CRE. Путь передачи сигналов Gq индуцирует транскрипцию с промоторов NFAT, AP1, SRE, CRE и SRF. Путь передачи сигналов Gi может индуцировать транскрипцию с CRE в присутствии химерных с Gs G-белков или индуцировать транскрипцию промоторов NFAT AP1, SRE, CRE и SRF с использованием химерных с G15, G16 или Gq G-белков. Путь передачи сигналов G12/13 индуцирует транскрипцию с промоторов SRE и SRF. Специалисту в данной области понятно, что другие репортеры можно использовать в анализе, например, β -галактозидазу или другие поддающиеся детекции или поддающиеся анализу белки.

Как показано в примерах ниже, определили, что GPR174 модулирует путь передачи сигналов Gs.

Активность взаимодействующих с GPR174 соединений

В одном варианте осуществления, ингибитор GPR174, который можно использовать в способах по настоящему изобретению, представляет собой соединение, ингибирующее опосредованный GPR174 путь передачи сигналов (например, путь Gs) по меньшей мере в 0,5 раз (например, по меньшей мере в 1,5 раза, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 50 раз или по меньшей мере в 100 раз), по сравнению с исходной активностью самого рецептора при концентрации соединения менее чем 40 мкМ (например, менее чем 25, 10, 5, 1, 0,5, 0,25, 0,1 или менее чем 0,5 мкМ).

В некоторых вариантах осуществления, модулятор GPR174 представляет собой ингибитор опосредованного GPR174 пути передачи сигналов и уменьшает активность по меньшей мере одного опосредованного GPR174 пути передачи сигналов (например, пути Gs) по меньшей мере на 10% (например, по меньшей мере в 0,5 раза, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 50 раз или по меньшей мере в 100 раз), по сравнению с исходной активностью самого рецептора при концентрации соединения менее чем 40 мкМ (например, менее чем 25, 10, 5, 1, 0,5, 0,25, 0,1 или менее чем 0,5 мкМ).

В некоторых вариантах осуществления, модулятор GPR174 представляет собой ингибитор опосредованного GPR174 пути передачи сигналов и уменьшает активность по

меньшей мере одного опосредованного GPR174 пути передачи сигналов (например, пути Gs) в присутствии агониста по меньшей мере на 20% (например, по меньшей мере в 0,5 раз, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 50 раз или по меньшей мере в 100 раз) при концентрации ингибитора менее чем 40 мкМ (например, менее чем 25, 10, 5, 1, 0,5, 0,25, 0,1, или менее чем 0,5 мкМ) по сравнению с активностью рецептора без агониста и без ингибитора.

В некоторых вариантах осуществления, модулятор GPR174 представляет собой ингибитор опосредованного GPR174 пути передачи сигналов и уменьшает активность по меньшей мере одного опосредованного GPR174 пути передачи сигналов (например, пути Gs) в присутствии активатора по меньшей мере на 20% (например, по меньшей мере 0,5 раз, по меньшей мере в 2 раза, по меньшей мере в 5 раз, по меньшей мере в 10 раз, по меньшей мере в 50 раз или по меньшей мере в 100 раз) при концентрации ингибитора менее чем 40 мкМ (например, менее чем 25, 10, 5, 1, 0,5, 0,25, 0,1, или менее чем 0,5 мкМ), по сравнению с активностью рецептора с активатором и без ингибитора.

Иллюстративный анализ, пригодный для определения активности модулятора GPR174 (активатора или ингибитора) по сравнению с исходной активностью GPR174, представлен в примерах 3 и 4 в настоящем описании, в которых описано использование анализов репортера для измерения активности опосредованного GPR174 пути передачи сигналов (например, активности путь Gs) в отсутствие (для определения исходной активности) или в присутствии модулирующего GPR174 соединения.

F. Способы скрининга для идентификации дополнительных соединений

При наличии в настоящее время идентифицированных соединений, которые ингибируют GPR174 и пути передачи сигналов, модулируемые этим рецептором, в соответствии с настоящим описанием, можно использовать дополнительные способы для идентификации других модуляторов GPR174.

В случае орфанных GPCR, где природный лиганд остается неизвестным, меченые суррогатные лиганды можно использовать как эталонные соединения в качестве средств измерения связывания с природными рецепторами и/или со сконструированными конструкциями рецептора, так что можно определять конкуренцию (т.е., конкурентное связывание) или неконкурентное связывание с другими модулирующими рецептор средствами. Суррогатные лиганды (например, соединения 1-59, представленные в таблице 1) могут связываться с природным участком связывания (ортостерическим участком) или могут связываться с участком(участками) аллостерического связывания на рецепторе GPR174.

Примеры таких способов скрининга для идентификации средств, модулирующих активность передачи сигналов GPR174, описаны ниже.

В рамках изобретения, термин «модулирующее средство-кандидат», в контексте способов скрининга для идентификации средств, модулирующих активность GPR174, относится к любому модулирующему средству, включая соединения, как определено в

настоящем описании (т.е., включая молекулы, либо природные, либо синтетические, например, белок; пептид (например, длиной от приблизительно 5 до приблизительно 25 аминокислот, например, длиной от приблизительно 10 до 20 или 12-18 аминокислот, например, длиной 12, 15 или 18 аминокислот); антитело, или его фрагмент или миметик; аптамер, низкомолекулярное химическое соединение, например, малую органическую, металлоорганическую или неорганическую молекулу; полисахарид; олигонуклеотиды; липид; и жирную кислоту. Соединение может быть включено в библиотеку соединений, такую как комбинаторная, синтетическая, природная, гетероциклическая, подобная лекарственным средствам, подобная лидирующим соединениям, органическая, неорганическая, нерандомизированная или рандомизированная библиотека, которая обеспечивает достаточный диапазон разнообразия, или она может представлять собой сфокусированную или направленную коллекцию вышеуказанных соединений). Модулирующие средства-кандидаты также включают природные экстракты, нуклеотиды, молекулы нуклеиновой кислоты (включая библиотеку молекул нуклеиновой кислоты, такую как библиотека кДНК, кодирующей модулирующее средство), аналоги нуклеотидов, нуклеозиды и аналоги нуклеозидов, и газы (например, такие как сульфид водорода (H_2S), или оксид азота (NO)).

В рамках изобретения, термин «природный экстракт» обозначает любой экстракт, полученный из природного источника, такого как эукариотическая клетка (например, клетка млекопитающего (включая линию клеток млекопитающего) или ткань млекопитающего), бактерии, животное, растение, фрукт, дерево и т.п.

В соответствии с вышеуказанным, в одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу идентификации модулирующего средства, способного модулировать опосредованный GPR174 путь передачи сигналов (например, путь Gs) включающему: (a) приведение клетки, экспрессирующей GPR174, в контакт с (i) по меньшей мере одним модулирующим средством-кандидатом и (ii) эталонным соединением, включающим поддающуюся детекции группу, где эталонное соединение (т.е., суррогатный лиганд), как известно, модулирует активность опосредованного GPR174 пути передачи сигналов, и (b) определение того, изменяет ли модулирующее соединение-кандидат (т.е., увеличивает или уменьшает) аффинность связывания эталонного соединения с GPR174. В некоторых вариантах осуществления, модулирующее соединение-кандидат, которое уменьшает аффинность связывания (т.е., ингибирует связывание) эталонного соединения с GPR174, идентифицируют как модулирующее средство, способное модулировать опосредованный GPR174 путь передачи сигналов. В некоторых вариантах осуществления, соединение-кандидат, которое конкурентно уменьшает аффинность связывания (т.е. конкурентно ингибирует связывание) эталонного соединения с GPR174, идентифицируют как соединение, которое связывается с той же областью GPR174, что и эталонное соединение, и является способным модулировать опосредованный GPR174 путь передачи сигналов. В некоторых вариантах осуществления, модулирующее соединение-кандидат, которое

увеличивает аффинность связывания (т.е., усиливает связывание) эталонного соединения с GPR174, идентифицируют как модулирующее средство, действующее как аллостерическое модулирующее средство, способное модулировать опосредованный GPR174 путь передачи сигналов. В некоторых вариантах осуществления, модулирующее средство-кандидат уменьшает аффинность связывания эталонного соединения с GPR174 по меньшей мере в 2 раза. В некоторых вариантах осуществления, модулирующее средство-кандидат увеличивает аффинность связывания эталонного соединения с GPR174 по меньшей мере в 2 раза. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает проведение анализа передачи сигналов для измерения эффекта идентифицированного соединения на опосредованный GPR174 путь передачи сигналов, необязательно, в присутствии эталонного соединения, как известно, модулирующего по меньшей мере один опосредованный GPR174 путь передачи сигналов.

В соответствии с вышеуказанным, в одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу идентификации модулирующего средства, способного модулировать опосредованный GPR174 путь передачи сигналов (например, путь Gs) включающему: (a) приведение клетки, экспрессирующей GPR174, в контакт с (i) по меньшей мере одним модулирующим средством-кандидатом и (ii) эталонным соединением, включающим поддающуюся детекции группу, где эталонное соединение (т.е., а суррогатный лиганд), как известно, модулирует активность опосредованного GPR174 пути передачи сигналов, и (b) определение того, изменяет ли модулирующее соединение-кандидат (т.е., увеличивает или уменьшает) кажущуюся аффинность связывания эталонного соединения с GPR174. В некоторых вариантах осуществления, модулирующее соединение-кандидат, которое уменьшает кажущуюся аффинность связывания эталонного соединения с GPR174, идентифицируют как модулирующее средство, способное модулировать опосредованный GPR174 путь передачи сигналов. В некоторых вариантах осуществления, соединение-кандидат, которое конкурентно уменьшает кажущуюся аффинность связывания эталонного соединения для GPR174, идентифицируют как соединение, которое связывается с той же областью GPR174, что и эталонное соединение, и является способным модулировать опосредованный GPR174 путь передачи сигналов. В некоторых вариантах осуществления, модулирующее соединение-кандидат, которое уменьшает аффинность связывания эталонного соединения для GPR174, идентифицируют как модулирующее средство, действующее как отрицательное аллостерическое модулирующее средство, которое связывает аллостерический участок на GPR174. В некоторых вариантах осуществления, модулирующее соединение-кандидат, которое увеличивает кажущуюся аффинность связывания эталонного соединения для GPR174, идентифицируют как модулирующее средство, действующее как положительное аллостерическое модулирующее средство, способное модулировать опосредованный GPR174 путь передачи сигналов. В некоторых вариантах осуществления, модулирующее средство-кандидат уменьшает кажущуюся аффинность связывания эталонного соединения для GPR174 по меньшей мере в 2 раза. В

некоторых вариантах осуществления, модулирующее средство-кандидат увеличивает кажущуюся аффинность связывания эталонного соединения с GPR174 по меньшей мере в 2 раза. В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает проведение анализа передачи сигналов для измерения эффекта идентифицированного соединения на опосредованный GPR174 путь передачи сигналов, необязательно в присутствии эталонного соединения, как известно, модулирующего по меньшей мере один опосредованный GPR174 путь передачи сигналов. В некоторых вариантах осуществления, модулирующее соединение-кандидат, которое уменьшает кажущуюся активность опосредованной GPR174 передачи сигналов, по сравнению с эталонным соединением с GPR174, идентифицируют как модулирующее средство, способное модулировать опосредованный GPR174 путь передачи сигналов. В некоторых вариантах осуществления, модулирующее средство-кандидат уменьшает кажущуюся активность опосредованной GPR174 передачи сигналов с эталонным соединением по меньшей мере на 10%. В некоторых вариантах осуществления, модулирующее соединение-кандидат, которое увеличивает кажущуюся активность опосредованной GPR174 передачи сигналов, по сравнению с эталонным соединением с GPR174, идентифицируют как модулирующее средство, способное активировать опосредованный GPR174 путь передачи сигналов. В некоторых вариантах осуществления, модулирующее средство-кандидат увеличивает кажущуюся активность опосредованной GPR174 передачи сигналов с эталонным соединением по меньшей мере на 20%.

В некоторых вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способу идентификации модулирующего средства, способного модулировать опосредованный GPR174 путь передачи сигналов (например, а путь Gs), включающему

(a) приведение клетки, экспрессирующей GPR174, в контакт с

- (i) по меньшей мере одним модулирующим средством-кандидатом и
- (ii) эталонным соединением, как известно, модулирующим активность опосредованного GPR174 пути передачи сигналов и

(b) сравнение активности опосредованной GPR174 передачи сигналов в клетке, приведенной в контакт с модулирующим соединением-кандидатом и эталонным соединением, с активностью опосредованной GPR174 передачи сигналов в клетке, приведенной в контакт с эталонным соединением отдельно; где различие (т.е., различие по меньшей мере в две раза) в активности передачи сигналов в клетке, приведенной в контакт с комбинацией эталонного соединения, показывает, что модулирующее соединение-кандидат представляет собой соединение, которое модулирует активность опосредованного GPR174 пути передачи сигналов.

В соответствии с этим аспектом настоящего изобретения, эталонное соединение, как известно, модулирующее по меньшей мере один опосредованный GPR174 путь передачи сигналов, содержит структуру в соответствии с любой из формул I, II, III, IV, V или VI (или (I), (II), (III), (IV), (V), (Va) или (VI)), описанных в настоящем описании. В одном варианте осуществления, эталонное соединение, как известно, модулирующее по меньшей мере один

опосредованный GPR174 путь передачи сигналов, представляет собой любое из соединений 1-59, представленных в таблице 1.

Термин «эталонное соединение, включающее поддающуюся детекции группу», относится к эталонному соединению, которое модифицировано для включения, или ковалентно связано с любой поддающейся детекции группой, пригодной для обеспечения считывания связанного с GPR174 эталонного соединения в любом из широкого множества различных форматов анализа связывания, хорошо известных специалисту в данной области, включая, но без ограничения, использование радиоактивных изотопов, флуоресценцию, поляризацию флуоресценции (FP), резонансный перенос энергии флуоресценции (FRET), биолюминесценцию, резонансный перенос энергии биолюминесценции (BRET), хемилюминесценцию, фотоаффинное мечение, флуорометрию с временным разрешением (TRF) и т.п. Например, в одном варианте осуществления, эталонное соединение является меченым молекулярной меткой(метками), включающими радиоактивный изотоп, такой как ^{125}I , ^{14}C , ^3H , ^{11}C , ^{18}F $^{99\text{m}}\text{Tc}$, или другую пригодную радиометрическую метку. В другом варианте осуществления, эталонное соединение является меченым флуоресцентной меткой, такой как 6-карбоксифлуоресцеин (FAM), Alexa Fluor® (Molecular Probes, Inc), флуоресцеинизотиоцианат (FITC) и т.п. В другом варианте осуществления, эталонное соединение является меченым биолюминесцентной или хемилюминесцентной меткой, такой как изолуминол, или сложный эфир акридиния, или ферментной меткой, такой как пероксидаза хрена (HRP) или щелочная фосфатаза (AP) для дополнительного усиления считывания с использованием улучшенных субстратов для хемилюминесценции (ECL). В другом варианте осуществления, эталонное соединение является ковалентно связанным с высокоаффинной связывающей молекулой, такой как биотин, чтобы использовать различные связанные со стрептавидином метки или ферменты, как описано выше.

В соответствии с одним вариантом осуществления этого аспекта настоящего изобретения, анализ связывания включает приведение в контакт клетки, экспрессирующей GPR174, или происходящей из нее клеточной мембраны, по меньшей мере с одним модулирующим соединением-кандидатом и эталонным соединением, включающим поддающуюся детекции группу. Как правило, клетки, экспрессирующие GPR174, культивируют с использованием стандартных способов культивирования клеток до 80-90% конфлюэнтности и затем используют для получения цельных клеток, препаратов разрушенных клеток или препаратов мембраны клетки, которые затем замораживают при -80°C . Альтернативно, цельные клетки или препараты клеток можно использовать свежими, без замораживания. Препараты клеток или мембраны, размороженные или используемые свежими, инкубируют с оптимальной концентрацией эталонного соединения (суррогатного лиганда) (например, от 0,01 до 10000 нМ) в присутствии или в отсутствие различных концентраций конкурентного соединения-кандидата (т.е., модулирующего средства-кандидата), предпочтительно, в многолуночном формате. После инкубации в подходящем

буфере для связывания в течение подходящего времени (т.е., от 10 минут до 2 часов) при подходящей температуре (т.е., ~20-37° С), клетки переносят в многолуночный планшет для фильтрования и промывают множество раз холодным буфером для промывки. Связанное эталонное соединение, включающее поддающуюся детекции группу, измеряют с использованием подходящего устройства для предоставления считывания аффинности связывания. Альтернативно, связанное эталонное соединение можно отделять от свободного соединения посредством множества способов разделения, включая центрифугирование, диализ, связывание со смолой, и различные типы хроматографии (аффинную, тонкослойную, ионообменную, HPLC, FPLC и т.д.). При использовании технологий гомогенного анализа, стадии разделения, промывки можно исключать. Количество связанного меченого эталонного соединения оценивают для детекции диссоциации меченого эталонного соединения от GPR174 после инкубации с модулирующим средством-кандидатом(кандидатами), по сравнению с контрольными лунками, инкубированными в отсутствие модулирующего средства-кандидата(кандидатов).

Избыток немеченого эталонного соединения (суррогатного лиганда) можно использовать для оценки неспецифического связывания (NSB) в лунках отрицательного контроля (без добавленного конкурентного средства), и лунки положительного контроля (без добавленного конкурентного средства) используют для определения максимального сигнала от меченого суррогатного лиганда. Процент активности рассчитывают как $100 \times (\text{сигнал с конкурентным средством} - \text{NSB}) / (\text{Положительный контроль} - \text{NSB})$ для каждой используемой концентрации конкурентного средства, и значения IC_{50} (концентрации конкурентного средства, приводящей к 50% активности) получают с использованием подходящей модели подбора кривой, такой как 4- или 5-параметрический логистический подбор, уравнение Хилла, или другие уравнения, основанные на моделях данных насыщения связывания. В одном варианте осуществления, анализ придают конфигурацию таким образом, что значения IC_{50} отражают константы диссоциации для ингибирующих молекул (например, $IC_{50} = K_i(1 + [\text{эталонное соединение}]/K_D)$, где $[\text{эталонное соединение}] \ll K_D$). В случаях, когда конкурентное ингибирование является слабым, и значение IC_{50} невозможно получить, значения регистрируют как $>$ наивысшей тестированной концентрации. Соединения рассматривают как «активные конкурентные средства», когда % активности при наивысшей тестированной концентрации является значимо меньшим ($P \geq 95\%$, $n=3$), чем 100% активность. В других случаях, таких как положительная аллостерическая модуляция, связывание можно характеризовать по EC_{50} (половине максимальных эффективных концентраций), превышающим связывание эталонного соединения отдельно из-за увеличенной аффинности и/или доступности участков связывания. В случаях, когда значения EC_{50} невозможно получить для положительных модуляторов, соединения рассматривают как «активные положительные модуляторы», когда % активности при наивысшей тестированной концентрации является

значимо большим ($P \geq 95\%$, $n=3$), чем 100%.

В одном варианте осуществления, идентифицированные модулирующие средства представляют собой низкомолекулярные соединения, которые конкурентно связываются с такой же областью GPR174, что и эталонное соединение, и для которых показывают соответствующую кривую зависимости от дозы при использовании для конкуренции с эталонным соединением (суррогатным лигандом), с полученной $IC_{50} < 100$ мкМ, или более предпочтительно, $IC_{50} < 10$ мкМ.

Как описано в настоящем описании, авторы настоящего изобретения идентифицировали химические соединения (т.е., суррогатные лиганды), которые функционально взаимодействуют с GPR174 и ингибируют один или несколько опосредованных GPR174 путей передачи сигналов и, кроме того, имеют охарактеризованный профиль передачи сигналов рецептора GPR174, который включает Gs-путь передачи сигналов. В настоящее время, имея идентифицированные соединения, которые модулируют GPR174, эти новые идентифицированные суррогатные лиганды для GPR174 можно использовать как эталонные соединения в конкурентных анализах связывания, описанных в настоящем описании, с использованием общепринятых способов, известных специалисту в данной области, для идентификации дополнительных соединений, которые связываются с точной представляющей интерес областью на GPR174, для использования в модуляции опосредованной GPR174 передачи сигналов. Как хорошо известно в данной области, анализы связывания являются способными к детекции конкурентных, так же как не-конкурентных или неконкурентных ингибиторов. Эти анализы связывания могут также детектировать аллостерические модуляторы, которые могут стимулировать или ингибировать связывание с аддитивными или синергическими эффектами.

В соответствии с вышеуказанным, в одном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к способу применения низкомолекулярного химического соединения для ингибирования опосредованного GPR174 пути передачи сигналов в клетке, включающему стадии: (а) предоставления низкомолекулярного химического соединения, которое функционально взаимодействует с GPR174 и ингибирует опосредованный GPR174 путь передачи сигналов (например, путь Gs) в клетках, экспрессирующих GPR174, где указанное соединение характеризуется по меньшей мере одним из следующих критериев:

указанное соединение имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из формулы I, II, III, IV, V или VI (или (I), (II), (III), (IV), (V), (Va) или (VI)); или

указанное соединение изменяет аффинность связывания любого из эталонных соединений 1-59 (как указано в таблице 1) с GPR174; или

указанное соединение вызывает различие в модулирующей активности любого из эталонных соединений 1-59 (как указано в таблице 1), в анализе опосредованного GPR174 пути передачи сигналов, при тестировании в присутствии указанного эталонного соединения по сравнению с модулирующей активностью эталонного соединения отдельно;

и

приведения в контакт клетки, экспрессирующей GPR174, которая включает опосредованный GPR174 путь передачи сигналов, с указанным соединением в соответствии со стадией (а), таким образом, модуляции опосредованного GPR174 пути передачи сигналов в указанной клетке.

В некоторых вариантах осуществления, соединение изменяет (т.е., увеличивает или уменьшает) аффинность связывания любого из эталонных соединений 1-59 с GPR174, в соответствии с критериями (ii). В некоторых вариантах осуществления, соединение уменьшает (т.е., ингибирует) аффинность связывания любого из эталонных соединений 1-59 с GPR174. В некоторых вариантах осуществления, соединение конкурентно ингибирует (т.е., уменьшает аффинность связывания) по меньшей мере одного из эталонных соединений 1-59 с GPR174. В некоторых вариантах осуществления, соединение увеличивает аффинность связывания (усиливает связывание) любого из эталонных соединений 1-59 с GPR174.

В соответствии с вышеуказанным, в одном варианте осуществления, настоящее изобретение относится к способу применения низкомолекулярного химического соединения для ингибирования опосредованного GPR174 пути передачи сигналов в клетке, где указанный способ включает стадии: (а) предоставления низкомолекулярного химического соединения, которое функционально взаимодействует с GPR174 и ингибирует опосредованный GPR174 путь передачи сигналов (например, путь Gs) в клетках, экспрессирующих GPR174, где указанное соединение характеризуется по меньшей мере одним из следующих критериев:

указанное соединение имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из формулы I, II, III, IV, V или VI (или (I), (II), (III), (IV), (V), (Va) или (VI)); или

указанное соединение изменяет кажущуюся аффинность связывания любого из эталонных соединений 1-59 (как указано в таблице 1) с GPR174; или

указанное соединение вызывает различие в модулирующей активности любого из эталонных соединений 1-59 (как указано в таблице 1), в анализе опосредованного GPR174 пути передачи сигналов, при тестировании в присутствии указанного эталонного соединения, по сравнению с модулирующей активностью эталонного соединения отдельно;

и

приведения в контакт клетки, экспрессирующей GPR174, которая включает опосредованный GPR174 путь передачи сигналов, с указанным соединением в соответствии со стадией (а), таким образом, модуляции опосредованного GPR174 пути передачи сигналов в указанной клетке.

В некоторых вариантах осуществления, соединение изменяет (т.е., увеличивает или уменьшает) кажущуюся аффинность связывания любого из эталонных соединений 1-59 с GPR174, в соответствии с критериями (ii). В некоторых вариантах осуществления, соединение уменьшает кажущуюся аффинность связывания любого из эталонных

соединений 1-59 для GPR174. В некоторых вариантах осуществления, соединение конкурентно связывается с GPR174 (т.е., имеет более высокую аффинность связывания), по сравнению с по меньшей мере одним из эталонных соединений 1-59, с GPR174. В некоторых вариантах осуществления, соединение не-конкурентно или неконкурентно связывается с GPR174 (т.е., связывается с аллостерическим участком и уменьшает кажущуюся аффинность связывания), по сравнению с по меньшей мере одним из эталонных соединений 1-59, с GPR174. В некоторых вариантах осуществления, соединение увеличивает аффинность связывания (т.е., усиливает связывание и является положительным аллостерическим модулятором) любого из эталонных соединений 1-59 с GPR174.

В другом варианте осуществления, настоящее изобретение относится к соединению, включающему поддающуюся детекции группу, где соединение содержит структуру в соответствии с любой из формул I, II, III, IV, V или VI (или (I), (II), (III), (IV), (V), (Va) или (VI)), описанных в настоящем описании, и модулирует опосредованный GPR174 путь передачи сигналов (например, путь Gs). В одном варианте осуществления, соединение, включающее поддающуюся детекции группу, содержит структуру в соответствии с любым из соединений 1-59, описанных в таблице 1. В одном варианте осуществления, поддающаяся детекции группа представляет собой по меньшей мере одну из радиоактивного изотопа(изотопов), флуоресцентной метки, хемилюминесцентной метки, биолюминесцентной метки или фотоаффинной метки. В одном варианте осуществления, эталонное соединение содержит радиоактивный изотоп, выбранный из группы, состоящей из ^{125}I , ^{14}C , ^3H , ^{11}C , ^{18}F и $^{99\text{m}}\text{Tc}$. Соединения, имеющие структуру в соответствии с любой из формул I, II, III, IV, V или VI (или (I), (II), (III), (IV), (V), (Va) или (VI)), и дополнительно включающие поддающуюся детекции группу (например, соединения 1-59 в таблице 1), можно использовать в способах идентификации одного или нескольких модулирующих средств, способных модулировать опосредованный GPR174 путь передачи сигналов, а также можно использовать в качестве диагностических зондов для детекции присутствия или количества рецептора GPR174 в тестируемом образце *in vitro*, или в качестве зондов для молекулярной визуализации *in vivo*, например, такой как позитронная эмиссионная томография (ПЕТ).

В соответствии с вышеуказанным, в одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу идентификации модулирующего средства, способного модулировать опосредованный GPR174 путь передачи сигналов (например, а путь Gs), включающему: (a) приведение в контакт клетки с модулирующим средством-кандидатом, которое вводят в клетку, где указанная клетка экспрессирует GPR174 и включает путь передачи сигналов, и (b) определение того, модулирует ли модулирующее средство-кандидат по меньшей мере один из опосредованных GPR174 путей передачи сигналов по сравнению с клеткой, приведенной в контакт с контролем или, по сравнению с эталонным стандартом. В одном варианте осуществления, стадия (b) включает проведение анализа для детекции по меньшей

мере одного из следующего: экспрессии гена репортера транскрипции, активности ГТФазы, уровня сАМР, уровня внутриклеточного мессенджера, уровня кальция, активности нижестоящей киназы, активации транскрипции нижестоящих генов, изменения морфологии клеток, изменения скорости роста клеток, высвобождения арахидоновой кислоты, или скорости внеклеточного закисления. В одном варианте осуществления, указанное модулирующее средство-кандидат выбрано из группы, состоящей из соединения, нуклеиновой кислоты, природного экстракта и газа. В одном варианте осуществления, указанное модулирующее средство-кандидат представляет собой химическое соединение. В одном варианте осуществления, указанное химическое соединение содержит структуру в соответствии с любой из формул I, II, III, IV, V или VI (или (I), (II), (III), (IV), (V), (Va) или (VI)), описанной в настоящем описании. Например, способы в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения можно осуществлять для оценки модулирующей GPR174 активности конкретных химических соединений, включающих структуру в соответствии с любой из формул I, II, III, IV или V (или (I), (II), (III), (IV), (V), (Va) или (VI)), описанных в настоящем описании.

В одном варианте осуществления, указанное химическое соединение содержит структуру в соответствии с любой из формул (I), (II), (III), (IV), (V), (Va) или (VI), описанных в настоящем описании. Например, способы в соответствии с этим аспектом настоящего изобретения можно осуществлять для оценки модулирующей GPR174 активности конкретных химических соединений, включающих структуру в соответствии с любой из формул (I), (II), (III), (IV), (V), (Va) или (VI), описанных в настоящем описании.

Модулирующее средство-кандидат может модулировать (т.е., ингибировать или активировать) по меньшей мере один из опосредованных GPR174 путей (например, путь Gs), по сравнению с клеткой, приведенной в контакт с контролем, или по сравнению с эталонным стандартом. Активность пути передачи сигналов Gs в присутствии средства-кандидата присутствует по сравнению с активностью контроля, который может представлять собой клетку, приведенную в контакт со средством, как известно, представляющим собой модулирующее GPR174 средство, или эталонным значением, полученным для клетки, приведенной в контакт со средством, как известно, представляющим собой модулирующее GPR174 средство. Альтернативно, контроль может представлять собой активность пути передачи сигналов Gs в клетке в отсутствие средства-кандидата. Модулирующее средство-кандидат, используемое в таком анализе, может являться свободным в растворе, прикрепленным к твердой подложке, переносимым на поверхности клетки или локализованным внутри клетки, или ассоциированным с частью клетки.

В другом варианте осуществления, настоящее изобретение относится к способу идентификации модулирующего средства, способного модулировать активность опосредованного GPR174 пути передачи сигналов (например, активность пути Gs), включающему:

- (a) приведение клетки, экспрессирующей GPR174, в контакт с:
- (i) по меньшей мере одним модулирующим средством-кандидатом; и
 - (ii) эталонным химическим соединением, как известно, модулирующим активность опосредованного GPR174 пути передачи сигналов;
- (b) определение уровня активности опосредованного GPR174 пути передачи сигналов в клетке, приведенной в контакт в соответствии со стадией (a); и
- (c) сравнение уровня активности опосредованного GPR174 пути передачи сигналов в клетке, приведенной в контакт только с эталонным химическим соединением, с активностью опосредованного GPR174 пути передачи сигналов, определенного на стадии (b); где различие активности опосредованной GPR174 передачи сигналов между клеткой, содержащей модулирующее средство-кандидат в присутствии эталонного соединения, и клеткой, приведенной в контакт только с эталонным соединением, показывает, что модулирующее средство-кандидат является способным модулировать активность GPR174. В одном варианте осуществления, эталонное химическое соединение содержит структуру в соответствии с любой из формул (I), (II), (III), (IV), (V), (Va) или (VI), описанных в настоящем описании.

В одном варианте осуществления, стадия (b) содержит проведение анализа для детекции по меньшей мере одного из следующего: экспрессии гена репортера транскрипции, активности GTPазы, уровня cAMP, уровня внутриклеточного мессенджера, уровня кальция, активности нижестоящей киназы, активации транскрипции нижестоящих генов, изменения морфологии клеток, изменения скорости роста клеток, высвобождения арахидоновой кислоты или скорости внеклеточного закисления. В одном варианте осуществления, указанное модулирующее средство-кандидат выбрано из группы, состоящей из соединения, нуклеиновой кислоты, природного экстракта и газа. В одном варианте осуществления, указанное соединение представляет собой химическое соединение.

Анализы для использования в соответствии со способами скрининга по настоящему изобретению, могут измерять выход передачи сигналов белка GPCR посредством детекции, например, активности GTPазы, уровней внутриклеточного мессенджера, активности нижестоящей киназы или активации транскрипции нижестоящих генов. Выбор анализа может зависеть от пути передачи сигналов, активируемого посредством белка GPCR, и потребностей пользователя.

Как правило, для образцов или анализов, включающих белки GPR174, проводят обработку с использованием модулирующего средства-кандидата, такого как соединение-кандидат. Эти образцы затем сравнивают с контрольными образцами, не обработанными соединением-кандидатом, и необязательно, обработанными контрольным средством для проверки эффекта на активность GPR174, в случае агонистов. Контрольным образцам (необработанным, например, активаторами, ингибиторами, агонистами, обратными агонистами или антагонистами) приписывают значение относительной активности белка

100%. Активность ингибитора, такого как антагонист или обратный агонист, как правило, определяют в присутствии агониста или лиганда, такого как агонисты GPR174, описанные в настоящем описании, или можно определять в исследованиях сверхэкспрессии. Ингибирования GPR174 достигают, когда значение активности, по сравнению с контролем, составляет приблизительно 80%, предпочтительно, приблизительно 50%, и более предпочтительно, приблизительно 25-0%, в зависимости от тестируемых состояний. Активации GPR174 достигают, когда значение активности, по сравнению с контролем (необработанными активаторами или агонистами) составляет по меньшей мере 110%, более предпочтительно, 150%, более предпочтительно, 200-500% (т.е., в два- - пять раз выше, по сравнению с контролем), и более предпочтительно, на 1000-3000% выше. В некоторых вариантах осуществления, в способах используют эталонный стандарт, который может представлять собой числовое значение (например, пороговое значение), определенное посредством усреднения множества контрольных образцов (необработанных, например, активаторами, ингибиторами, агонистами, обратными агонистами или антагонистами).

1. Анализ репортера транскрипции

Поддающиеся анализу репортерные белки, такие как люцифераза, предоставляют полезный инструмент для анализа активности GPCR, измеренной посредством анализа репортера транскрипции. Клетки (например, клетки НЕК293, клетки CHO или клетки COS 7) подвергают временной совместной трансфекции как экспрессирующей GPR174 конструкцией, так и репортерной конструкцией, которая включает кДНК для репортерного белка ниже участка связывания фактора транскрипции, такого как элемент ответа на cAMP (CRE), AP-1, элемент ответа сыворотки (SRE), или участки связывания NFAT или фактора ответа сыворотки (SRF). Связывание агониста с рецепторами, сопряженными с подтипом Gs G-белков, приводит к увеличению уровня cAMP, таким образом, активации фактора транскрипции CRE и получению в результате экспрессии репортерного гена. Связывание агониста с рецепторами, сопряженными с подтипом Gs G-белков, приводит к продукции диацилглицерина, который активирует протеинкиназу C, что приводит к активации факторов транскрипции SRE, AP-1 NFAT, SRF и CRE, в свою очередь получая в результате экспрессию репортерного гена. Активацию Gi можно детектировать посредством репортерной системы CRE, если необходимо, посредством сначала инкубации клеток с форсколином или т.п. для увеличения внутриклеточных уровней cAMP. Экспрессию Gi можно также детектировать посредством использования химерных белков Gq и Gs. Активацию G12/13 можно детектировать посредством репортерных генов SRF и SRE. Уровни экспрессии репортерного белка отражают статус активации событий передачи сигналов. См., например, George et al., *J. Biomol. Screen.* 2:235-40 (1997) и Stratowa et al., *Curr. Opin. Biotechnol.* 6:574-81 (1995). Проводят сравнения с клетками, трансфицированными экспрессирующей GPR174 конструкцией или контрольной экспрессирующей конструкцией, для определения степени ингибирования или активации активности GPR174.

Для оценки активности GPR174, клетки подвергают временной совместной трансфекции как экспрессирующей GPR174 конструкцией, так и репортерной конструкцией, которая включает кДНК для репортерного белка ниже от участков связывания факторов транскрипции, т.е., SFE, NFAT, SRE, SRF или CRE. Проводят сравнение с клетками, трансфицированными экспрессирующей GPR174 конструкцией или контрольной экспрессирующей конструкцией для определения степени ингибирования или активации активности GPR174.

2. Безметочное биосенсорное измерение активации GPCR

Измерение активности GPCR приводит к изменениям в морфологии клеток, которые можно детектировать с использованием биосенсоров. Такие системы не требуют меченя либо белка GPCR, либо тестируемого соединения. Морфологию клеток можно детектировать с использованием либо измерения сопротивления, либо оптических сигналов. См., например, Fang et al., *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 11:357-68, 2008 и Peters et al., *Assay Drug Dev. Technol.* 8:219-27, 2010. Системы для измерения сопротивления включают, например, систему CellKey™ (MDS Sciex, South San Francisco, CA). Измерение оптических сигналов обеспечивают посредством системы Epic™ (Corning, NY) или системы анализа BIND® (SRU Biosystems, Inc.). Эти системы требуют лиганда или суррогатного лиганда для детекции активации специфического белка GPCR. Клетки, экспрессирующие представляющий интерес белок GPCR, т.е., GPR174, приводят в контакт с лигандом или суррогатным лигандом и мониторируют по изменениям сопротивления или оптического сигнала. Проводят сравнение с клетками, которые не обрабатывают лигандом или суррогатным лигандом.

3. Анализ связывания меченого лиганда или суррогатного лиганда

Клетки анализируют по их способности специфически связывать лиганд GPR174 или суррогатный лиганд, например, ингибитор или активатор. Клетки, которые временно или стабильно экспрессируют белок GPR174, выращивают до субконфлюэнтности, собирают из флаконов в PBS и осаждают. Осадки клеток гомогенизируют. Гомогенат центрифугируют при 47000 g в течение 15 минут. Осадок мембраны ресуспендируют в 1 мл ткани. Аликвоту препарата мембраны используют для определения концентрации белка. Для измерения насыщения связывания, мембраны клеток инкубируют с различными концентрациями меченого лиганда или суррогатного лиганда. Неспецифическое связывание определяют посредством включения немеченого лиганда или суррогатного лиганда. После инкубации для связывания, содержимое планшетов собирают на фильтры GF/C, предварительно смоченные в 0,3% обезжиренном сухом молоке. Фильтры высушивают и подсчитывают в сцинтилляционном счетчике 96-луночных микропланшетов. Рассчитывают значения K_d .

4. Анализ связывания GTP γ S

Поскольку сопряженные с G-белком рецепторы, такие как GPR174, передают сигнал через внутриклеточные G-белки, активность которых включает связывание и гидролиз

GTP, для получения связанного GDP, измерение связывания не поддающегося гидролизу аналога GTP [^{35}S]-GTP γS в присутствии и в отсутствие ингибиторов или активаторов - кандидатов, обеспечивает другой анализ активности GPR174. См., например, Kowal et al., *Neuropharmacology* 37:179-187 (1998). В одном иллюстративном анализе, клетки, стабильно трансфицированные экспрессирующим GPR174 вектором, выращивают в 10-см культуральных чашках до субконфлюэнтности, промывают один раз 5 мл ледяного не содержащего $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ фосфатно-солевого буфера, и снимают скребком в 5 мл такого же буфера. Клетки осаждают посредством центрифугирования (500 g, 5 минут), ресуспендируют в буфере TEE (25 mM Трис, pH 7,5, 5 mM EDTA, 5 mM EGTA), и замораживают в жидком азоте. После размораживания, клетки гомогенизируют с использованием гомогенизатора Даунса (1 мл TEE на планшет с клетками) и центрифугируют при 1000 g в течение 5 минут для удаления ядер; и неразрушенных клеток.

Супернатант гомогената центрифугируют при 20000 g в течение 20 минут для выделения мембранной фракции, и осадок мембран промывают один раз с использованием TEE и ресуспендируют в буфере для связывания (20 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA). Ресуспендированные мембраны можно замораживать в жидком азоте и хранить при -70°C до использования. Аликвоты мембран клеток, полученные, как описано выше, и сохраняемые при -70°C , размораживают, гомогенизируют и разводят. Конечные гомогенаты инкубируют с различными концентрациями соединений-кандидатов или гуанозин-5'-трифосфата (GTP) в течение 30 минут при 30°C и затем помещают на лед. К каждому образцу, гуанозин 5'-0-(3[^{35}S тию)трифосфат (NEN, 1200 Ки/ммоль; [^{35}S]-GTP γS) добавляют до конечной концентрации 100-200 пМ. Образцы инкубируют при 30°C в течение дополнительных 30 минут, добавляют 1 мл 10 mM HEPES, pH 7,4, 10 mM MgCl_2 , при 4°C , и реакцию останавливают посредством фильтрации.

Образцы фильтруют через фильтры Whatman GF/B, и фильтры промывают 20 мл ледяного 10 mM HEPES, pH 7,4, 10 mM MgCl_2 . Фильтры подсчитывают посредством жидкостной сцинтилляционной спектроскопии. Неспецифическое связывание [^{35}S]-GTP γS измеряют в присутствии GTP и вычитают из суммарного. Проводят сравнение с нетрансфицированными контрольными клетками для определения изменения активности GPR174.

5. Измерение внутриклеточного кальция с использованием FLIPR

Изменения уровней внутриклеточного кальция являются другим известным показателем активности сопряженного с G-белком рецептора, и такие анализы можно использовать для скрининга модуляторов активности GPR174. В одном конкретном примере такого анализа, клетки млекопитающих, стабильно трансфицированные экспрессирующим GPR174 вектором, засевают при плотности 40000 клеток/луночку в 96-луночных планшетах, специально разработанных для различения флуоресцентных сигналов, испускаемых из различных лунок на планшете. Клетки инкубируют в течение 60 минут при 37°C в модифицированном способом Дульбекко PBS, содержащем пируват и 1

г/л глюкозы с добавлением 1% эмбриональной бычьей сыворотки и индикаторного красителя для кальция, такого как Fluo-3™ AM, Fluo-4™ AM, Calcium Green™-1 AM, или Oregon Green™ BAPTA-1 AM. Планшеты промывают один раз модифицированным способом Дульбекко PBS без 1% эмбриональной бычьей сыворотки и инкубируют в течение 10 минут при 37°C для удаления остаточного красителя из клеточной мембраны. Ответ кальция инициируют посредством добавления одного или нескольких ингибиторов или активаторов GPR174 - кандидатов, ионофора кальция A23187 (положительного контроля), или АТР (положительного контроля). Флуоресценцию измеряют посредством устройства Molecular Device's FLIPR с аргоновым лазером (возбуждение 144 при 488 нм). См., например, Kuntzweiler et al., *Drug Dev. Res.* 44:14-20 (1998). Проводят сравнение с нетрансфицированными контрольными клетками для определения изменения активности GPR174.

6. Анализы экворина

Белок экворин предоставляет другой способ для измерения внутриклеточного кальция после активации пути передачи сигналов Gq. В присутствии кофактора коэлентеразина, экворин может испускать поддающуюся измерению люминесценцию, которая является пропорциональной количеству внутриклеточного (цитоплазматического) свободного кальция. См., например, Cobbold et al. «*Aequorin measurements of cytoplasmic free calcium*», In: McCormack J. G. и Cobbold P. H., eds., *Cellular Calcium: A Practical Approach*. Oxford: IRL Press (1991); Stables et al., *Anal. Biochem.* 252:115-26 (1997); и Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Sixth edition. Eugene Ore.: Molecular Probes (1996).

В типичном анализе, клетки млекопитающих подвергают временной совместной трансфекции как экспрессирующей GPR174 конструкцией, так и конструкцией, кодирующей фотобелок апоэкворин. Клетки культивируют в течение двадцати четырех часов при 37°C, например, в MEM (Gibco/BRL, Gaithersburg, MD), дополненной 10% эмбриональной бычьей сывороткой, 2 mM глутамином, 10 ед./мл пенициллина и 10 мкг/мл стрептомицина, в это время среду заменяют на бессывороточную среду, содержащую коэлентеразин (Molecular Probes, Eugene, OR). Клетки инкубируют в течение двух дополнительных часов при 37°C. Затем, клетки открепляют от планшета, промывают, и ресуспендируют при 200000 клеток/мл в бессывороточной MEM.

Ингибиторы или активаторы GPR174 получают в бессывороточной MEM и распределяют в лунках непрозрачного 96-луночного планшета для анализа. Затем планшеты загружают в люминометр MLX для микропланшетов для титрования (Dynex Technologies, Inc., Chantilly, VA). Устройство программируют для распределения суспензий клеток в каждую лунку, одну лунку за один раз, и немедленно считывают люминесценцию в течение 15 секунд. Кривые зависимости ответа от дозы для ингибиторов или активаторов GPR174 конструируют с использованием площади под кривой для каждого пика светового сигнала. Данные анализируют и получают значения EC₅₀. Изменения люминесценции,

вызванные соединениями, показывают изменения активности GPR174.

7. Высвобождение арахидоновой кислоты

Наблюдали также, что активация GPCR активирует высвобождение арахидоновой кислоты в клетках, предоставляя другой полезный анализ для идентификации ингибиторов или активаторов активности GPCR. См., например, Kanterman et al., *Mol. Pharmacol.* 39:364-9 (1991). Например, клетки CHO, стабильно трансфицированные экспрессирующим GPR174 вектором, рассеивают в 24-луночные планшеты при плотности 15000 клеток/лунку и выращивают в среде MEM, дополненной 10% эмбриональной бычьей сывороткой, 2 mM глутамином, 10 ед./мл пенициллина и стрептомицина в течение 48 часов при 37°C перед использованием. Клетки из каждой лунки метят посредством инкубации с [³H]-арахидоновой кислоты (Amersham Corp., 210 Ки/ммоль) в течение 2 часов при 37°C. Затем клетки промывают дважды 1 мл буфера. Соединения-кандидаты добавляют в 1 мл такого же буфера, либо отдельно, либо с АТФ, и клетки инкубируют при 37°C в течение 30 минут. Буфер отдельно и подвергнутые ложной трансфекции клетки используют в качестве контроля. Образцы (0,5 мл) из каждой лунки подсчитывают посредством жидкостной сцинтилляционной спектроскопии.

8. Скорость внеклеточного закисления

В другом анализе, эффекты ингибиторов или активаторов-кандидатов на активность GPCR анализируют посредством мониторинга внеклеточных изменений pH, индуцированных тестируемыми соединениями. См., например, Dunlop et al., *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 40:47-55 (1998). В одном варианте осуществления, клетки, трансфицированные экспрессирующим GPCR вектором, рассеивают в 12-мм чаши капсул (Molecular Devices Corp.) при 400000 клеток/чашу в MEM, дополненной 10% эмбриональной бычьей сывороткой, 2 mM L-глутамином, 10 ед./мл пенициллина и 10 мкг/мл стрептомицина. Клетки инкубируют в этой среде при 37°C в 5% CO₂ в течение 24 часов. Скорость внеклеточного закисления измеряют с использованием микрофизиометра Cytosensor (Molecular Devices Corp.). Агонисты-кандидаты или другие средства разводят в рабочем буфере и пропускают посредством перфузии через второй путь жидкости. pH рабочего буфера в сенсорной камере регистрируют в течение цикла из 43-58 секунд, и насос повторно запускают через 60 секунд для начала следующего цикла. Скорость закисления рабочего буфера в течение времени регистрации рассчитывают посредством программы Cytosoft. Изменения скорости закисления рассчитывают посредством вычитания исходного значения (среднего из четырех измерений скорости непосредственно перед добавлением соединения-кандидата) из наивысшего измерения скорости, полученного после добавления соединения-кандидата.

9. Анализы cAMP

В одном типе анализа, уровни циклического аденозинмонофосфата (cAMP) измеряют в клетках, трансфицированных экспрессирующим GPCR вектором. Экспрессирующие GPCR клетки подвергают воздействию соединений-кандидатов.

Протоколы анализов cAMP описаны в литературе. См., например, Sutherland et al., *Circulation* 37:279-306, 1968; Frandsen et al., *Life Sci.* 18:529-41, 1976; Dooley et al., *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 283:735-41, 1997; и George et al., *J. Biomol. Screen.* 2:235-40, 1997. Дополнительные протоколы, описывающие анализы cAMP, включают: Hill et al., *Br. J. Pharmacol.* 161(6): 1266-1275, 2010; Smith et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 41(3):189-218, 1993; и Berrega et al., *Handb. Exp. Pharmacol.* (186):285-98, 2008. Иллюстративный протокол такого анализа, с использованием анализа активации аденилилциклазы FlashPlate® от NEN® Life Science Products, указан ниже.

Кратко, кодирующую GPCR последовательность (например, кДНК или не содержащую интронов геномную ДНК) субклонировать в экспрессирующий вектор и временно трансфицируют в линию клеток-хозяев, например, клетки яичника китайского хомяка (CHO), с использованием известных способов. Трансфицированные клетки CHO засевают в 96-луночные микропланшеты из микропланшетов FlashPlate® (покрытые твердым сцинтиллятором, с которым связана антисыворотка против cAMP). Для контроля, в некоторые лунки засевают клетки CHO дикого типа (нетрансфицированные). В другие лунки в планшете вводят различные количества стандартного раствора cAMP для использования в получении стандартной кривой.

Одно или несколько тестируемых соединений (т.е., ингибиторов или активаторов - кандидатов) добавляют к клеткам в каждой лунке, где вода и/или не содержащие соединения среда/разбавитель служат в качестве контроля или контролей. После обработки, cAMP позволяют накапливаться в клетках в течение точно 15 минут при комнатной температуре. Анализ останавливают посредством добавления буфера для лизиса, содержащего меченый cAMP, и планшет подсчитывают с использованием сцинтилляционного счетчика для 96-луночных микропланшетов Packard Topcount®. Немеченый cAMP из лизированных клеток (или из стандартов) и фиксированные количества cAMP конкурируют за связывание с антителом, связанным с планшетом. Конструируют стандартную кривую, и значения cAMP для неизвестных точек получают посредством интерполяции. Изменения внутриклеточных уровней cAMP клеток в ответ на воздействие тестируемого соединения являются показательными для активности ингибирования или активации GPCR. Можно использовать другие анализы для детекции уровней cAMP, например, детекции меченого cAMP.

Кроме того, множество других наборов для измерения уровней cAMP являются коммерчески доступными, например, набор для детекции cAMP посредством прямого иммуноанализа от Abcam (кат. No. ab138880), набор для детекции cAMP LANCE® от Perkin Elmer, набор для прямого ELISA cAMP от Enzo Life Sciences, Inc., и набор для флуоресцентного анализа cAMP CatchPoint® от Molecular Devices.

В некоторых вариантах осуществления, уровень cAMP уменьшен по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 75% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов

GPR174, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором.

10. Экспрессия белка GPR174

Рекомбинантные полипептиды GPR174, либо полноразмерные, либо их фрагменты, можно получать с использованием стандартных способов, известных в данной области. Эти белки можно затем использовать в анализах, описанных в настоящем описании. В частности, такие рекомбинантные полипептиды GPR174, например, можно использовать в анализах *in vitro* для идентификаторов ингибиторов или активаторов GPR174. Рекомбинантная продукция может происходить в клетках-хозяевах или в бесклеточных системах трансляции, как известно в данной области.

Типичные экспрессирующие слитые белки векторы включают pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith et al., *Gene* 67:31-40, 1988), pMAL (New England Biolabs, Ipswich, MA), pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.) и pFUSE (Invivogen, San Diego, CA), в которых сливают глутатион-S-трансферазу (GST), связывающий мальтозу E белок, белок A, или IgG Fc, соответственно, с рекомбинантным белком мишенью.

Если полипептид GPR174 подлежит экспрессии для использования в анализах скрининга, его можно продуцировать на поверхности клетки. В этом случае, клетки можно собирать перед использованием в анализе скрининга. Если полипептид секретируется в среду, среду можно выделять для выделения и очистки полипептида. При внутриклеточной продукции, клетки необходимо сначала лизировать до выделения полипептида.

Рекомбинантные полипептиды (или альтернативно, полипептиды GPR174, выделенные из организма) можно нацеливать на мембрану клетки. Связанный с мембраной GPR174 можно получать посредством экспрессии GPR174 в подходящей клетке или линии клеток, например, клетках *Pichia pastoris*, ооцитах или клетках COS. Мембраны, содержащие рекомбинантный полипептид, можно затем выделять из других клеточных компонентов стандартными способами, известными в данной области.

11. Анализы активности киназы

В другом типе анализа, можно измерять активность киназ ниже GPR174 в пути передачи сигналов, например, пути передачи сигналов Gs. Киназы ниже GPR174 включают, но без ограничения, PKA, и активность одной или нескольких из киназ ниже GPR174 можно модулировать в присутствии ингибитора GPR174. Например, активность протеинкиназы A (PKA) можно использовать для определения изменений в опосредованном GPR174 пути передачи сигналов Gs, поскольку cAMP, уровень которого подвергается модуляции посредством передачи сигналов Gs, активирует PKA. Протоколы для анализов PKA описаны в литературе. См., например, Karege et al., *Brain Res.* 903(1-2):86-93, 2001. Множество наборов также являются коммерчески доступными для измерения активности PKA, включая анализ набор для анализа активности киназы cPKA от Abcam (кат. No. ab139435), набор для колориметрического анализа активности PKA от Life Technologies Corporation и набор для анализа активности киназы PKA от Enzo Life Sciences, Inc. Эти и

сходные анализы можно использовать, например, для сравнения различия активности PKA между клетками, трансфицированными экспрессирующим GPCR вектором и подвергнутыми воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, и клетками, трансфицированными экспрессирующим GPCR вектором, но не подвергнутыми воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, активность PKA уменьшена по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 75% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором.

12. Анализы продукции цитокинов

Уровень цитокинов, таких как IL-2, можно модулировать посредством уровней cAMP и передачи сигналов Gs. Анализы, которые измеряют уровень одного или нескольких цитокинов, можно использовать для определения изменений в опосредованном GPR174 пути передачи сигналов Gs. Уровень одного или нескольких цитокинов можно измерять посредством сэндвич-иммуноанализа ELISA. Например, IL-2 и IFN- γ можно измерять с использованием наборов для ELISA от ThermoFisher Scientific. Уровень одного или нескольких цитокинов можно также измерять с использованием иммуноанализов на основе бусин, в которых используют бусины, специфические для различных цитокинов, которые различают по размеру и по интенсивности флуоресценции с использованием проточной цитометрии. Наборы для анализа на основе бусин также являются коммерчески доступными, например, панель Th-цитокинов человека LEGENDplex™ от BioLegend позволяет одновременное измерение IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, GM-CSF, IFN- γ и TNF- α . Альтернативно, эти цитокины можно также детектировать в супернатантах с использованием платформы MSD (MesoScale).

Можно также определять внутриклеточные уровни цитокинов. Например, мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) можно обрабатывать реагентом BD GolgiStop (BD Biosciences) для блокирования везикулярного транспорта и для вызова накопления заполненных внутриклеточным цитокином секреторных везикул. Эти клетки можно затем окрашивать с использованием флуоресцентных антител по специфическим для типа клеток поверхностным маркерам и антителам против специфических цитокинов (например, от BioLegend), таких как IL-2, IL-10, GM-CSF, IFN- γ и TNF- α . Окрашенные клетки можно анализировать посредством проточной цитометрии для определения уровня одного или нескольких цитокинов.

Эти и сходные анализы можно использовать, в качестве другого примера, для сравнения различий уровня одного или нескольких цитокинов между популяцией PBMC, подвергнутых воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174 и популяцией PBMC, но не подвергнутых воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, уровень одного или нескольких цитокинов уменьшен по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 80% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, по сравнению с популяцией PBMC, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, уровень IL-17A уменьшен по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 80% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, по сравнению с популяцией PBMC, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, уровень одного или нескольких цитокинов увеличен по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50%, или по меньшей мере на 80% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39 и/или ингибитора CD73, по сравнению с популяцией PBMC, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, цитокин выбран из IL-2, IFN- γ , TNF и GM-CSF.

В некоторых вариантах осуществления, уровень одного или нескольких цитокинов увеличен по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 500% или по меньшей мере на 1000% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39 и/или ингибитора CD73, по сравнению с популяцией PBMC, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, цитокин выбран из IL-2, IFN- γ , TNF, GM-CSF, IL-6, IL-12, IL-17A и IL-10. В некоторых вариантах осуществления, уровень одного или нескольких из IL-2, IFN- γ , TNF или GM-CSF увеличена по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 500% или по меньшей мере на 1000% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39 и/или ингибитора CD73, по сравнению с популяцией PBMC, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, уровень IL-2 увеличен по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 500% или по меньшей мере на 1000% в популяции PBMC, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из

антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39 и/или ингибитора CD73, по сравнению с популяцией PBMС, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, уровень IFN- γ увеличен по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100% или по меньшей мере на 500% в популяции PBMС, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39 и/или ингибитора CD73, по сравнению с популяцией PBMС, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, уровень TNF- α увеличен по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100% или по меньшей мере на 500% в популяции PBMС, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39 и/или ингибитора CD73, по сравнению с популяцией PBMС, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, уровень одного или нескольких цитокинов не подвергается модуляции и не увеличивается или не уменьшается более чем на 20% в популяции PBMС, подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, по сравнению с популяцией PBMС, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, цитокин или цитокины выбраны из группы, состоящей из: IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-17F, IL-21 и IL-22.

Кроме того, эти и сходные анализы можно использовать, например, для сравнения различия уровня одного или нескольких цитокинов между клетками, экспрессирующими GPR174 и подвергнутыми воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39 и/или ингибитора CD73, и клетками, экспрессирующими GPR174, но не подвергнутыми воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, продукция одного или нескольких цитокинов уменьшена по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 80% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором. В некоторых вариантах осуществления, продукция IL-17A уменьшена по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 80% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с

низкомолекулярным ингибитором

В некоторых вариантах осуществления, продукция одного или нескольких цитокинов увеличена по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 500% или по меньшей мере на 1000% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39 и/или ингибитора CD73, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174. В некоторых вариантах осуществления, продукция одного или нескольких из IL-2, IFN- γ , TNF или GM-CSF увеличена по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 500% или по меньшей мере на 1000% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39 и/или ингибитора CD73, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, продукция IL-2 увеличена по меньшей мере на 100%, по меньшей мере на 500% или по меньшей мере на 1000% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39 и/или ингибитора CD73, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174. В некоторых вариантах осуществления, продукция IFN- γ увеличена по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100% или по меньшей мере на 500% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39 и/или ингибитора CD73, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174. В некоторых вариантах осуществления, продукция TNF- α увеличена по меньшей мере на 50%, по меньшей мере на 100% или по меньшей мере на 500% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39 и/или ингибитора CD73, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174.

В некоторых вариантах осуществления, продукция одного или нескольких из IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-17F, IL-21 и IL-22 не подвергается модуляции и не увеличивается или не уменьшается более чем на 20% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором.

13. Анализы интернализации рецепторов

Взаимодействие GPCR-агонист в контексте живой клетки может активировать белки G и соответствующие им нижестоящие каскады передачи сигналов, так же как привлечение β -аррестинов, которое может привлекать дополнительную передачу сигналов и индуцировать интернализацию рецептора (см., например, Paterson et al. *Pharmacol Rev.* 69(3): 256-297, 2017). Существует много анализов, в которых используют привлечение аррестина и интернализацию рецептора для оценки взаимодействия агонист-рецептор или ингибирования антагонистом взаимодействия агонист-рецептор. Существуют многочисленные варианты обоих анализов, включая некоторые, которые являются коммерчески доступными. Например, Discoverx предоставляет анализы как привлечения β -аррестина, так и интернализации рецептора, и ThermoFisher Scientific и Molecular Devices поставляют анализ GPCR Tango и технологию TransFluor, соответственно, для количественной оценки привлечения β -аррестина.

В некоторых вариантах осуществления, интернализация рецептора уменьшена по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 80% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором. В некоторых вариантах осуществления, интернализация рецептора уменьшена на 1-99% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором. В некоторых вариантах осуществления, интернализация рецептора уменьшена на 1-20%, на 20-40%, 40-60%, 60-80% или на 80-99% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором.

В некоторых вариантах осуществления, привлечение β -аррестина уменьшено по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 20%, по меньшей мере на 50% или по меньшей мере на 80% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором. В некоторых вариантах осуществления, привлечение β -

аррестина уменьшено на 1-99% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором. В некоторых вариантах осуществления, привлечение β -аррестина уменьшено на 1-20%, на 20-40%, 40-60%, 60-80% или на 80-99% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором.

G. Соединения

Соединения, используемые по настоящему изобретению, включают малые молекулы. Такие соединения можно идентифицировать с использованием анализов скрининга (например, анализов, описанных в настоящем описании). Конкретные типы соединений, так же как способы получения таких соединений, описаны ниже.

1. Малые молекулы

Дополнительные ингибиторы включают большие или малые неорганические, металлоорганические или органические молекулы. В конкретных вариантах осуществления, ингибитор представляет собой малую органическую молекулу или ее производное или аналог. Такие малые молекулы предпочтительно имеют молекулярную массу ниже 2000 Дальтон, например, между 200 и 1000 Дальтон или между 400 и 700 Дальтон. Является предпочтительным, чтобы эти малые молекулы представляли собой органические молекулы. Примеры малых молекул, ингибирующих активность GPR174, описаны выше.

В конкретных вариантах осуществления, ингибитор включает защитная группа. Термин «защитная группа» относится к химическим группам, которые блокируют по меньшей мере некоторые реакционноспособные группы и предотвращают такие группы от участия в химических реакциях, пока защитная группа не будет удалена (или «отщеплена»). Примеры блокирующих/защитных групп описаны, например, в Greene and Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3rd Ed., John Wiley & Sons, New York, NY, 1999.

Любые ингибиторы могут иметь один или несколько хиральных центров, и каждый центр может существовать в R- или S- конфигурации. Ингибиторы по настоящему описанию включают все диастереомерные, энантиомерные и эписмерные формы, так же как их смеси. Стереизомеры можно получать, если желательно, способами, известными в данной области, например, такими как разделение стереоизомеров посредством хиральных хроматографических колонок. Ингибиторы, кроме того, включают N-оксиды, кристаллические формы (также известные как полиморфы) и фармацевтически приемлемые соли, так же как активные метаболиты любого ингибитора или активатора. Все таутомеры включены в объем ингибиторов или активаторов, представленных в настоящем описании. Кроме того, ингибиторы, описанные в настоящем описании, могут существовать в несольватированных, так же как сольватированных формах с фармацевтически

приемлемыми растворителями, такими как вода, этанол и т.п. Сольватированные формы ингибиторов, представленные в настоящем описании, также включены в объем настоящего изобретения. Ингибиторы могут включать меченные изотопами соединения. Изотопы, которые можно использовать, включают водород, углерод, азот, кислород, фосфор, фтор и хлор, (например, ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{18}O , ^{17}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F и ^{36}Cl). Меченные изотопами соединения можно получать посредством синтеза соединения с использованием легко доступного реагента для мечения изотопами вместо меченного отличной от изотопов меткой реагента.

В конкретном варианте осуществления, низкомолекулярный ингибитор связывается с GPR174. Малая молекула может связываться с внеклеточной или трансмембранной областью GPR174 и создавать помехи для связывания или уменьшать связывание лиганда с GPR174, таким образом, действуя в качестве ингибитора. В следующем варианте осуществления, низкомолекулярный ингибитор связывается с внеклеточной областью GPR174 и действует в качестве антагониста для ингибирования активности GPR174, т.е., передачи сигналов регулируемого ассоциированным G-белком пути передачи сигналов. В другом варианте осуществления, малая молекула представляет собой малую органическую молекулу, ингибирующую активность GPR174, т.е., передачу сигналов регулируемого ассоциированным G-белком пути передачи сигналов. Включены также другие механизмы действия, такие как положительная или отрицательная аллостерическая модуляция.

2. Полипептиды и полинуклеотиды

В конкретных вариантах осуществления, способы по настоящему изобретению осуществляют на практике с использованием пептидных или полипептидных модуляторов GPR174. Пептиды и полипептиды можно легко синтезировать или получать рекомбинантным способом с использованием общепринятых способов, известных и доступных в данной области. Например, полинуклеотиды можно использовать в качестве инструмента для экспрессии полипептида в соответствующей клетке. Способы, хорошо известные специалисту в данной области, можно использовать для конструирования экспрессирующих векторов, содержащих последовательности, кодирующие представляющий интерес полинуклеотид или полипептид и подходящие элементы для контроля транскрипции и трансляции. Эти способы включают способы рекомбинантный ДНК *in vitro*, синтетические способы и генетическую рекомбинацию *in vivo*. Такие способы описаны, например, в Sambrook, J. *et al.* (1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y., и Ausubel, F.M. *et al.* (1989) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, N.Y.

Н. Терапевтические способы

На основании идентификации авторами настоящего изобретения ингибиторов рецептора GPR174, в сочетании с их открытием пути передачи сигналов GPR174, способы ингибирования регулируемых GPR174 и ассоциированным с ним G-белком путей передачи сигналов описаны в настоящем описании; где ингибирующее GPR174 соединение

используют в форме одиночного средства или в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39 и/или ингибитора CD73. Способы можно использовать для увеличения или уменьшения передачи сигналов в клетке *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo* (например, в клетке млекопитающего, такой как клетка человека). В конкретных вариантах осуществления, соединение вводят субъекту, имеющему заболевание, ассоциированное с активностью GPR174, для уменьшения или для облегчения симптомов заболевания или лежащей в основе заболевания патологии. В других вариантах осуществления, соединение вводят субъекту, подверженному риску развития заболевания, ассоциированного с активностью GPR174, для уменьшения риска развития заболевания. В применениях *ex vivo*, клетки приводят в контакт с соединением вне организма субъекта. Эти клетки затем трансплантируют обратно субъекту. Медицинские состояния, которые ассоциированы с активностью GPR174, или в которых GPR174 может играть роль в нарушении и/или его лечении, включают злокачественную опухоль.

Как далее описано в настоящем описании, авторы настоящего изобретения показали, что комбинированное ингибирование GPR174 и ингибирование A2aR и/или A2bR, или комбинация ингибитора GPR174 и ингибитора ферментного пути, вовлеченного в продукцию аденозина, такого как CD38, CD39 и CD73 (например, ингибитора CD73 и/или ингибитора CD38, и/или ингибитор CD39) приводит к синергической индукции продукции IFN- γ , IL-2, TNF и GM-CSF в PBMC человека, таким образом, в конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к способам лечения злокачественной опухоли посредством введения субъекту терапевтически эффективного количества ингибитора GPR174 и ингибитора опосредованной АТФ-аденозином-A2aR- и/или A2bR передачи сигналов (такого как антагонист A2aR и/или антагонист A2bR, и/или ингибитор CD73, и/или ингибитор CD38, и/или ингибитор CD39) таким образом, стимуляции иммунного ответа у указанного субъекта.

В некоторых вариантах осуществления, злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из рака молочной железы, меланомы, рака ободочной кишки, урологической злокачественной опухоли, рака легкого, мелкоклеточного и немелкоклеточного рака легкого, рецидивирующих или невосприимчивых злокачественных новообразований, неходжкинской лимфомы и лимфомы Ходжкина, лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфоцитарной лимфомы, лимфомы ЦНС, Т-клеточной лимфомы, связанной со СПИД лимфомы, острого лимфобластного лейкоза, злокачественных опухолей желудочно-кишечного тракта, рака печени, печеночноклеточной карциномы, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака желчного протока, рака предстательной железы, карциномы почки, рака мочевого пузыря, колоректального рака, множественной миеломы, мезотелиомы, рака шейки матки, рака влагалища, рака анального канала, рака ротоглотки, миелогенного лейкоза, рака желудка, носоглоточной карциномы, карциномы головы и шеи, глиобластомы, глиосаркомы, плоскоклеточной злокачественной опухоли мозга, злокачественной глиомы, диффузных

глиом ствола головного мозга, рака пищевода, рака щитовидной железы, астроцитомы, злокачественной опухоли грудной клетки, рака эндометрия, карциномы клеток кожи, лейкоза, ацинарно-клеточной карциномы, аденокарциномы, бронхиолоальвеолярной карциномы, холангиокарциномы, хордомы, гигантоклеточной карциномы, карциномы кишечника, карциномы большой слюнной железы, злокачественной одонтогенной неоплазии, злокачественной опухоли оболочки периферического нерва, рака кожи, рака яичка, опухоли зародышевых клеток, нейроэндокринной карциномы, карциномы паращитовидной железы, карциномы гипофиза, хориокарциномы плаценты, злокачественной опухоли мошонки, карциномы трахеи, переходноклеточной карциномы, рака тела матки, рака вульвы, рака почки, рака прямой кишки, карциномы фаллопиевых труб, перитонеальной карциномы, эпителиальной злокачественной опухоли, плевральной мезотелиомы, саркоматоидной карциномы, синовиальной саркомы, нефробластомы, нейробластомы, острого миелоидного лейкоза взрослых, миелодиспластической/миелопролиферативной неоплазии, эмбриональной карциномы, саркомы Капоши, злокачественной опухоли кости, рака тела матки, рака желудка, карциномы эндометрия, злокачественной опухоли тонкого кишечника, злокачественной опухоли эндокринной системы, рака паращитовидной железы, рака надпочечника, саркомы мягких тканей, рака мочеиспускательного канала, рака полового члена, рака мочеоточника, карциномы почечной лоханки, неоплазии центральной нервной системы, ангиогенеза первичной опухоли, опухоли оси позвоночника, эпидермоидной злокачественной опухоли, индуцированных внешней средой опухолей, включая опухоли, индуцированные асбестом, аденосаркомы, аденосквамозной карциномы, адренокортикальной карциномы, астроцитарных опухолей, базальноклеточной карциномы, хондросаркомы, саркомы Юинга, рака желчного пузыря, гипотарингеальной злокачественной опухоли, внутриглазной меланомы, рака гортани, лейомиосаркомы, злокачественной опухоли губ и полости рта, злокачественных мезотелиальных опухолей, злокачественной тимомы, медуллобластомы, медуллоэпителиомы, карциномы из клеток Меркеля, мукоэпидермоидной карциномы, миелодиспластического синдрома, рака носовой полости и околоносовых пазух, остеосаркомы, пульмональной бластомы, пинеальных и супратенториальных примитивных нейроэктодермальных опухолей, неоплазии плазматических клеток, ретинобластомы, рабдомиосаркомы, саркомы, нейроэктодермальных опухолей и опухоли Вильмса.

В некоторых вариантах осуществления, субъект, страдающий злокачественной опухолью, имеет одну или несколько опухолей, инфильтрованных регуляторными Т-клетками, например, таких как рак молочной железы, легкого (такой как мелкоклеточный рак легкого или немелкоклеточный рак легкого), колоректальный рак, рак шейки матки, почки, яичника, меланома, рак поджелудочной железы, печеночноклеточный рак, рак желудка, глиобластома, глиома, рак мочевого пузыря, миелома (такая как множественная миелома), рак предстательной железы, щитовидной железы, яичка и пищевода.

В некоторых вариантах осуществления, субъект, страдающий злокачественной опухолью, является устойчивым к ингибиторам контрольных точек, таким как антитело против PD-1 (например, кейтруда® и опдиво®) и против CTLA-4 (ервой®), и/или к таким видам клеточной терапии, как CAR-T-клеточная и адоптивная T-клеточная терапия. Ингибиторы контрольных точек являются эффективными только у незначительной части пациентов, и высокие уровни образующих аденозин молекул наблюдали у неответающих пациентов. Кроме того, преодоление естественной иммуносупрессии в солидных опухолях представляет основную трудность для клеточной терапии. Поскольку PS и аденозин оба являются продуктами стресса и гибели клеток в солидных опухолях, ожидают, что пациенты, устойчивые к терапии ингибиторами контрольных точек и/или клеточной терапии, могут получать большое преимущество от комбинированного ингибирования путей GPR174 и аденозина.

В некоторых вариантах осуществления, способ дополнительно включает введение одного или нескольких дополнительных лекарственных средств. В конкретных вариантах осуществления, клетку злокачественной опухоли дополнительно приводят в контакт с химиотерапевтическим средством.

2. Введение и дозирование

Соединения (в формах их композиций) вводят пациентам обычными способами, известными в данной области, например, посредством инъекции, перорального, внутривенного, подкожного, внутривнутрибрюшинного, внутримышечного введения, инфузии, инфльтрации, орошения, внутрисуставного введения, ингаляции, подкожного, местного, ректального, вагинального, кожного, назального, чрескожного или глазного введения и т.п. Для введения посредством инъекции и/или инфльтрации, или инфузии, композиции или составы по настоящему изобретению можно суспендировать или растворять, как известно в данной области, в носителе, пригодном для инъекции и/или инфльтрации, или инфузии. Такие носители включают изотонический солевой раствор, забуференный или незабуференный и т.п. В зависимости от намеченного использования, они также могут содержать другие ингредиенты, включая другие активные ингредиенты, такие как изотонические средства, хлорид натрия, модификаторы pH, красители, консерванты, антитела, ферменты, антибиотики, противогрибковые средства, противовирусные средства, другие противоинфекционные средства и/или диагностические средства, такие как непроницаемые для излучения красители, меченные радиоактивными метками средства и т.п., как известно в данной области. Однако, композиции по настоящему изобретению могут содержать простой раствор или суспензию соединения или фармацевтически приемлемой соли соединения, в дистиллированной воде или солевом растворе.

Альтернативно, терапевтические соединения можно доставлять другими способами, такими как интраназальное введение, введение посредством ингаляции или в форме липосом, нанокапсул, везикул и т.п. Композиции для интраназального введения обычно имеют форму каплей, спреев, содержащих жидкие формы (растворы, суспензии, эмульсии,

липосомы и т.д.) активных соединений. Введение посредством ингаляции, как правило, включает формирование паров, туманов, сухих порошков или аэрозолей и снова может включать растворы, суспензии, эмульсии и т.п., содержащие активные лекарственные средства.

Способы и частоту введения терапевтических композиций, описанных в настоящем описании, так же как дозу, можно менять от индивидуума к индивидууму, и можно легко определять с использованием стандартных способов. Предпочтительно, между 1 и 100 дозами можно вводить в течение 52-недельного периода. Подходящая доза представляет собой количество соединения, которое, при введении, как описано выше, является способным к уничтожению или замедлению роста злокачественных опухолей или клеток злокачественных опухолей.

Как правило, подходящие доза и режим лечения предоставляет активное соединение(соединения) в количестве, достаточном для обеспечения терапевтического и/или профилактического преимущества. В конкретных вариантах осуществления, доза составляет 0,1-500 мг, например, приблизительно 0,1-50, 0,1-40, 0,1-20, 0,1-10, 0,2-20, 0,3-15, 0,4-10, 0,5-1, 0,5-100, 0,5-50, 0,5-30, 0,5-20, 0,5-10, 0,5-5, 1-50, 1-30, 1-20, 1-10, 1-5, 5-50, 5-20, 5-10, 10-100, 20-200, 30-150, 40-100, 50-100, 50-300, 50-250, 100-300 и 100-250 мг каждого из активного ингредиент(ингредиентов). Такой ответ можно мониторировать посредством определения улучшенного клинического исхода (например, уменьшенного воспаления, ингибирования роста клеток злокачественных опухолей, более частых ремиссий, полных или частичных, более длительной выживаемости без признаков заболевания, уменьшенной заболеваемости или улучшение результатов одного или нескольких стандартных тестов или анализов, известных в данной области для оценки статуса заболевания, состояния или нарушения) у подвергнутых лечению пациентов, по сравнению с не подвергнутыми лечению пациентами.

Терапевтическое количество соединения, описанное в настоящем описании, обозначает количество, эффективное для получения желательного терапевтического ответа, например, количество, эффективное для уменьшения воспаления или для задержки роста злокачественной опухоли, или чтобы вынудить злокачественную опухоль уменьшаться или не метастазировать. Если то, что вводят, представляет собой не соединение (или соединения), а энантиомер, пролекарство, соль или метаболит соединения (или соединений), тогда термин «терапевтически эффективное количество» означает количество такого материала, образующее у пациента такую же концентрацию в крови рассматриваемого соединения, какую получают посредством введения терапевтически эффективное количество собственно соединения.

Пациенты, которых можно лечить с использованием соединения, описанного в настоящем описании, и фармацевтически приемлемых солей, пролекарств, энантиомеров и метаболитов таких соединений, в соответствии со способами по настоящему изобретению, включают, например, пациентов, диагностированных как имеющие любое из заболеваний

или нарушений, описанных в настоящем описании.

В рамках таких способов, фармацевтические композиции, как правило, вводят пациенту. В рамках изобретения, «пациент» или «субъект» относится к любому теплокровному животному, предпочтительно, человеку. Пациент может являться или может не являться пораженным воспалительным состоянием или аутоиммунным нарушением, или злокачественной опухолью. Соответственно, вышеуказанные фармацевтические композиции можно использовать для предотвращения развития воспалительного состояния или аутоиммунного нарушения, или злокачественной опухоли, или для лечения пациента, пораженного воспалительным состоянием или аутоиммунным нарушением, или злокачественной опухолью. Воспалительное состояние или аутоиммунное нарушение, или злокачественную опухоль, можно диагностировать с использованием критериев, общепринятых в данной области. В случае злокачественной опухоли, фармацевтические композиции можно вводить либо до, либо после хирургического удаления первичных опухолей и/или лечения, такого как проведение радиотерапии или введение общепринятых химиотерапевтических лекарственных средств, или трансплантация костного мозга (аутологичная, аллогенная или сингенная).

Соединения или композиции, представленные в настоящем описании, можно использовать отдельно или в комбинации с одним или несколькими дополнительными лекарственными средствами, подходящими для лечения конкретного показания. Например, соединение или композицию по настоящему изобретению можно вводить субъекту, который имеет злокачественную опухоль или подвержен риску развития злокачественной опухоли, совместно с общепринятыми режимами противораковой терапии, такими как хирургия, облучение, химиотерапия и/или трансплантация костного мозга (аутологичная, сингенная, аллогенная или неродственная) или в комбинации с общепринятыми терапевтическими режимами для лечения воспалительного состояния или аутоиммунного нарушения, или злокачественной опухоли. Можно получать наборы для введения соединений, содержащие композицию или состав рассматриваемого соединения, или энантиомер, пролекарство, метаболит или фармацевтически приемлемую соль любого из них, вместе с общепринятыми средствами для введения терапевтического ингредиента.

3. Комбинированная терапия

Ингибиторы GPR174 (включая антагонисты, обратные агонисты, частичные агонисты и отрицательные аллостерические модуляторы) можно использовать в комбинации с ингибитором ферментного пути, вовлеченного в продукцию аденозина, и/или ингибитором опосредованной АТФ-аденозином-А2аR- и/или А2bR передачи сигналов (таким как антагонист А2аR и/или антагонист А2bR, и/или ингибитор CD73 и/или ингибитор CD38 и/или ингибитор CD39), и необязательно, с одним или несколькими дополнительными лекарственными средствами (например, терапевтическими соединениями, композициями, видами лечения, видами терапии и/или медицинскими процедурами). В таких видах комбинированной терапии, лекарственные средства по

настоящему изобретению можно составлять с или вводить одновременно с, до или после одного или нескольких других желательных видов терапии. Для конкретной комбинации видов терапии для использования в комбинированном режиме, принимают во внимание совместимость желательных терапевтических средств и/или процедур и желательный терапевтический эффект, подлежащий достижению. Следует понимать также, что используемые виды терапии могут достигать желательного эффекта для одного и того же состояния, заболевания или нарушения, или они могут достигать других эффектов (например, контроля каких-либо неблагоприятных эффектов).

Как правило, для использования в лечении, соединения, описанные в настоящем описании, можно использовать отдельно, в форме смесей двух или более соединений, или в комбинации с другими средствами, соединениями и/или фармацевтическими средствами. Примеры других средств, которые можно комбинировать с соединениями, описанными в настоящем описании, включают средства, известные как используемые для лечения воспалительных состояний, аутоиммунных нарушений или злокачественных опухолей. Другой пример потенциального средства для комбинации с соединениями, описанными в настоящем описании, может включать средства для лечения отличных, но ассоциированных или родственных симптомов или показаний. В зависимости от способа введения, средства можно составлять в подходящие композиции для обеспечения простой доставки. Каждый компонент комбинированной терапии можно составлять множеством способов, известных в данной области. Например, первое и второе средства из комбинированной терапии можно составлять вместе или отдельно. Соединение по настоящему описанию и дополнительное средство можно подходящим образом вводить пациенту за один раз или на протяжении серий обработок.

Как описано в настоящем описании, в некоторых вариантах осуществления, комбинированная терапия может обеспечивать «синергизм» и как доказано, являться «синергической», т.е., эффект, достигаемый, когда активные ингредиенты используют совместно, превышает сумму эффектов, возникающих в результате использования соединений отдельно. Синергический эффект можно получать, когда активные ингредиенты: (1) совместно составляют и вводят или доставляют одновременно в комбинированном, единичном дозированном составе; (2) доставляют посредством чередования или параллельно в форме отдельных составов; или (3) вводят посредством какого-либо другого режима. При доставке в чередующейся терапии, синергический эффект можно получать, когда соединения, средства и/или виды лечения вводят или доставляют последовательно, например, посредством различных инъекций в отдельных шприцах. Как правило, в ходе чередующейся терапии, эффективную дозу каждого активного ингредиента вводят последовательно, т.е., серийно, в то время как в комбинированной терапии, эффективные дозы двух или более активных ингредиентов вводят совместно. Подходящие дозы для любого из вышеуказанных совместно вводимых средств представляют собой дозы, используемые в настоящее время, и могут быть

снижены, благодаря комбинированному действию (синергизму) соединения по настоящему описанию и других совместно вводимых средств или видов лечения.

Каждое соединение из комбинированной терапии, как описано в настоящем описании, можно составлять множеством способов, известных в данной области. Например, первое и второе средства из комбинированной терапии можно составлять вместе или отдельно. Индивидуально или отдельно составленные средства можно упаковывать вместе в форме набора. Неограничивающие примеры включают, но без ограничения, наборы, содержащие, например, две пилюли, пилюлю и порошок, суппозиторий и жидкость в флаконе, два местных крема и т.д. Набор может включать необязательные компоненты, способствующие введению единичной дозы пациентам, такие как флаконы для разведения порошкообразных форм, шприцы для инъекции, сделанные на заказ системы для IV доставки, ингаляторы и т.д. Кроме того, набор для единичной дозы может содержать инструкции для подготовки и введения композиций. Набор может быть изготовлен в форме одноразовой единичной дозы для одного пациента, множественных доз для конкретного пациента (в постоянной дозе или где можно менять активность индивидуальных соединений по мере прогрессирования терапии); или набор может содержать множественные дозы, подходящие для введения множеству пациентов («нерасфасованная упаковка»). Компоненты набора можно собирать в коробки, блистерные упаковки, бутылки, пробирки и т.п. Два или более соединений могут быть смешаны вместе в таблетке, капсуле или другом носителе, или могут быть разделены. В одном примере, первое соединение содержится внутри таблетки, и второе соединение находится снаружи, так что значительная часть второго соединения высвобождается до высвобождения первого соединения.

4. Композиции

Для введения субъекту, например, для лечения заболеваний, таких как злокачественная опухоль, ингибитор GPR174 включают или составляют в композицию, необязательно, в комбинации с по меньшей мере одним из ингибитора опосредованной АТР-аденозином-А2аR- и/или А2bR передачи сигналов (такого как антагонист А2аR, и/или антагонист А2bR, и/или ингибитор CD73, и/или ингибитор CD38, и/или ингибитор CD39), где композиция включает фармацевтический носитель для упаковки, хранения, транспортировки и введения. Кроме того, рацемические смеси, энантиомеры, пролекарства либо рацемической смеси, либо стереоизомера, метаболит либо рацемической смеси, либо стереоизомера, или соль любого из них, можно включать в состав или композицию, включая фармацевтический носитель. Композиции содержат один или несколько фармацевтически приемлемых носителя(носителей) и могут также содержать другие терапевтически активные ингредиенты, так же как адьюванты и другие ингредиенты, которые можно обнаружить в фармацевтических композициях.

Таким образом, соединения по настоящему изобретению можно составлять с фармацевтически приемлемым носителем для введения субъекту. В то время как любой пригодный носитель, известный специалисту в данной области, можно использовать в

фармацевтических композициях по настоящему изобретению, тип носителя можно менять, в зависимости от способа введения. Фармацевтическую композицию, как правило, составляют таким образом, что рассматриваемое соединение присутствует в терапевтически эффективном количестве, т.е., количестве соединения, необходимом для достижения желательного эффекта в отношении лечения субъекта.

Для получения фармацевтических композиций, фармацевтически приемлемые носители могут являться либо твердыми, либо жидкими. Препараты в твердой форме включают порошки, таблетки, пилюли, капсулы, саше, суппозитории и диспергируемые гранулы. Твердый носитель может представлять собой одно или несколько веществ(вещества), которые могут действовать также в качестве разбавителей, придающих вкус средств, связующих веществ, консервантов, дезинтегрирующих средств для таблеток или инкапсулирующего материала.

В порошках, носитель представляет собой тонко измельченное твердое вещество, которое находится в смеси с тонко измельченным активным компонентом. В таблетках, активный компонент смешивают с носителем, имеющим необходимые свойства связывания, в подходящих пропорциях, и прессуют до желательных формы и размера.

Пригодные носители для твердых композиций по настоящему изобретению включают, например, карбонат магния, стеарат магния, тальк, сахар, лактозу, пектин, декстрин, крахмал, желатин, трагакант, метилцеллюлозу, карбоксиметилцеллюлозу натрия, легкоплавкий воск, масло какао и т.п. Альтернативно, композиции можно получать в форме с использованием инкапсулирующего материала в качестве носителя, получая капсулу, в котором активный компонент, в присутствии или в отсутствие других носителей, окружен носителем, который, таким образом, ассоциирован с ним. Подобным образом, включены саше и пастилки. Таблетки, порошки, капсулы, пилюли, саше и пастилки можно использовать в качестве твердых лекарственных форм, пригодных для перорального введения.

В конкретных вариантах осуществления, ингибитор GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, можно диспергировать в одном или нескольких фармацевтически приемлемых полимерах или восках и, например, получать в твердых лекарственных формах. Ингибитор или активатор GPR174 можно диспергировать в одном или нескольких фармацевтически приемлемых полимерах посредством различных способов. Например, способ на основе растворителя, способ слияния-плавления, гибридный способ слияния-растворения или другие способы диспергирования можно использовать для получения одного или нескольких фармацевтически активных веществ лекарственного средства в твердой дисперсии. Способы на основе как плавления, так и растворителя, определяют способы растворения одного или обоих из активного ингредиента и полимера.

В одном аспекте, в способе на основе растворителя используют растворитель, такой как вода, неорганические растворители и органические растворители, для растворения и тщательного диспергирования или растворения лекарственного средства и одного или нескольких фармацевтически приемлемых полимеров. Растворитель позднее удаляют посредством выпаривания или других способов, в то время как твердую дисперсию лекарственного средства/полимера собирают в твердую лекарственную форму. Использование органических растворителей может приводить к образованию опасных и токсичных отходов в окружающей среде. Если возможно, используют воду для растворимых в воде лекарственных средств, для получения дисперсии. Другие пригодные растворители могут представлять собой, например, спирты и ацетон для использования нерастворимых в воде полимеров.

Полученную дисперсию для получения твердых лекарственных форм можно смешивать с дополнительными полимерами, средствами с контролируемым высвобождением, связующими веществами, смазывающим средством и/или наполнителями. Например, полученную дисперсию можно измельчать со смесью полимеров, средств с контролируемым высвобождением, связующими веществами, смазывающим средством и/или наполнителями, посредством грануляции перед прессованием в таблетки или другие твердые лекарственные формы.

В другом аспекте способ слияния-плавления включает плавление ингибитора GPR174 и одного или нескольких фармацевтически приемлемых полимеров вместе при температурах, равных или превышающих температуру плавления либо одного, либо нескольких фармацевтически приемлемых полимеров и/или ингибитора, или активатора. В способе слияния-плавления, ингибитор или активатор и один или несколько фармацевтически приемлемых полимеров можно сначала измельчать и плавить в пригодном смесителе. Затем расплавленную смесь быстро охлаждают для получения сгущенной массы. Альтернативно, один или несколько фармацевтически приемлемых полимеров можно плавить до расплавленного состояния перед смешиванием с ингибитором или активатором до гомогенного состояния. Расплавленную смесь ингибитора или активатора и одного или нескольких фармацевтически приемлемых полимеров можно сгущать посредством снижения температуры и затем получать в фармацевтических лекарственных формах, таких как твердая лекарственная форма, например, порошок и таблетки. Например, охлажденную смесь можно затем размалывать для получения порошкообразной формы. Альтернативно, охлажденную смесь можно размалывать и смешивать с дополнительными наполнителями, смазывающим веществом или связующими веществами и прессовать в таблетки.

В другом аспекте, можно использовать гибридный способ слияния-растворения. Например, если присутствует термическая нестабильность и несмешиваемость между ингибитором или активатором и одним или несколькими фармацевтически приемлемыми полимерами, ингибитор или активатор можно сначала растворять в небольшом количестве

растворителя и добавлять в расплавленный фармацевтически приемлемый полимер. Затем растворитель выпаривают для получения продукта, который затем размалывают для получения твердой лекарственной формы, такой как порошкообразная форма, или прессуют в таблетки.

Препараты в жидкой форме включают растворы, суспензии и эмульсии, например, растворы или суспензии в воде или воде/пропиленгликоле. Водные суспензии, пригодные для перорального использования, можно получать посредством диспергирования тонко измельченного соединения в воде с вязким материалом, таким как природные или синтетические камеди, смолы, метилцеллюлоза, карбоксиметилцеллюлоза натрия и другие хорошо известные суспендирующие средства. Для парентеральной инъекции, жидкие препараты можно составлять в раствор в водном растворе полиэтиленгликоля. В конкретных вариантах осуществления, фармацевтические композиции составляют в стабильный эмульсионный состав (например, эмульсию вода-в-масле или эмульсию масло-в-воде) или в водный состав, который предпочтительно содержит одно или несколько поверхностно-активных веществ. Пригодные поверхностно-активные вещества, хорошо известные специалисту в данной области, можно использовать в таких эмульсиях. В одном варианте осуществления, композиция, включающая рассматриваемое соединение, находится в форме мицеллярной дисперсии, включающей по меньшей мере одно пригодное поверхностно-активное вещество. Поверхностно-активные вещества, которые можно использовать в таких мицеллярных дисперсиях, включают фосфолипиды. Примеры фосфолипидов включают: диацилфосфатидилглицерины, такие как: димиристоилфосфатидилглицерин (DPMG), дипальмитоилфосфатидилглицерин (DPPG) и дистеароилфосфатидилглицерин (DSPG); диацилфосфатидилхолины, такие как: димиристоилфосфатидилхолин (DPMC), дипальмитоилфосфатидилхолин (DPPC) и дистеароилфосфатидилхолин (DSPC); диацилфосфатидные кислоты, такие как: димиристоилфосфатидная кислота (DPMA), дипальмитоилфосфатидная кислота (DPPA) и дистеароилфосфатидная кислота (DSPA); и диацилфосфатидилэтанолламины, такие как: димиристоилфосфатидилэтанолламин (DPME), дипальмитоилфосфатидилэтанолламин (DPPE) и дистеароилфосфатидилэтанолламин (DSPE). Другие примеры включают, но без ограничения, производные этаноламина (такие как фосфатидилэтанолламин, как упомянуто выше, или цефалин), серин (такой как фосфатидилсерин) и 3'-О-лизилглицерин (такой как 3'-О-лизилфосфатидилглицерин).

В композиции для использования по настоящему изобретению включены также препараты в твердой форме, предназначенные для перевода, непосредственно перед использованием, в препараты в жидкой форме для перорального введения. Такие жидкие формы включают растворы, суспензии и эмульсии. Эти препараты могут содержать, в дополнение к активному соединению, красители, придающие вкус средства, стабилизаторы, буферы, искусственные и природные подсластители, диспергирующие средства, загустители, солюбилизующие средства и т.п.

Композиции по настоящему изобретению могут также находиться в композициях с контролируемым высвобождением или замедленным высвобождением, как известно в данной области, например, в матриксах из биоразлагаемых или не биоразлагаемых пригодных для инъекции полимерных микросферах или микрокапсулах, в липосомах, в эмульсиях и т.п., включая композиции для использования в качестве подкожных депо.

Фармацевтический препарат, включающий ингибитор GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, может находиться в единичной лекарственной форме. В такой форме препарат разделен на единичные дозы, содержащие соответствующие количества активного компонента. Единичная лекарственная форма может представлять собой упакованный препарат, где упаковка содержит дискретные количества препарата, такие как пакетированные таблетки, капсулы и порошки в флаконах или ампулах. Также, единичная лекарственная форма может представлять собой собственно капсулу, таблетку, саше или пастилку, или может представлять собой соответствующее количество любого из них в упакованной форме.

В некоторых вариантах осуществления, фармацевтический препарат, включающий ингибитор GPR174, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, можно составлять для местного, подкожного, внутрикожного, субдермального, подкожного или чрескожного введения. Местное введение относится к использованию композиции, наносимой на поверхность кожи (например, в участок раны, повреждения или дефекта), для проявления местного действия. Соответственно, такие местные композиции включают фармацевтические или косметические формы, в которых композицию наносят с внешней стороны посредством прямого контакта с поверхностью кожи, подлежащей лечению, например, лица, шеи, рук, ног и/или корпуса. Общепринятые фармацевтические или косметические формы для этой цели включают мази, линименты, кремы, шампуни, лосьоны, пасты, гели, спреи, аэрозоли и т.п., и могут, кроме того, быть нанесены непосредственно или в пластырях или пропитанных повязках, например, в зависимости от раны/дефекта и области кожи, подлежащей лечению. Термин «мазь» включает составы (включая кремы) имеющие маслянистые, водорастворимые и эмульсионного типа основы, например, вазелин, ланолин, полиэтиленгликоли, так же как их смеси. В некоторых вариантах осуществления, фармацевтический препарат, включающий ингибитор GPR174 для использования в стимуляции заживления раны, составляют в форме «повязки на рану», включающей любой из множества материалов, используемых для покрытия и защиты раны. Примеры включают окклюзионные повязки, адгезивные повязки, антисептические повязки и защитные повязки. В фармацевтических препаратах, «крем» представляет собой полутвердую эмульсию типа масло-в-воде или вода-в-масле, пригодную для местного введения. В соответствии с

настоящим описанием, используемые кремы и пенки могут также являться пригодными для использования с лекарственными средствами, описанными в настоящем описании.

Следующие примеры предназначены для иллюстрации, а не для ограничения изобретения.

ПРИМЕРЫ

ПРИМЕР 1

Подтверждение CRA и CRA

Авторы настоящего изобретения использовали CRA, сходный с описанным в Патенте США No. 7309576 и O'Dowd et al., *J. Biomol. Screen.* 12:175-85, 2007, для идентификации соединений, способных взаимодействовать с GPR174, с использованием библиотеки из приблизительно 370000 химических соединений. В кратком описании, анализ CRA, описанный в Патенте США No. 7309576, включает искусственную вставку NLS в рецептор дофамина D1 (DRD1), что позволяет рецептору мигрировать от мембраны клетки к внутренней части клетки, и при этом связывание антагонистов с рецептором задерживает рецептор на поверхности клетки, в то время как удаление лиганда позволяет рецептору продолжать интернализацию от поверхности клетки. Как антагонисты, так и агонисты, которые избирательно связывали рецептор, задерживали рецептор на плазматической мембране. Получали конструкции GPR174 для использования в анализе скрининга соединений на основе CRA. Из этого скрининга, авторы настоящего изобретения сначала идентифицировали соединения формулы I-VI, как описано в настоящем описании, и включили в таблицу 1.

Следует дополнительно отметить, что обнаружено, что соединения, идентифицированные авторами настоящего изобретения как имеющие активность в анализе CRA для GPR174 (т.е., соединения формулы I-VI), специфически взаимодействуют с GPR174, по сравнению с эталонной панелью из 68 других GPCR, против которых также проводили скрининг этих соединений. Например, обнаружено, что соединения, идентифицированные как имеющие активность в анализе CRA для GPR174, не имеют активности, при тестировании в анализе CRA (например, в анализе CRA, как описано в примере 1, при тестировании при концентрации 2 мкМ), для других GPCR в эталонной панели, включающей: мускариновый M1, CCRL2, CMKOR1, GPR3, GPR4, GPR12, GPR15, GPR17, GPR18, GPR19, GPR20, GPR21, GPR22, GPR25, GPR26, GPR27, GPR31, GPR37, GPR37L1, GPR39, GPR43, GPR45, GPR48, GPR50, GPR52, GPR61, GPR62, GPR63, GPR65, GPR68, GPR78, GPR80, GPR83, GPR85, GPR87, GPR88, GPR101, GPR132, GPR135, GPR139, GPR141, GPR146, GPR148, GPR149, GPR150, GPR151, GPR152, GPR153, GPR160, GPR161, GPR162, GPR173, GPR182, GPR183, LGR5, LGR6, MAS1, MRGD, MRGE, MRGF, MRGI4, OPN3, OPN4, OPN5, P2Y8, P2Y10, TAAR6 и TAAR8.

Авторы настоящего изобретения также старались подтвердить, что соединения, идентифицированные с использованием CRA, представляют собой модулирующие соединения. Для этой цели, вышеописанный CRA использовали для скрининга библиотеки

по соединениям, которые взаимодействуют с тремя контрольными неорфанными рецепторами, и результаты этого скрининга сравнивали с результатами скрининга той же библиотеки для соединений, которые идентифицировали с использованием анализа в флуориметрическом визуализирующем считывателе планшетов (FLIPR), общепринятого способа, общеупотребительного для идентификации соединений, взаимодействующих с неорфанными GPCR при передаче сигналов посредством Ca^{++} . Три неорфанных GPCR -- мускариновый рецептор ацетилхолина M1 (CHRM1), адренергический рецептор альфа 1a (ADRA1a) и рецептор нейропептида S (NPSR) - использовали в скрининге против сфокусированной на GPCR библиотеки из 10000 соединений. Выход этих исследований обобщен в таблице 2. Тридцать «наилучших» взаимодействующих соединений идентифицировали с использованием CRA, и восемьдесят одно наилучшее соединение идентифицировали с использованием FLIPR для рецептора CHRM1; 9 наилучших соединений в CRA и 29 наилучших соединений в FLIPR идентифицировали для рецептора NPS; и 110 наилучших соединений в CRA и 110 наилучших соединений в FLIPR для ADRA1a. Все соединения, которые идентифицировали в скрининге CRA, также являлись наилучшими соединениями в FLIPR для соответствующего рецептора, показывая, что каждое из наилучших соединений в CRA влияет на передачу сигналов рецептора.

Таблица 2. Сравнение CRA и FLIPR с использованием трех различных рецепторов, где каждый подвергнут скринингу против сфокусированной на GPCR библиотеки из 10000 соединений.

GPCR	Наилучшие соединения в FLIPR	Наилучшие соединения в CRA	Наилучшие соединения в CRA, эффективные в FLIPR
CHRM1	81	30	30
NPSR	29	9	9
ADRA1a	110	110	110

Кроме того, CRA может также предоставлять относительные активности соединений против рецептора-мишени. Это показано с использованием рецептора CHRM1 и множества нацеливающих на CHRM1 соединений. Как можно видеть на фигуре 2, зарегистрированные активности соединений имеют такой же порядок ранжирования, что и порядок ранжирования концентрации, при которой флуоресцентный сигнал наблюдают в CRA. Как показано на фигуре 5A, для репрезентативного соединения 1 (группа I), соединения 2 (группа I), соединения 3 (группа I), соединения 4 (группа I) и соединения 20 (группа II), идентифицированных как наилучшие в анализе CRA в качестве соединений, которые взаимодействуют с GPR174, показана кривая зависимости ответа от дозы против GPR174, в то время как для той же группы соединений не показано никакой активности против CHRM1 (фигура 5B).

ПРИМЕР 2

АНАЛИЗЫ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ПУТИ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛОВ GPCR

Для идентификации путь(путей) передачи сигналов, которые активированный GPCR

использует для вызова своего биологического ответа, разработано множество технологий анализа (Siehler, *Biotechnology* 3:471-83, 2008 и ссылки в этом документе). Семейство Gas белков G стимулирует активность AC, в то время как члены $G\alpha 1-3$, $G\alpha o$ и $G\alpha z$ семейства $G\alpha i$ белков G ингибируют активность AC. AC образуют вторичный мессенджер cAMP с использованием ATP в качестве субстрата. Доступен ряд наборов для анализа cAMP, измеряющих уровни cAMP (Siehler, *Biotechnology* 3:471-83, 2008 и ссылки в этом документе). Для детекции активации сопряженных с Gas GPCR, увеличение уровней cAMP, как правило, измеряют через 15-60 минут после стимуляции агонистом (Williams, *Nat. Rev. Drug. Discov.* 3:125-35, 2004). Для измерения ингибирования AC посредством семейства $G\alpha i$ белков G, клетки, как правило, обрабатывают форсколином, неспецифическим активатором AC, для увеличения уровней внутриклеточного cAMP. Активность семейства $G\alpha i$ белков G определяют посредством измерения уменьшения уровней cAMP стимулированных форсколином клеток (Wang et al., *Assay Drug. Dev. Technol.* 9:522-31, 2011).

Семейство $G\alpha q$ белков G ($G\alpha q$, $G\alpha 11$, $G\alpha 14$ и $G\alpha 15/16$), активирует β изоформы фосфолипазы C (PLC β) для образования вторичных мессенджеров DAG и IP_3 . IP_3 является растворимым и диффундирует через цитоплазму и взаимодействует с рецепторами IP_3 на эндоплазматическом ретикулуме, вызывая высвобождение кальция и увеличение уровня внутриклеточного кальция. DAG привлекает PKC, которая становится активированной в сочетании со связыванием ионов кальция. Клеточные анализы являются доступными для идентификации вторичных мессенджеров IP_3 и кальция. Анализы для измерения накопления инозитолфосфата, как правило, детектируют инозитолмонофосфат (IP_1), поскольку IP_3 и IP_2 быстро деградируют посредством клеточных фосфатаз (Liu et al., *Anal. Biochem.* 318:91-99, 2003; Trinquet et al., *Anal. Biochem.* 358:126-135, 2006). Детекция кальция представляет собой хорошо разработанный способ для мониторинга активации сопряженных с $G\alpha q$ GPCR. Ответы кальция являются временными, и уровни кальция, как правило, возвращаются к исходным значениям в течение нескольких минут. Анализы кальция основаны на ответе на связывание Ca^{2+} с флуоресцентными красителями, которые загружают в клетки (Merit et al., *J. Biomol. Screen.* 10:780-7, 2005; Xin et al., *J. Biomol. Screen.* 12:705-14, 2007).

Семейство $G12/13$ белков G ($G\alpha 12$ и $G\alpha 13$) активирует белки Rho-GEF. Белки Rho-GEF катализируют обмен GTP на GDP для активации RhoA. RhoA, в свою очередь, активирует Rho-киназу, что далее приводит к активации ATF2. Анализы для прямого измерения активации RhoA посредством $G\alpha 12/13$ ограничены из-за отсутствия у них количественности, низкой производительности и необходимости специализированных устройств для визуализации (Ren et al., *Methods Enzymol.* 325:264-72, 2000).

В дополнение к пути передачи сигналов, активированному посредством GPCR через активацию или ингибирование аденилилциклаз посредством Gas и $G\alpha i$, стимуляцию PLC- β посредством $G\alpha q$ и активацию RhoA киназы посредством $G\alpha 12/13$, каскад передачи сигналов активированной митогеном протеинкиназы (MAPK) активируется посредством

белков G (Siehler, *Biotechnology* 3:471-83, 2008 и ссылки в этом документе). Активация каскада передачи сигналов MAPK может происходить через Gαq посредством опосредованной Ca²⁺ активации богатой пролином тирозинкиназы 2 (Pyk2) или активации Raf-1 посредством PKC (Marinissen et al., *Trends Pharmacol. Sci.* 22:368-76, 2001; Pierce et al., *Oncogene* 20:1532-9, 2001). В дополнение к активации посредством Gαq каскада передачи сигналов MAPK, субъединицы βγ, высвобожденные из сопряженных с Gi GPCR, активируют либо рецепторные тирозинкиназы (RTK), либо нерецепторные тирозинкиназы (Src), что приводит к активации каскада Ras и MAPK (Marinissen et al., *Trends Pharmacol. Sci.* 22:368-76, 2001; Pierce et al., *Oncogene* 20:1532-9, 2001).

Как описано выше, существуют многочисленные анализы, доступные для идентификации путь(путей) передачи сигналов, сопряженных с активированными GPCR. Однако, эти общепринятые анализы основаны на агонисте для стимуляции рецептора. Для орфанных GPCR, рецепторы, агонисты которых неизвестны, эти анализы не подходят. Из приблизительно 370 GPCR человека, отвечающих на эндогенные сигналы, такие как пептиды, липиды, нейротрансммиттеры или нуклеотиды (Vassilatis et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:4903-8, 2003), оценили, что >120 GPCR являются орфанными (Howard et al., *Trends Pharmacol. Sci.* 22:132-40, 2001; www.iuphar-db.org). Традиционные анализы требуют агониста для активации GPCR для измерения увеличения уровней молекул вторичных мессенджеров или идентификации компонентов активированной передачи сигналов. Несмотря на то, что разработка анализов репортеров и использование сверхэкспрессии рецепторов позволяют идентификацию возможных путей передачи сигналов для орфанных GPCR (Bresnick et al., *Assay Drug Dev. Technol.* 1:239-49, 2003), как описано ниже, наблюдали, что сверхэкспрессия GPCR может приводить к ложной активации репортерных генов. Таким образом, для получения точного определения профиля передачи сигналов GPR174, авторы настоящего изобретения сначала определили пути передачи сигналов в анализах репортеров, поддающиеся влиянию сверхэкспрессированного GPR174, и затем подтверждали эти результаты с использованием соединений, идентифицированных в анализе CRA как взаимодействующие с GPR174.

В анализе репортера используют репортерный ген, который содержит последовательность ДНК, продукт которой синтезируется в ответ на активацию исследуемого каскада передачи сигналов. Последовательность ДНК содержит промотор, специфический для фактора транскрипции, для контроля транскрипции репортерного гена. Репортерный ген в идеале имеет низкую исходную экспрессию, является специфическим для пути передачи сигналов, имеет большое увеличение транскрипции репортерного гена после активации представляющего интерес пути передачи сигналов, и может быть воспроизводимо измерен (Dinger et al., *Molecular Biology in Medicinal Chemistry* 73-94, 2004; Schenborn et al., *Mol. Biotechnol.* 13:29-44, 1999). Несколько репортерных генов являются коммерчески доступными. Люцифераза светляка выявлена в качестве хорошего репортерного гена для исследования путей сигналов из-за ее низкой эндогенной

активности, высокой чувствительности, широкого динамического диапазона и простоты детекции (Cheng, *Curr. Chem. Genomics* 4:84-91, 2010; Dinger et al., *Molecular Biology in Medicinal Chemistry* 73-94, 2004). Другим преимуществом люциферазы светляка является то, что ее можно измерять в присутствии люциферазы *Renilla*. Субстрат люциферазы *Renilla*, коэлюцентеразин, отличается от субстрата люциферазы светляка, D-люциферина. Из-за различия субстрата, *Renilla* используют в качестве внутреннего контроля для систем анализа на основе люциферазы для экспрессии генов млекопитающих (Shifera et al. *Anal. Biochem.* 396:167-72, 2010). В этих анализах, люциферазу *Renilla* экспрессируют под контролем конститутивного промотора, и люциферазу светляка экспрессируют под контролем индуцируемого промотора. Эта система, разработанная в Promega (Madison, WI, USA) позволяет нормализацию результатов измерения в анализе люциферазы светляка, таким образом, уменьшая изменчивость, которая может быть вызвана экспериментальными различиями, такими как эффективность трансфекции или токсичность из-за продуктов трансфицированного гена и из-за обработки клеток соединениями.

Для идентификации пути передачи сигналов GPCR, синтетические промоторы, содержащие только один тип участка связывания фактора транскрипции, вводят в репортерный ген таким образом, что репортерный ген может быть активирован только посредством специфических компонентов передачи сигналов из активированного пути передачи сигналов (Hill et al., *Curr. Opin. Pharmacol.* 1:526-32, 2001; Cheng, *Curr. Chem. Genomics* 4:84-91, 2010). Разработаны репортерные конструкции, содержащие промоторные элементы (CRE, SRE, NFAT, AP1 и SRF), связанные с люциферазой светляка, которые можно использовать для идентификации и различения каждого из путей передачи сигналов, активированных посредством GPCR (Stratagene, CA и Promega, WI).

GPCR, сопряженные с семейством Gs белков G, активируют AC для получения cAMP. cAMP активирует протеинкиназу A (PKA) и приводит к фосфорилированию CREB. Фосфорилированный CREB связывается с элементом ответа на cAMP (CRE) и активирует зависимые от CRE промоторы. Для идентификации активации посредством GPCR пути передачи сигналов Gs, зависимые от CRE промоторы управляют экспрессией репортерного гена люциферазы светляка (Luc). В одном примере, авторы настоящего изобретения использовали репортерные плазмиды pCRE-Luc (Stratagene, CA) и pGL4.29 (Promega, WI) CRE-Luc, которые являются чувствительными к уровням cAMP и приводят к активации транскрипции и увеличению синтеза люциферазы, когда уровни cAMP увеличиваются (таблица 3). Алгоритм также показан схематически на фигуре 3.

Таблица 3: Репортерные конструкции, используемые для исследования путей передачи сигналов орфанных GPCR

	Gs	G12/13	Gq	Gi	Gi	Gi	Gi
				Без химерных белков G	Химеры Gs	Химеры Gq	Gα15/16

CRE-Luc	+		+		+	+	+
AP1-Luc			+			+	+
NFAT-Luc			+			+	+
SRE-Luc		+	+			+	+
SRF-Luc		+	+			+	+

GPCR, сопряженные с семейством Gq белков G (Gαq, Gα11, Gα14 и Gα16), активируют PLCβ, которая гидролизует фосфатидинозитол для получения DAG и IP₃. DAG и IP₃ контролируют выход кальция из эндоплазматического ретикулума. В свою очередь, DAG и кальций контролируют активность нескольких изоформ PKC. Изоформы PKC активируют белки FOS и JUN, которые в комбинации связывают и активируют элемент ответа на белок-активатор 1 (AP1). Кальций также связывает и активирует кальциневрин, который дефосфорилирует фактор транскрипции ядерный фактор активированных T-клеток (NFAT). Дефосфорилированный NFAT связывает и активирует элемент ответа на NFAT. Для измерения активации PLCα посредством сопряженных с Gq GPCR, авторы настоящего изобретения использовали зависимые от AP1 и NFAT-промоторы для управления экспрессией репортерного гена Luc. Конкретно, авторы настоящего изобретения использовали репортерную конструкцию AP1-Luc pAP1-Luc (Stratagene, CA) и репортерные конструкции NFAT-Luc pNFAT-Luc и pGL4.30 (Stratagene, CA и Promega, WI). Активация репортерных конструкций AP1-Luc и NFAT-Luc приводит к активации транскрипции люциферазы светляка (Stratagene, CA и Promega, WI). В дополнение к стимуляции репортерных конструкций AP1-Luc и NFAT-Luc посредством активации семейства Gs белков G, компоненты передачи сигналов от активированных посредством Gq GPCR могут активировать MAPK, RhoA и пути передачи сигналов Gs. Репортерные конструкции для путей передачи сигналов MAPK, RhoA и Gs также активируют посредством сопряженных с Gq GPCR (Siehler S., *Biotechnology* 3:471-83, 2008 и ссылки в этом документе; Mao et al., *J. Biol. Chem.* 273:118-27, 1998; Hill et al., *Curr. Opin. Pharmacol.* 1:526-532, 2001; Paguio et al., *Promega, Cell notes* 16:22-25, 2006). Репортерные конструкции для этих путей передачи сигналов, pCRE-Luc, pGL4.29, pSRE-Luc, pGL4.33, и pGL4.34 (Stratagene, CA и Promega, WI) используют в анализах репортеров для идентификации передачи сигналов Gq посредством GPCR (таблица 3).

GPCR, сопряженные с семейством Gi белков G (Gαi1-3, Gαo и Gαz), ингибируют активность AC, что супрессирует образование cAMP (Siehler S., *Biotechnology* 3:471-83, 2008). Из-за сложности измерения ингибирования активности AC, авторы настоящего изобретения использовали химерные белки G, перенацеливающие сопряженные с Gi GPCR для активации либо PLC, либо AC (Coward et al., *Anal. Biochem.* 270:242-8, 1999). Химерные белки G первоначально разработали после наблюдения, что карбокси-конец G-белка вовлечен в узнавание рецептора, в то время как остальной G белок вовлечен в эффекторную активацию. Из-за простоты измерения активации молекул передачи сигналов в путях Gq и

Gs, и сложности измерения активации сопряженных с Gi GPCR, разработаны химерные белки G для Gq, в которых последние пять аминокислот из Gaq заменены на последние пять аминокислот из либо Gai, либо Gao для формирования химерных белков G с Gqi5 или Gqo5 (Coward et al., *Anal. Biochem.* 270:242-8, 1999; Molecular Devices, CA). Химерные белки G с Gqi5 и Gqo5 являются способными перенацеливать сопряженные с Gi GPCR для активации фосфолипазы C. С использованием химерных белков G с Gq, GPCR, которые в норме ингибируют AC, можно в настоящее время измерять с использованием репортерных конструкций, которые измеряют активацию Gaq. Подобным образом, получены химерные белки G для Gs, в которых последние тринадцать карбокси-концевых аминокислот Gas заменены на последние тринадцать карбокси-концевых аминокислот любого из Gat, Gai, Gao или Gaz для формирования химерных белков G Gas-t, Gas-i, Gas-o и Gas-z. Химерные белки G Gas-t, Gas-i, Gas-o и Gas-z являются способными перенацеливать сопряженные с Gi GPCR для активации AC. С использованием химерных белков G с Gs, GPCR, которые в норме ингибируют AC, можно в настоящее время измерять с использованием репортерных конструкций, которые измеряют активацию Gas. Подобно химерным белкам G, которые являются полезными инструментами для сопряжения активированных посредством Gi GPCR с другими путями передачи сигналов, которые являются более подходящими для измерения, опубликовано, что разнообразные белки G Ga15 и Ga16 сопрягают широкое множество GPCR с PLC β (Offermanns et al., *J. Biol. Chem.* 270:15175-80, 1995). Ga15/16, в дополнение к химерным белкам G с Gq, являются полезными инструментами для сопряжения Gi GPCR с путем передачи сигналов Gq. Активация сопряженных с Gi GPCR не активирует репортерные конструкции CRE, SRE, NFAT, AP1 или SRF. Хотя опубликовано, что сопряженные с Gi GPCR активируют каскад передачи сигналов MAPK посредством субъединиц $\beta\gamma$, авторы настоящего изобретения не наблюдают активации зависимой от MAPK репортерной конструкции SRE-Luc или любой из репортерных конструкций после активации Gi посредством GPCR (таблица 3). Когда сопряженные с Gi GPCR активируют с использованием совместно экспрессированного химерного с Gs G белка, Cre-Luc стимулируют посредством активации AC посредством химерного с Gs G-белка. Подобным образом, когда сопряженные с Gi GPCR активируют с использованием совместно экспрессированных химерных с Gq белков G или разнообразных белков G с Ga16, репортерные конструкции CRE, SRE, NFAT, AP1 и SRF стимулируют посредством активации PLC β посредством химерных белков G с Gq или Ga16 (таблица 3).

Семейство G12/13 белков G (Ga12 и Ga13) активирует белок Rho-GEF, который катализируют обмен GTP на GDP для активации RhoA-GTPазы. RhoA, в свою очередь, активирует Rho-киназу, которая далее приводит к активации ATF2. ATF2 связывает элемент ответа на фактор сыворотки (SRE) и активирует зависимые от SRF и SRE промоторы (Siehler, *Biotechnology* 3:471-83, 2008 и ссылки в этом документе). Репортерные конструкции для этих путей передачи сигналов, pSRE-Luc, pGL4.33, и pGL4.34 (Stratagene, CA и Promega, WI) используют в анализах репортеров для идентификации Ga12/13

передачи сигналов посредством GPCR (таблица 3).

Орфанные GPCR не имеют агониста и полагаются на исходную активность орфанного GPCR для активации пути передачи сигналов. GPCR в их исходном состоянии находятся в равновесии между активным и неактивным состояниями (Bond et al., *Trends Pharmacol. Sci.* 27:92-96, 2006). Степень исходной активации зависит от рецептора, при этом некоторые GPCR являются конститутивно активными в отсутствие агониста, и другие GPCR имеют очень низкие уровни исходной активности (Hebert, *Biochem. Cell. Biol.* 76:1-11, 1998). Благодаря исходной активности GPCR, GPCR, которые являются сверхэкспрессированными при временных трансфекциях, могут активировать свои ожидаемые пути передачи сигналов в отсутствие активирующего лиганда (Bresnick et al., *Assay Drug Dev. Technol.* 1:239-249, 2003). Анализы репортеров можно использовать в качестве инструмента для исследования путей передачи сигналов орфанных GPCR, благодаря усилению исходной активности посредством индукции репортерного гена. Однако, как показано ниже, анализы репортеров, основанные единственно на сверхэкспрессии GPCR на основе временной трансфекции, могут являться ненадежными для точного определения профиля передачи сигналов представляющего интерес GPCR, такого как GPCR класса A (например, GPR174).

Высокопроизводительные скрининги библиотек соединений против GPCR идентифицировали соединения, взаимодействующие с GPCR и модулирующие активность GPCR. Традиционные высокопроизводительные скрининги обычно включают анализы, в которых вытесняют меченный радиоактивной меткой лиганд или осуществляют антагонизм функционального ответа активатора на GPCR (Xiao, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 11:195-215, 2008). В настоящее время известно, что соединения, взаимодействующие с GPCR, модулируют исходную активность рецептора различными способами (Bond et al., *Trends Pharmacol. Sci.* 27:92-96, 2006). Агонисты переводят конформацию рецептора в активное состояние, обратные агонисты переводят конформацию рецептора в неактивную конформацию, и антагонисты не влияют на исходное равновесие рецептора. Посредством сверхэкспрессии GPCR в системе на основе клеток, путь передачи сигналов GPCR первоначально можно прогнозировать с использованием репортерных конструкций, как описано выше. Соединения, идентифицированные в высокопроизводительных анализах, как взаимодействующие с GPCR, можно тестировать для определения природного соединения посредством модуляции прогнозируемого исходного сигнала, посредством сверхэкспрессированного GPCR, и таким образом, подтверждать профиль передачи сигналов GPCR, первоначально прогнозируемый, посредством сверхэкспрессии GPCR в анализе репортера. Если сигнал усилен, соединение представляет собой агонист, если сигнал ингибирован, соединение представляет собой обратный агонист, и если соединение не оказывает эффекта на сигнал, оно представляет собой антагонист или аллостерический модулятор. В системе анализа репортера авторов настоящего изобретения, они использовали, среди прочих, β -2-

адренергический (ADBR2) GPCR и несколько соединений, взаимодействующих с этим рецептором, чтобы проиллюстрировать ожидаемые эффекты на передачу сигналов (фигура 4А).

Использование соединений, взаимодействующих с конкретным GPCR, является необходимым для точного определения профиля передачи сигналов рецептора. Как показано ниже, сверхэкспрессии GPCR может приводить к ложной активации репортерных генов. Таким образом, только анализы репортеров, поддающиеся влиянию как сверхэкспрессированного рецептора, так и соответствующих ему соединений, обеспечивают точное определение профиля передачи сигналов GPCR.

Результаты экспериментов с использованием ADBR2 показывают необходимость подтверждения результатов анализа пути передачи сигналов посредством временной трансфекции с использованием модуляции посредством соединения

Известно, что β -2-адренергический (ADBR2) GPCR, класса А, стимулирует активность аденилатциклазы посредством активации пути передачи сигналов Gs (Wenzel-Seifert, K. et al, *Biochem Pharmacol.*, 64: 9-20 (2002)). Соединение (ICI 118551), как известно, действующее как обратный агонист на ADBR2, опубликовано (Hothersall J.D. et al., *Br J Pharmacol.*, 164(2):317-31 (2011)). Проводили эксперимент для сравнения результатов (1) сверхэкспрессии ADBR2 в анализе репортера с использованием различных репортерных конструкций и (2) сверхэкспрессии ADBR2 в присутствии/в отсутствие соединения ICI 118551, как известно, взаимодействующего с ADBR2 и действующего как обратный агонист, для определения того, могут ли исследования трансфекции отдельно точно идентифицировать путь передачи сигналов ADBR2.

Анализ репортеров:

Анализ репортеров проводили посредством временной трансфекции, увеличивающимися количествами конструкции ADBR2 pCMV6-XL4-ADBR2 (SC107904, Origene, MD), pNFAT-Luc, pGL4.30, pAP1-Luc, pCRE-Luc, pGL4.29 (100 нг), pSRE-Luc, pGL4.33 или pGL4.34 и ТК-*genilla* в качестве внутреннего контроля (0,3 нг) (Promega) с липофектаминам 2000 (2 мкг) (Invitrogen, CA), в соответствии с инструкциями производителя. Смесь ДНК/липофектамина 2000 (100 мкл) инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут и затем добавляли в 24-луночные культуральные планшеты (Corning, NY), содержащие на 70-90% конфлюэнтные, культивированные клетки, (линии клеток HEK293 или CHO (ATCC, VA)), в 500 мкл сред. Клетки далее инкубировали в течение 4-6 часов при 37°C и затем 500-1000 мкл дополнительных сред добавляли в каждую лунку трансфицированных клеток. На следующие сутки, среды удаляли, и клетки лизировали. Активность люциферазы и *genilla* измеряли с использованием двойной системы для анализа люциферазы (Promega, WI), в соответствии с инструкциями производителя. Буфер для лизиса (100 мкл) добавляли к клеткам и инкубировали при комнатной температуре в течение 20-30 минут чтобы позволить лизис клеток. В лизате (10 мкл) измеряли активность люциферазы и *genilla* с использованием реагента LARII и Stop&Glo

(50 мкл каждого) с использованием SpectraMax L (Molecular Devices, CA). Данные анализировали с использованием либо Excel (Microsoft, WA), либо Prism 4.03 (GraphPad, CA).

Анализы соединений:

Анализы соединений проводили посредством временной трансфекции конструкции ADBR2 pCMV6-XL4-ADBR2 (SC107904, Origene, MD), pNFAT-Luc, pGL4.30 или pGL4.29 (3000 нг), и ТК-*genilla* в качестве внутреннего контроля (10 нг; Promega) с липофектаминоном 2000 (60 мкг) (Invitrogen, CA), в соответствии с инструкциями производителя. Смесь ДНК/липофектамина 2000 (3000 мкл) инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут и затем добавляли в 10 см культуральную чашку (Corning, NY), содержащую на 70-90% конфлюэнтные, культивированные клетки, (линии клеток HEK293 или CHO (ATCC, VA)), в 15 мл сред. Клетки далее инкубировали в течение 4-6 часов при 37°C и затем среды удаляли, и клетки открепляли с использованием 2 мл трипсина (Life Technologies, CA). Среда (26 мл) добавляли к открепленным клеткам, и 120 мкл трансфицированных клеток переносили в каждую лунку в 96-луночном планшете. Увеличивающуюся концентрацию ICI 118551 или пирензепина в DMSO (1,2 мкл) добавляли к клеткам после посева в 96-луночный планшет. Клетки далее инкубировали при 37°C в течение различных периодов времени. Среда удаляла, и клетки лизировали. Активность люциферазы и *genilla* измеряли с использованием двойной системы для анализа люциферазы (Promega, WI), в соответствии с инструкциями производителя. Буфер для лизиса (25 мкл) добавляли к клеткам и инкубировали при комнатной температуре в течение 20-30 минут, чтобы позволить лизис клеток. В лизате (10 мкл) измеряли активность люциферазы и *genilla* с использованием реагента LARII и Stop&Glo (50 мкл каждого) с использованием SpectraMax L (Molecular Devices, CA). Данные анализировали с использованием либо Excel (Microsoft, WA), либо Prism 4.03 (GraphPad, CA).

Сверхэкспрессия ADBR2 в анализе репортера приводила к сильной стимуляции репортер CRE-Luc от Stratagene (pGL4.29), как ожидали (фигура 4B). Однако, репортеры NFAT-Luc также были стимулированы, хотя и до меньшей степени (фигура 4C). Когда соединение ICI 118551, как известно, действующее как обратный агонист на ADBR2, добавляли к клеткам, трансфицированным ADBR2 и CRE-Luc, определили, что ICI 118551 специфически ингибировало активность ADBR2 с использованием репортера CRE-Luc, по сравнению с неспецифическим контрольным соединением (пирензепином), как показано на фигуре 4D. В отличие от этого, когда соединение ICI 118551 добавляли к клеткам, трансфицированным ADBR2 и NFAT-luc, определили, что соединение ICI 118551 не модулировало активность репортеров NFAT-Luc с использованием сверхэкспрессии ADBR2 (фигура 4E), показывая, что активация репортеров NFAT-Luc посредством временно трансфицированного ADBR2 являлась неспецифической.

Этот эксперимент показывает, что сверхэкспрессии GPCR может приводить к ложной активации репортерных генов. Таким образом, модуляция соединением GPCR

необходима для подтверждения точности пути передачи сигналов, первоначально прогнозированного на основании активации репортерных конструкций в анализе, основанном единственно на сверхэкспрессии GPCR.

ПРИМЕР 3

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПУТЕЙ ПЕРЕДАЧИ СИГНАЛОВ GPR174

Для определения того, какие пути передачи сигналов GPR174 могут быть активированы, GPR174 тестировали с использованием репортерных конструкций pAP1-Luc, pNFAT-Luc, pGL4.30, pCRE-Luc, pGL4.29, pSRE-Luc, pGL4.33 и pGL4.34 (Stratagene, CA и Promega, WI). Используемый алгоритм показан на фигуре 3.

Анализ репортеров проводили посредством временной трансфекции увеличивающимися количествами конструкции GPR174 pCMV6-XL4-GPR174 (SC104514, Origene, MD), pNFAT-Luc, pGL4.30, pAP1-Luc, pCRE-Luc, pGL4.29 (100 нг), pSRE-Luc, pGL4.33 или pGL4.34 и ТК-*genilla* в качестве внутреннего контроля (0,3 нг, (Promega) с липофектаминам 2000 (2 мкг, Invitrogen CA), в соответствии с инструкциями производителя. Смесь ДНК/липофектамина 2000 (100 мкл) инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут и затем добавляли в 24-луночные культуральные планшеты (Corning, NY), содержащие на 70-90% конфлюэнтные, культивированные клетки, как правило, линии клеток HEK293 или CHO (ATCC, VA), в 500 мкл сред. Клетки далее инкубировали в течение 4-6 часов при 37°C и затем 500-1000 мкл дополнительных сред добавляли в каждую лунку трансфицированных клеток. На следующие сутки, среды удаляли, и клетки лизировали. Активность люциферазы и *genilla* измеряли с использованием двойной системы для анализа люциферазы (Promega, WI), в соответствии с инструкциями производителя. Как правило, буфер для лизиса (100 мкл) добавляли к клеткам и инкубировали при комнатной температуре в течение 20-30 минут, чтобы позволить лизис клеток. В лизате (10 мкл) измеряли активность люциферазы и *genilla* с использованием реагента LARII и Stop&Glo (50 мкл каждого) с использованием SpectraMax L (Molecular Devices, CA). Данные анализировали с использованием либо Excel (Microsoft, WA), либо Prism 4.03 (GraphPad, CA).

Сверхэкспрессия GPR174 сильно активировала две репортерные конструкции Cre-luc (таблица 4), позволяя предполагать, что GPR174 активирует путь передачи сигналов Gs для активации аденилатциклазы. Данные также показывают, что GPR174 не активирует семейство Gq или G12/13 белков G. Как описано в настоящем описании, определили, что GPR174 не активирует путь передачи сигналов Gi.

Таблица 4: Кратность стимуляции репортерных конструкций с использованием титрования GPR174.

GPR174 (нг ДНК)	S-Cre	S-NFAT	S-Sre	AP-1	P-Cre	P-NFAT	P-Sre	Srf
0 нг	1	1	1	1	1	1	1	1
5 нг	40	2,1	0,9	2,0	52	2,2	1,0	0,9
25 нг	52	1,8	0,8	2,6	145	8,0	1,4	1,1
100 нг	93	2,2	1,0	2,6	252	4,2	1,5	1,2
250 нг	102	2,4	1,1	3,3	298	3,2	1,6	1,2

Примечание: «S» обозначает репортерные конструкции от Stratagene. «P» обозначает репортерные конструкции от Promega

Чтобы наблюдать, может ли GPR174 быть сопряжен с путем передачи сигналов Gi в дополнение к пути передачи сигналов Gs, GPR174 тестировали с использованием химерных белков G с Gq и Gs следующим образом.

Анализ репортеров Gi с использованием химерных белков Gs проводили посредством временной трансфекции увеличивающимися количествами конструкции GPR174 pCMV6-XL4-GPR174 (SC104514, Origene, MD), различными количествами Gas-t, Gas-i, Gas-o или Gas-z, pCRE-Luc или pGL4.29 (100 нг) и ТК-renilla в качестве внутреннего контроля (0,3 нг) с липофектаминам 2000 (2 мкг) (Invitrogen, CA), в соответствии с спецификациями производителя.

Смесь ДНК/липофектамина 2000 (100 мкл) инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут и затем добавляли в 24-луночные культуральные планшеты (Corning, NY), содержащие на 70-90% конфлюэнтные, культивированные клетки, как правило, линии клеток HEK293 или CHO (ATCC, VA), в 500 мкл сред. Клетки далее инкубировали в течение 4-6 часов при 37°C и затем 500-1000 мкл дополнительных сред добавляли в каждую лунку трансфицированных клеток. На следующие сутки среды удаляли, и клетки лизировали. Активность люциферазы и renilla измеряли с использованием двойной системы для анализа люциферазы (Promega, WI), в соответствии с инструкциями производителя. Как правило, буфер для лизиса (100 мкл) добавляли к клеткам и инкубировали при комнатной температуре в течение 20-30 минут, чтобы позволить лизис клеток. В лизате (100 мкл) измеряли активность люциферазы и renilla с использованием реагента LARII и Stop&Glo (50 мкл каждого) с использованием SpectraMax L (Molecular Devices, CA). Данные анализировали с использованием либо Excel (Microsoft, WA), либо Prism 4,03 (GraphPad, CA). Анализ репортеров Gi с использованием химерных белков Gq проводили посредством временной трансфекции увеличивающимися количествами конструкции GPR174 pCMV6-XL4-GPR174, различными количествами либо RD-PGQI5 (Gqi5), либо RD-PGQO5 (Gqo5) (Molecular Devices, CA), pNFAT-Luc, pGL4.30, pAP1-Luc и ТК-renilla в качестве внутреннего контроля (0,3 нг, Promega) с липофектаминам 2000 (2 мкг) (Invitrogen, CA), в соответствии с инструкциями производителя. Смесь ДНК/липофектамина 2000 (100 мкл) инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут и затем добавляли в 24-луночные культуральные планшеты (Corning, NY), содержащие на 70-90% конфлюэнтные, культивированные клетки, как правило, линии

клеток НЕК293 или CHO (ATCC, VA), в 500 мкл сред. Клетки далее инкубировали в течение 4-6 часов при 37°C и затем 500-1000 мкл дополнительных сред добавляли в каждую лунку трансфицированных клеток. На следующие сутки среды удаляли, и клетки лизировали. Активность люциферазы и *renilla* измеряли с использованием двойной системы для анализа люциферазы (Promega, WI), в соответствии с инструкциями производителя. Как правило, буфер для лизиса (100 мкл) добавляли к клеткам и инкубировали при комнатной температуре в течение 20-30 минут чтобы позволить лизис клеток. В лизате (10 мкл) измеряли активность люциферазы и *renilla* с использованием реагента LARII и Stop&Glo (50 мкл с использованием SpectraMax L (Molecular Devices, CA). Данные анализировали с использованием либо Excel (Microsoft, WA), либо Prism 4.03 (GraphPad, CA).

Как показано в таблице 5, титрование GPR174 с использованием химерных белков Gq G Gαq-i5 и Gαq-o5, значимо не активировало репортеры AP1, NFAT или SRE. Подобным образом, титрование GPR174 с использованием химерных белков Gs G, Gas-t, Gas-i, Gas-o или Gas-z дополнительно не активировало репортер Cre, по сравнению с отсутствием химерного с Gs G белка (таблица 6). Эти результаты показывают, что GPR174 не сопряжен с путем передачи сигналов Gi.

Таблица 5: Кратность стимуляции репортерных конструкций с использованием титрования GPR174 и либо Gqі5, либо Gqо5.

GPR174 (нг ДНК)	AP1-Gqі5	AP1-Gqо5	AP1-контроль	NFAT-Gqі5	NFAT-Gqо5	NFAT-контроль	Sre-Gqі5	Sre-Gqо5	SRE-контроль
0 нг	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5 нг	2,1	2,2	1,9	1,7	0,8	2,6	1,3	1,6	1,1
25 нг	3,7	4,6	2,2	2,1	1,1	2,6	1,5	2,0	1,3
100 нг	3,1	4,4	1,7	2,0	1,3	2,4	2,1	2,7	1,5
250 нг	2,6	4,3	2,1	1,6	1,1	2,3	2,6	2,7	1,6

Таблица 6: Кратность стимуляции репортерной конструкции Cre с использованием титрования GPR174 и либо Gs-t, Gs-o, Gs-l, Gs-z, либо отсутствия химеры Gs.

GPR174 (нг ДНК)	Cre/Gs-t	Cre/Gs-o	Cre/Gs-i	Cre/Gs-z	Cre/отсутствие химеры Gs
0 нг	1	1	1	1	1
5 нг	8,8	5,6	101	2,2	134
25 нг	13,7	19,3	184	3,7	198
100 нг	16,9	22,4	263	4,9	270
250 нг	19,7	20,9	259	3,7	210

В общем, результаты, описанные в анализах репортеров, описанных выше, показывает, что GPR174 стимулирует путь передачи сигналов Gs и не сопряжен с путями передачи сигналов Gi, Gq или G12/13.

ПРИМЕР 4

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ИДЕНТИФИЦИРОВАННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

Анализы репортеров, описанных выше, в примере 3 показывают, что GPR174 стимулирует путь передачи сигналов Gs. Репрезентативные соединения из каждой из

химических групп I-VI (показанных в таблице 1), которые определены как взаимодействующие с GPR174 в анализе CRA, тестировали в анализе репортера, и для определения специфичности передачи сигналов GPR174 и характера взаимодействующего с GPR174 соединения.

Анализ репортеров

Соединения тестировали в репортерной системе с использованием увеличивающихся концентраций взаимодействующих с GPR174-соединений. Конструкция GPR174 pCMV6-XL4-GPR174 или ADBR2, представляющий интерес репортер, pCRE-Luc или GL4,29 (3000 нг), и TK-renilla в качестве внутреннего контроля (10 нг) с липофектаминам 2000 (60 мкг) (Invitrogen, CA), в соответствии с инструкциями производителя.

Смесь ДНК/липофектамина 2000 (3000 мкл) инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут и затем добавляли в 10 см культуральную чашку (Corning, NY), содержащую на 70-90% конфлюэнтные, культивированные клетки, как правило, линии клеток HEK293 или CHO (ATCC, VA), в 15 мл сред. Клетки далее инкубировали в течение 4-6 часов при 37°C и затем среды удаляли, и клетки открепляли с использованием 2 мл трипсина (Life Technologies, CA). Среды (26 мл) добавляли к открепленным клеткам, и 120 мкл трансфицированных клеток переносили в каждую лунку в 96-луночном планшете. Увеличивающуюся концентрацию каждого соединения в DMSO (1,2 мкл) добавляли к клеткам после посева в 96-луночный планшет. Клетки далее инкубировали при 37°C в течение различных периодов времени. Среды удаляли, и клетки лизировали. Активность люциферазы и renilla измеряли с использованием двойной системы для анализа люциферазы (Promega, WI), в соответствии с инструкциями производителя. Как правило, буфер для лизиса (25 мкл) добавляли к клеткам и инкубировали при комнатной температуре в течение 20-30 минут, чтобы позволить лизис клеток. В лизате (10 мкл) измеряли активность люциферазы и renilla с использованием реагента LARII и Stop&Glo (50 мкл каждого) с использованием SpectraMax L (Molecular Devices, CA). Данные анализировали с использованием либо Excel (Microsoft, WA), либо Prism 4.03 (GraphPad, CA).

Каждое из соединений 1-59 взаимодействующих с GPR174, как показано в таблице 1, титровали против GPR174 и контрольного рецептора, ADBR2. ADBR2 представляет собой GPCR, подобный GPR174, который активирует путь передачи сигналов Gs.

Результаты анализа передачи сигналов, титрующего GPR174 человека с использованием pCRE-Luc и увеличивающейся концентрации соединений, показанных в таблице 1, представлены в таблице 1 (значения EC50 и кратность эффекта). Как показано в таблице 1, в группе I, соединения 1, 2, 5-18 и 53 представляют собой обратные агонисты, и соединения 3-4, как обнаружено, не являются модуляторами в анализе передачи сигналов и таким образом, охарактеризованы как либо антагонисты, либо аллостерические модуляторы GPR174. Как далее описано в этом примере, определили, что соединение 4 действительно конкурирует с агонистом GPR174 LysoPS, и таким образом, как

подтверждено, представляет собой антагонист GPR174. В группе II, оба соединения 19 и 20, как обнаружено, не являются модуляторами в анализе передачи сигналов и таким образом, охарактеризованы как либо антагонисты, либо аллостерические модуляторы GPR174. В группе III, соединение 21, как подтверждено, не является модулятором в анализе передачи сигналов и таким образом, охарактеризовано как антагонист GPR174 или аллостерический модулятор. В группе IV, соединения 22-55 представляют собой обратные агонисты. В группе V, соединение 56, как подтверждено, представляет собой обратный агонист. В группе VI, соединения 57 и 58, как обнаружено, представляют собой антагонисты или аллостерические модуляторы GPR174.

Результаты анализа передачи сигналов для репрезентативных взаимодействующих с GPR174 соединений представлены на ФИГУРАХ 6-20.

Как показано на ФИГУРЕ 6А, соединение 1 (группа I) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174, но не ингибировало путь Gs в присутствии ADBR2 (ФИГУРА 6В), показывая, что соединение 1 представляет собой специфический обратный агонист GPR174.

Как показано на ФИГУРЕ 7А, соединение 2 (группа I) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174, но не ингибировало путь Gs в присутствии ADBR2 (ФИГУРА 7В), показывая, что соединение 2 представляет собой специфический обратный агонист GPR174.

Как показано на ФИГУРЕ 5А и в таблице 1, для соединения 4 показана кривая зависимости ответа от дозы против GPR174 в анализе CRA. Как показано на ФИГУРЕ 8А, соединение 4 (группа I) не модулировало путь Gs в присутствии GPR174 и не модулировало путь Gs в присутствии ADBR2 (ФИГУРА 8В), таким образом соединение 4 охарактеризовано как антагонист GPR174.

Как показано на ФИГУРЕ 9А, соединение 6 (группа I) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174, но не ингибировало путь Gs в присутствии ADBR2 (ФИГУРА 9В), показывая, что соединение 6 представляет собой специфический обратный агонист GPR174.

Как показано на ФИГУРЕ 10А, соединение 7 (группа I) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174, но не ингибировало путь Gs в присутствии ADBR2 (ФИГУРА 10В), показывая, что соединение 7 представляет собой специфический обратный агонист GPR174.

Как показано на ФИГУРЕ 11А, соединение 10 (группа I) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174, но не ингибировало путь Gs в присутствии ADBR2 (ФИГУРА 11В), показывая, что соединение 10 представляет собой специфический обратный агонист GPR174.

Как показано на ФИГУРЕ 12А, соединение 11 (группа I) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174 но не ингибировало путь Gs в присутствии ADBR2 (ФИГУРА 12В), показывая, что соединение 11 представляет собой специфический обратный агонист

GPR174.

Как показано в таблице 1, соединение 19 имеет активность в анализе CRA. Как показано на ФИГУРЕ 13А, соединение 19 (группа II) не модулировало путь Gs в присутствии GPR174 и не модулировало путь Gs в присутствии ADBR2 (ФИГУРА 13В), таким образом, соединение 19 охарактеризовано как антагонист или аллостерический модулятор GPR174.

Как показано в таблице 1, соединение 21 имеет активность в анализе CRA. Как показано на ФИГУРЕ 14А, соединение 21 (группа III) не модулировало путь Gs в присутствии GPR174 и не модулировало путь Gs в присутствии ADBR2 (ФИГУРА 14В), таким образом, соединение 21 охарактеризовано как антагонист или аллостерический модулятор GPR174.

Как показано на ФИГУРЕ 15А, соединение 22 (группа IV) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174, но не ингибировало путь Gs в присутствии ADBR2 (ФИГУРА 15В), показывая, что соединение 22 представляет собой специфический обратный агонист GPR174.

Как показано на ФИГУРЕ 16А, соединение 23 (группа IV) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174, но не ингибировало путь Gs в присутствии ADBR2 (ФИГУРА 16В), показывая, что соединение 23 представляет собой специфический обратный агонист GPR174.

Как показано на ФИГУРЕ 17А, соединение 31 (группа IV) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174, но не ингибировало путь Gs в присутствии ADBR2 (ФИГУРА 17В), показывая, что соединение 31 представляет собой специфический обратный агонист GPR174.

Как показано на ФИГУРЕ 18А, соединение 33 (группа IV) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174, но не ингибировало путь Gs в присутствии ADBR2 (ФИГУРА 18В), показывая, что соединение 33 представляет собой специфический обратный агонист GPR174.

Как показано на ФИГУРЕ 19А, соединение 36 (группа IV) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174, но не ингибировало путь Gs в присутствии ADBR2 (ФИГУРА 19В), показывая, что соединение 36 представляет собой специфический обратный агонист GPR174.

Как показано на ФИГУРЕ 20А, соединение 42 (группа IV) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174, но не ингибировало путь Gs в присутствии ADBR2 (ФИГУРА 20В), показывая, что соединение 42 представляет собой специфический обратный агонист GPR174.

Соединение 4, как подтверждено, представляет собой антагонист GPR174

Для подтверждения того, что взаимодействующее с GPR174 соединение 4 представляет собой антагонист опосредованной GPR174 передачи сигналов Gs, анализ GloSensor проводили с использованием увеличивающихся концентраций соединения 4 в

присутствии или в отсутствие фиксированной концентрации (1 мкМ) агониста GPR174 LysoPS следующим образом.

Анализ GloSensor проводили посредством временной трансфекции конструкции GPR174, pCMV6-XL4-GPR174 или ADBR2, pGlo22 (300 нг) (Promega) с липофектаминоном 2000 (60 мкг) (Invitrogen, CA), в соответствии с инструкциями производителя. Смесь ДНК/липофектамина 2000 (3000 мкл) инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут и затем добавляли в 10 см культуральную чашку (Corning, NY), содержащую на 70-90% конфлюэнтные, культивированные клетки, как правило, линии клеток HEK293 или CHO (ATCC, VA), в 15 мл сред. Клетки далее инкубировали в течение 4-6 часов при 37°C и затем среды удаляли, и клетки открепляли с использованием 2 мл трипсина (Life Technologies, CA). Среды (26 мл) добавляли к открепленным клеткам, и 100 мкл трансфицированных клеток переносили в каждую лунку в 96-луночной планшете. Клетки далее инкубировали при 37°C в течение ночи. На следующие сутки, среды удаляли, и 100 мкл сред для уравнивания (Promega) добавляли в каждую лунку по инструкциям производителя. Клетки затем инкубировали при комнатной температуре в течение 2 часов, и планшеты с клетками предварительно считывали с использованием SpectraMax L (Molecular Devices, CA). После предварительного считывания, увеличивающиеся концентрации каждого соединения в DMSO (1,0 мкл) добавляли к клеткам. Планшеты с клетками, содержащие соединение, считывали немедленно после добавления соединения и в различные моменты времени, вплоть до 30 минут после добавления соединения с использованием SpectraMax L (Molecular Devices, CA). Данные анализировали с использованием либо Excel (Microsoft, WA), либо Prism 4.03 (GraphPad, CA).

Как показано на ФИГУРЕ 21А, соединение 4 не модулирует путь Gs в присутствии GPR174, но конкурирует с агонистом GPR174 LysoPS. Как показано на ФИГУРЕ 21В, ни соединение 4, ни LysoPS не модулируют передачу сигналов Gs в присутствии ADBR, таким образом, подтверждая, что соединение 4 представляет собой специфический антагонист для GPR174.

С учетом этих результатов, соединения 1, 2, 5-18 и 22-55 охарактеризованы как обратные агонисты GPR174. Соединения 3, 19-21 и 57-58 охарактеризованы как антагонисты или аллостерические модуляторы GPR174. Соединение 4 охарактеризовано как антагонист GPR174. Модуляция передачи сигналов GPR174, наблюдаемая в анализах репортеров CRE-Luc, показывает, что GPR174 передает сигналы посредством Gs. Как описано в этом примере, авторы настоящего изобретения однозначно определили, что соединения, функционально взаимодействующие с GPR174, модулируют передачу через GPR174 сигналов Gs.

ПРИМЕР 5

ПРОФИЛЬ ЭКСПРЕССИИ GPR174 В ТКАНЯХ ЧЕЛОВЕКА ПО RT-ПЦР

Профиль экспрессии GPR174 анализировали в тканях человека следующим образом. Массив нормальных кДНК человека закупили из OriGene (кат. #HMRT103).

Количественную ПЦР (qПЦР) проводили для каждого образца кДНК в четырех репликах с использованием специфических для GAPDH (контроль для нормализации) и GPR174 праймеров. ФИГУРА 22 графически иллюстрирует относительное содержание транскрипта GPR174 в тканях человека, как измерено посредством qПЦР. Как показано на ФИГУРЕ 22, GPR174 сильно экспрессируется во множестве тканей, включая тимус, лимфатические узлы, селезенку и костный мозг.

Для определения профиля экспрессии GPR174 в лимфоидных клетках человека, нейтрофилы, дендритные клетки, В клетки, CD4⁺ Т-клетки и CD8⁺ Т-клетки человека закупали из Astarte Biologics. РНК выделяли с использованием набора PureLink RNA Micro Scale (Life Technologies). кДНК получали из тотальной РНК с использованием набора для синтеза первой цепи SuperScript III (Life Technologies) с использованием случайных праймеров. Количественную ПЦР (qПЦР) проводили для каждого образца кДНК в четырех репликах с использованием специфических для GAPDH (контроль для нормализации) и GPR174 праймеров. ФИГУРА 23 графически иллюстрирует относительное содержание транскрипта GPR174 в лимфоидных клетках человека, как измерено посредством qПЦР. Как показано на ФИГУРЕ 23, в лимфоидных тканях человека, GPR174 экспрессируется на высоких уровнях в наивных В и Т-клетках, и особенно в регуляторных Т-клетках (см. Barnes et al., 2015, выше).

ПРИМЕР 6

Этот пример показывает, что репрезентативное ингибирующее GPR174 соединение 10 уменьшает долю высоко супрессивных Т-рег (FoxP3⁺Helios⁺) в культивированных PBMC человека.

Следующие эксперименты проводили для анализа того, является ли репрезентативное ингибирующее GPR174 соединение 10 (группа I) способным модулировать поведение регуляторной Т-клетки (Т-рег).

Проводили эксперимент с мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC) человека для тестирования образования и выживаемости Т-рег с использованием способов, описанных в Gavin et al., *Proc Natl Acad Sci* 103:6659-664, 2006, содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

В кратком описании, PBMC человека, полученные от донора-добровольца, доводили до плотности 2×10^6 клеток/мл, стимулировали с использованием 100 нг/мл антитела против CD3 и 100 нг/мл антитела против CD28, и обрабатывали с использованием 100 мкМ обратного агониста GPR174 соединения 10 (показанного в таблице 1) или 100 ед./мл IL-2. Фракцию клеток отбирали для окрашивания на сутки 3 после стимуляции, в то время как остальные клетки разводили 1:4 свежей средой и использовали для окрашивания на сутки 7 после стимуляции. Для определения доли естественных Т-рег (nТ-рег) клеток (FoxP3⁺Helios⁺), PBMC промывали, окрашивали флуоресцентно мечеными антителами против CD4, фиксировали, пермеабелизовали и окрашивали смесью флуоресцентных антител против FoxP3 и против Helios. Меченые клетки анализировали посредством

проточной цитометрии по популяциям, окрашенным по этим трем маркерам. Каждый эксперимент проводили в трех репликах и повторяли пять раз.

Эффект соединения 10 на продукцию IL-2 и IFN- γ в РВМС человека определяли следующим образом. РВМС от одного донора доводили до плотности 2×10^6 клеток/мл, стимулировали с использованием 100 нг/мл антитела против CD3 и 100 нг/мл антитела против CD28 и обрабатывали с использованием 1 мкМ, 3 мкМ, или 10 мкМ соединения 10. Супернатант из этих клеток отбирали на сутки 2 после стимуляции, и уровни IL-2 и IFN- γ определяли посредством анализа ELISA с использованием наборов для ELISA Ready-SET-Go от Affimetrix Ebioscience, в соответствии с инструкциями производителя.

ФИГУРА 24А графически иллюстрирует процент FoxP3+Helios- клеток в CD4+ популяции клеток на сутки 3 после стимуляции в культурах РВМС, обработанных носителем, соединением 10 или IL-2 ($p=0,03$ для соединения 10 против носителя; $p=0,003$ для IL-2 против носителя). ФИГУРА 24В графически иллюстрирует процент FoxP3+Helios+ клеток в D4+ популяции клеток на сутки 7 после стимуляции в культурах РВМС, обработанных носителем, соединением 10 или IL-2 ($p=0,01$ для соединения 10 против носителя; $p=0,01$ для IL-2 против носителя). Как показано на ФИГУРЕ 24А, обратный агонист GPR174 соединение 10 значительно увеличивало долю обычных (FoxP3+Helios-) Т-клеток; в то время как на сутки 7, соединение 10 значительно уменьшало содержание дважды положительных (FoxP3+Helios+) nT-рег клеток (ФИГУРА 24В).

ФИГУРА 25 графически иллюстрирует количество IL-2 в культуральных супернатантах (кратность по сравнению с уровнями для носителя) на сутки 2 после стимуляции в культурах РВМС, обработанных носителем или соединением 10 (1 мкМ, 3 мкМ или 10 мкМ). ФИГУРА 26 графически иллюстрирует количество IFN- γ в культуральных супернатантах (кратность по сравнению с уровнями для носителя) на сутки 2 после стимуляции в культурах РВМС, обработанных носителем или соединением 10 (1 мкМ, 3 мкМ или 10 мкМ). Как показано на ФИГУРЕ 25, соединение 10 увеличивало уровни IL-2 зависимым от дозы образом и при концентрации настолько низкой, как 1 мкМ. Сходные эффекты, показывающие увеличенные уровни IL-2, наблюдали в эксперименте с использованием культур РВМС после обработки соединением 6 (данные не представлены). Подобным образом, как показано на ФИГУРЕ 26, соединение 10 увеличивало количество интерферона гамма (IFN- γ) зависимым от дозы образом.

Как описано в этом примере, анализы на основе клеток проводили с использованием РВМС человека для тестирования образования и выживаемости Т-рег, в соответствии с направлениями наблюдений, сделанных в Gavin et al. (*PNAS* 103:6659-6665, 2006). Для имитации активации Т-клетки посредством антигенпредставляющих клеток, РВМС стимулировали с использованием антитела против CD3 и антитела против CD28, и тестируемые вещества (нацеливающее на GPR174 соединение 10; IL-2; или контрольный носитель) добавляли немедленно после этого. Клетки собирали через 3 и 7 суток, фиксировали, окрашивали флуоресцентными антителами против маркера Т-клеток-

помощников CD4 и факторов транскрипции Т-рег, фактора, имеющего бокс forkhead P3 (FoxP3) и фактора Helios.

После активации Т-клетки, FoxP3 подвергается временной повышающей регуляции в обычных (т.е., эффекторных Т-клетках) (FoxP3⁻Helios⁻) Т-клетках, с образованием FoxP3⁺Helios⁺ популяции на сутки 3, которая уменьшается или отсутствует на сутки 7. В отличие от этого, предсуществующая естественная Т-рег (nТ-рег) популяция, определенная как FoxP3⁺Helios⁺, персистирует в течение этих временных рамок и все еще представляет 1-5% CD4⁺ Т-клеток на сутки 7. Поскольку nТ-рег клетки не подвергаются пролиферации так быстро, как обычные Т-клетки, после активации Т-клетки, относительное содержание nТ-рег может уменьшаться в течение этих временных рамок, в зависимости от силы стимуляции Т-клетки.

Как показано на ФИГУРЕ 24А, обратный агонист GPR174 соединение 10 значимо увеличивало долю обычных (FoxP3⁺Helios⁻) Т-клеток; в то время как на сутки 7, соединение 10 значимо уменьшало содержание дважды положительных (FoxP3⁺Helios⁺) nТ-рег клетки (ФИГУРА 24В). Эти результаты показывают, что в РВМС человека, ингибирование GPR174 усиливает активацию иммунной системы, в то время как уменьшает также содержание nТ-рег клеток. Это является неожиданным обнаружением, принимая во внимание данные для мышей, описанные в Barnes et al. (2015, *выше*), которые показывают, что у самцов мышей, лишенных GPR174, количества Т-рег клеток были значимо увеличены в конкретных тканях. Как показано в этом примере, в клетках человека ингибирование GPR174 оказывает противоположный эффект на Т-рег, по сравнению с ингибированием GPR174 в клетках мыши. Отмечено, что отличия подгрупп эффекторных и регуляторных Т-клеток у человека от групп у мышей, описаны также для другого GPCR, GPR15 (см. Nguyen et al., *Nat Immunol* 16:207-213, 2015).

Для дальнейшей оценки свойств ингибирования GPR174 в клетках человека, авторы настоящего изобретения исследовали уровни выбранных цитокинов, продуцированных в ответ на обработку РВМС с использованием увеличивающихся концентраций соединения 10. Как показано на ФИГУРЕ 25, соединение 10 увеличивало уровни IL-2 зависимым от дозы образом и при концентрации, настолько низкой, как 1 мкМ. Подобным образом, как показано на ФИГУРЕ 26, соединение 10 увеличивало интерферон гамма (IFN- γ) зависимым от дозы образом.

Эти результаты показывают, что ингибирование GPR174 усиливает активность эффекторных Т-клеток, популяции клеток, важной для лечения воспалительных состояний и злокачественных опухолей (Ramsay et al., *British Journal of Haematology* 162:313-325, 2013). Кроме того, результаты показывают, что ингибирование GPR174 уменьшает содержание Т-рег. Уменьшение количества иммуносупрессивных Т-рег должно также являться полезным для иммунотерапии злокачественных опухолей, поскольку хорошо известно, что микроокружение опухоли является избирательно обогащенным по Т-рег, которые, в свою очередь, вносят вклад в неудачу иммунологического надзора в детекции

этих опухолей (см., например, Takeuchi and Nishikawa, Roles of regulatory T cells in cancer immunity, *International Immunol* 28:401-409, 2016). Уменьшение количества Т-рег клеток должно улучшать исходы лечения злокачественных опухолей. Опухоли используют множество путей для избегания иммунологического надзора. Одной из этих стратегий является создание иммуносупрессивного микроокружения посредством стимуляции развития Т-рег посредством индукции TGF- β или других способов. Т-рег обнаружены в множестве злокачественных опухолей и могут специфически размножаться в ответ на антигены опухолей. В моделях на мышах, уменьшение количества или уничтожение Т-рег увеличивает устойчивость организмов к злокачественным опухолям (Klages et al., *Cancer Res* 70:7788-7799, 2010; Li et al., 2010; Teng et al., *Cancer Res* 70:7800-7809, 2010; Bos et al., *J Exp Med*, 210:2435-2466, 2013). Высокая частота Т-рег клеток в опухолях солидных органов наиболее часто коррелирует с плохими исходами для пациентов. Мета-анализ множества исследований выявил, что инфильтрация Т-рег в опухолях коррелирует с плохим прогнозом для общей выживаемости при раке молочной железы и легкого, а также при других злокачественных опухолях, таких как колоректальный рак, рак шейки матки, почки, яичника, меланомы, рак поджелудочной железы, печеночноклеточный рак и рак желудка (Shang et al., *Sci Rep* 5:15179-15187, 2015).

Клиническая эффективность после блокады иммунной контрольной точки ассоциирована с нагрузкой соматических мутаций в клетках опухолей (Rizvi et al., *Science* 348:124-128, 2015; Snyder et al., *N. Engl. J. Med.* 371:2189-2199, 2014; Van Allen et al., *Science* 350: 207-211, 2015; Le et al., *N. Engl. J. Med.* 372:2509-2520, 2015). То есть, клиническое преимущество такой терапии является ограниченным теми пациентами, клетки злокачественных опухолей которых несут возникшие в результате мутаций неоантигены и являются узнаваемыми как «не свои» иммунной системы (Matsushita et al., *Nature* 482:400-404, 2012; Gubin et al., *Nature* 515:577-581, 2014). Т-рег, вовлеченные в толерантность к «своему», обеспечивающим преимущество образом контролируют активацию ответов Т-клеток на антигены злокачественных опухолей, происходящие из собственных составляющих (общие антигены), но являются менее супрессивными для Т-клеток, узнающих чужеродные антигены (Maeda et al., *Science* 346:1536-1540, 2014). Таким образом, прогнозируют, что объединение способов уменьшения супрессивной активности и/или количества Т-рег со способами блокирования молекул иммунных контрольных точек может расширять терапевтический спектр иммунотерапии злокачественных опухолей на пациентов с злокачественными опухолями, имеющих более низкое количество неоантигенов.

ПРИМЕР 7

В этом примере описан анализ эффекта ингибирующего GPR174 соединения 10 на продукцию IL-2 в спленоцитах мыши, полученных от мышей дикого типа или мышей с нокаутом GPR174.

Мышей с нокаутом (КО) GPR174 (также обозначенных как «FKSG79») получали,

как описано в Gragerov A. et al., *PNAS* vol 104(36):14406-14411, 2007. Культуры спленоцитов получали от четырех мышей GPR174 KO и четырех мышей дикого типа (WT). Суспензию отдельных клеток из селезенок индивидуальных мышей осаждали посредством центрифугирования, ресуспендировали в буфере для лизиса RBC для удаления эритроцитов, снова осаждали центрифугированием и ресуспендировали в среде для T-клеток (RPMI-1640, 10% FBS, 6 mM L-глутамин, 12,5 mM HEPES, 50 мкМ 2-меркаптоэтанол, пен./стреп.). Таким образом, подготовленные спленоциты рассеивали в 96-луночные планшеты при плотности 3×10^6 клеток/мл, 250 мкл/лунку и стимулировали с использованием 100 нг/мл антитела против CD3 и 100 нг/мл антитела против CD28. Клетки обрабатывали с использованием либо носителя (0,1% DMSO), либо ингибирующего GPR174 соединения 10 (10 мкМ). Через 48 часов, в супернатантах клеток анализировали уровни цитокина с использованием набора для детекции Th1-цитокинов мыши LEGENDplex (BioLegend). Анализировали четыре селезенки GPR174 KO и четыре селезенки WT, каждая в трех репликах.

ФИГУРА 27 графически иллюстрирует количество IL-2 (пг/мл) в культуральных супернатантах через 48 часов после стимуляции в культурах спленоцитов от мышей WT или GPR174 KO, обработанных носителем или соединением 10 (10 мкМ). Как показано на ФИГУРЕ 27, уровень IL-2 увеличен посредством обработки ингибирующим GPR174 соединением 10 в спленоцитах WT, но не GPR174 KO, где IL-2 является высоким без обработки. Значение p для различия между KO и WT в обработанных носителем спленоцитах составляет $p=0,02$. Не присутствует значимого различия между KO и WT в обработанной соединением 10 группе, или между обработанными соединением 10 клетками и обработанными носителем клетками KO.

Эти результаты показывают, что эффект соединения 10 на продукцию IL-2 (описанный в примере 6 и показанный на ФИГУРЕ 25) опосредован ингибированием GPR174.

ПРИМЕР 8

Этот пример показывает, что репрезентативное ингибирующее GPR174 соединение 10 уменьшает долю иммуносупрессивных T-reg (FoxP3⁺Helios⁺) и стимулирует продукцию IL-2 зависимым от дозы образом в культивированных мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) человека полученных от одного донора.

Проводили эксперимент с мононуклеарными клетками периферической крови человека с использованием способов, сходных с описанными выше, в примере 6, с той разницей, что эффект ингибирующего GPR174 соединения 10 анализировали в диапазоне концентраций (3 мкМ - 60 мкМ).

Кратко, PBMC человека, полученные от донора-добровольца, довели до плотности 2×10^6 клеток/мл, стимулировали с использованием 100 нг/мл антитела против CD3 и 100 нг/мл антитела против CD28, и обрабатывали с использованием 3 мкМ, 10 мкМ или 30 мкМ обратного агониста GPR174 соединения 10 (показанного в таблице 1), или

контрольного носителя. Фракцию клеток отбирали для окрашивания на сутки 3 после стимуляции, в то время как остальные клетки разводили 1:4 свежей средой и использовали для окрашивания на сутки 7 после стимуляции. Для определения доли естественных Т-рег (nT-рег) клеток (FoxP3⁺Helios⁺), PBMC промывали, окрашивали флуоресцентно меченными антителами против CD4, фиксировали, пермеабелизовали и окрашивали смесью флуоресцентных антител против FoxP3 и против Helios. Меченые клетки анализировали посредством проточной цитометрии по популяциям, окрашенным по этим трем маркерам. Каждый эксперимент проводили в трех репликах и повторяли три раза.

Эффект соединения 10 на продукцию IL-2 в PBMC человека определяли следующим образом. PBMC от одного донора доводили до плотности 2×10^6 клеток/мл, стимулировали с использованием 100 нг/мл антитела против CD3 и 100 нг/мл антитела против CD28 и обрабатывали с использованием 3 мкМ, 10 мкМ или 30 мкМ соединения 10. Супернатант из этих клеток отбирали на сутки 3 после стимуляции, и уровни IL-2 определяли посредством анализа ELISA с использованием наборов для ELISA Ready-SET-Go™ от Affimetrix Ebioscience и для иммуноанализов на основе бусин LEGENDplex™ от BioLegend, в соответствии с инструкциями производителя.

ФИГУРА 28 графически иллюстрирует процент FoxP3⁺Helios⁺ клеток в CD4⁺ популяции клеток на сутки 7 после стимуляции в культурах PBMC, обработанных носителем или соединением 10 (3 мкМ, 10 мкМ или 30 мкМ) (n=3, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$). Как показано на ФИГУРЕ 28, на сутки 7 после стимуляции, обратный агонист GPR174 соединение 10 значительно уменьшало содержание дважды положительных (FoxP3⁺Helios⁺) nT-рег клеток зависимым от дозы образом, результат согласуется с результатами, описанными в примере 6.

ФИГУРА 29 графически иллюстрирует количество IL-2 (пг/мл) в культуральных супернатантах на сутки 3 после стимуляции в культурах PBMC от индивидуального добровольца, где PBMC обрабатывали носителем или ингибирующим GPR174 соединением 10 (3 мкМ, 10 мкМ, 30 мкМ или 60 мкМ). Как показано на ФИГУРЕ 29, соединение 10 увеличивало уровни IL-2 в культуральных супернатантах зависимым от дозы образом, что согласуется с результатами, описанными в примере 6. IL-2 является главным цитокином, определяющим выживаемость и дифференцировку Т-клеток для эффекторных Т-клеток, Т-клеток памяти и регуляторных Т-клеток.

ПРИМЕР 9

В этом примере описан анализ эффекта репрезентативного ингибирующего GPR174 соединения 10 на Т-рег, IL-2 и другие цитокины в PBMC полученных от множества доноров.

Для подтверждения и дополнительного расширения результатов, описанных в примерах 6 и 8, эффект репрезентативного ингибирующего GPR174 соединения 10 на Т-рег, IL-2 и другие цитокины анализировали в культивированных культурах PBMC полученных от множества доноров-добровольцев.

Кратко, PBMC человека, полученные от восьми доноров-добровольцев, довели до плотности 2×10^6 клеток/мл, стимулировали с использованием 100 нг/мл антитела против CD3 и 100 нг/мл антитела против CD28, и обрабатывали с использованием 30 мкМ обратного агониста GPR174 соединения 10 (показанного в таблице 1). Фракцию клеток отбирали для окрашивания на сутки 2 после стимуляции, в то время как остальные клетки разводили 1:4 свежей средой и использовали для окрашивания на сутки 7 после стимуляции. Для определения доли естественных T-рег (nT-рег) клетки (FoxP3⁺Helios⁺), PBMC промывали, окрашивали флуоресцентно мечеными антителами против CD4, фиксировали, пермеабелизовали и окрашивали смесью флуоресцентных антител против FoxP3 и против Helios. Меченые клетки анализировали посредством проточной цитометрии по популяциям, окрашенным по этим трем маркерам. Каждый эксперимент проводили в трех репликах и повторяли пять раз.

Эффект соединения 10 на продукцию IL-2 в PBMC человека от каждого донора определяли следующим образом. PBMC от каждого донора довели до плотности 2×10^6 клеток/мл, стимулировали с использованием 100 нг/мл антитела против CD3 и 100 нг/мл антитела против CD28, и обрабатывали с использованием 30 мкМ соединения 10. Супернатант из этих клеток отбирали на сутки 2 после стимуляции, и уровни IL-2 определяли посредством анализа ELISA с использованием иммуноанализов на основе бусин LEGENDplex™ от BioLegend (San Diego, CA), в соответствии с инструкциями производителя.

Эффект соединения 10 на продукцию панели дополнительных цитокинов (интерлейкина 5 (IL-5), интерлейкина 13 (IL-13), интерлейкина 6 (IL-6), интерлейкина 9 (IL-9), интерлейкина 10 (IL-10), интерферона гамма (IFN-γ), фактора некроза опухоли альфа (TNF-α), интерлейкина 17A (IL-17A), интерлейкина 17F (IL-17F), интерлейкина 4 (IL-4) и интерлейкина 22 (IL-22)) в пулированных PBMC человека, полученных от восьми доноров, определяли следующим образом. PBMC от восьми доноров пулировали, затем довели до плотности 2×10^6 клеток/мл, стимулировали с использованием 100 нг/мл антитела против CD3 и 100 нг/мл антитела против CD28 и обрабатывали с использованием 30 мкМ соединения 10. Супернатант из этих клеток отбирали на сутки 2 после стимуляции, и уровни IL-5, IL-13, IL-6, IL-9, IL-10, IFN-γ, TNF-α, IL-17A, IL-17F, IL-4 и IL-22 определяли посредством ELISA с использованием иммуноанализов на основе бусин LEGENDplex™ от BioLegend (San Diego, CA), в соответствии с инструкциями производителя.

ФИГУРА 30 графически иллюстрирует долю от значения для носителя FoxP3⁺Helios⁺ клеток в CD4⁺ популяции клеток на сутки 7 после стимуляции в культурах PBMC от восьми различных доноров, обработанных носителем или соединением 10 (30 мкМ). Как показано на ФИГУРЕ 30, на сутки 7 после стимуляции, обратный агонист GPR174 соединение 10 значительно уменьшало содержание дважды положительных (FoxP3⁺Helios⁺) nT-рег клеток в культурах PBMC от всех восьми доноров, результат согласуется с результатами, описанными в примерах 6 и 8.

ФИГУРА 31 графически иллюстрирует количество IL-2 (кратность по сравнению с носителем) в культуральных супернатантах на сутки 2 после стимуляции в культурах РВМС от восьми различных доноров, обработанных носителем или соединением 10 (30 мкМ). Как показано на ФИГУРЕ 31, соединение 10 увеличивало уровни IL-2 в каждой из культур РВМС от восьми доноров, со средним приблизительно 5 раз, что согласуется с результатами, описанными в примерах 6 и 8.

ФИГУРА 32 графически иллюстрирует количество различных цитокинов (кратность по сравнению с носителем) в культуральных супернатантах на сутки 2 после стимуляции для РВМС человека, полученных от восьми доноров, обработанных носителем или соединением 10 (30 мкМ). Как показано на ФИГУРЕ 32, статистически значимую кратность увеличения наблюдали для IL-6 ($***p < 0,001$), IL-10 ($*p < 0,05$), IFN- γ ($*p < 0,05$) и TNF- α ($*p < 0,05$) по сравнению с контрольным носителем. Как далее показано на ФИГУРЕ 32, статистически значимую кратность уменьшения наблюдали для IL-17A ($***p < 0,001$), по сравнению с контрольным носителем.

Отмечено, что индукцию IFN- γ наблюдали также в РВМС нечеловекообразного примата, собаки и крысы, но не мыши.

Результаты, полученные в этом примере подтверждают и дополнительно расширяют результаты, описанные в примерах 6 и 8, и показывают, что репрезентативный ингибитор GPR174, соединение 10, значимо уменьшал популяцию Т-рег в каждой из культур РВМС человека от восьми различных доноров. Дополнительно показано в пулированных РВМС человека, полученных от восьми доноров, что ингибирование GPR174 увеличивает, с статистической значимостью, уровни цитокинов IL-2 и IFN- γ , так же как IL-6, IL-10 и TNF- α . Увеличение в этой подгруппе цитокинов (IL-2, IFN- γ , IL-6, IL-10 и TNF- α) показывает, что ингибирование GPR174 активирует Th1-подгруппу Т-клеток, которые в основном обеспечивают ответы против внутриклеточных инфекционных агентов.

ПРИМЕР 10

В этом примере описан анализ эффекта репрезентативного ингибирующего GPR174 соединения 10 на цитокины, продуцированные в смешанных культурах спленоцитов, полученных из различных линий мышей.

Для стимуляции Т-клеток у мышей, спленоциты, полученные из двух различных линий мышей, C57BL/6 и DBA1, смешивали в культуре.

Начальный эксперимент проводили для определения временных рамок продукции цитокинов для совместно культивированных спленоцитов в котором продукцию цитокинов (IFN- γ , IL-5, TNF- α , IL-2, IL-6, IL-4, IL-10, IL-9, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 и IL-13) измеряли в супернатанте совместной культуры на сутки 2, сутки 4, и сутки 6 после смешивания в отсутствие соединения 10. Результаты показаны ниже в таблице 7.

Таблица 7: Совместная культура спленоцитов C57BL/6+DBA1

цитокин	Сутки 2 (пг/мл)	Сутки 4 (пг/мл)	Сутки 6 (пг/мл)
IFN- γ	871	36030	8648
IL-5	18	18	20
TNF- α	15	96	46
IL-2	263	1079	504
IL-6	14	369	106
IL-4	11	30	13
IL-10	22	93	50
IL-9	25	78	78
IL-17A	18	161	49
IL-17F	16	11	7
IL-21	26	26	26
IL-22	24	1098	288
IL-13	18	33	32

Как показано выше в таблице 7, пиковые уровни для каждого цитокина, измеренные в совместной культуре спленоцитов C57BL/6+DBA1 наблюдали на сутки 4, и они сохранялись на сутки 6 после смешивания.

Эффект соединения 10 на продукцию цитокинов (IFN- γ , IL-5, TNF- α , IL-2, IL-6, IL-4, IL-10, IL-9, IL17A, IL17F, IL-21, IL-22 и IL-13) в совместных культурах спленоцитов мыши определяли следующим образом. Спленоциты, полученные из двух различных линий мышей, C57BL/6 и DBA1, смешивали в культуре в присутствии или в отсутствие 30 мкМ соединения 10. Продукцию цитокинов IFN- γ , IL-5, TNF- α , IL-2, IL-6, IL-4, IL-10, IL-9, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 и IL-13 измеряли в супернатанте совместной культуры на сутки 4 и сутки 6 после смешивания. Уровни цитокинов определяли посредством иммуноанализов на основе бусин LEGENDplex™ от BioLegend (San Diego, CA), в соответствии с инструкциями производителя.

ФИГУРА 33 графически иллюстрирует кратность индукции посредством соединения 10 (30 мкМ) в панели цитокинов в совместно культивированных спленocyтocyтах C57BL/6+DBA1 мыши на сутки 6 после смешивания, по сравнению с уровнями цитокинов, измеренными в совместно культивированных C57BL/6+DBA1 спленocyтocyтах на сутки 6 в отсутствие соединения 10. Эти результаты показывают, что соединение 10 вызывает сильное изменение количеств цитокинов, продуцированных в ходе аллогенной стимуляции спленocyтocyтов, показывая, что ингибирование GPR174 значимо модулирует иммунный ответ. Отмечено, что кажущееся различие между группами цитокинов, индуцированных в PBMC человека (как описано в примере 9), по сравнению с спленocyтocyтами мыши, не является обязательно информативным, поскольку является сложным сравнение ответов относительно наивной иммунной системы животных, разводимых в практически стерильном и защищенном виварии, с ответами иммунной системы добровольцев-людей, подвергавшихся воздействию множества антигенов.

ПРИМЕР 11

В этом примере описано исследование, которое проводили для определения того, какие типы клеток в культурах PBMC человека являются ответственными за продукцию

цитокинов, индуцированную посредством репрезентативного ингибирующего GPR174 соединения 10.

В первом эксперименте, PBMC человека от двух различных доноров инкубировали в течение ночи в присутствии или в отсутствие соединения 10 (10 мкМ). Культуры PBMC стимулировали с использованием антитела против CD3 и антитела против CD28, и везикулярный транспорт одновременно блокировали с использованием GolgiStop™. Клетки фиксировали через четыре часа и окрашивали с использованием антител для маркеров типа клеток (FITC-антитела против CD3 и PerCP-Cy5.5-антитела против CD4) и IL-2 (PE-антитела против IL-2). Клетки анализировали посредством проточной цитометрии. Долю клеток с внутриклеточным IL-2 (PE-меченых) затем определяли в CD4⁺ и CD8⁺ популяциях Т-клеток, так же как в не-Т-клетках.

Во втором эксперименте, PBMC человека от двух различных доноров стимулировали с использованием антитела против CD3 и антитела против CD28 и инкубировали в отсутствие или в присутствии увеличивающихся концентраций соединения 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0 или 3,0 мкМ). Везикулярный транспорт блокировали через двое суток с использованием GolgiStop™. Клетки фиксировали через четыре часа и окрашивали с использованием антител для маркеров типа клеток (FITC-антитела против CD3, PerCP-Cy5.5- антитела против CD4, PE-антитела против CD56 и Pacific Blue- антитела против CD16) и любых из цитокинов IL-2, IL-10 и IFN- γ (все антитела против цитокинов являлись APC-меченными). Клетки анализировали посредством проточной цитометрии. Долю клеток с внутриклеточным IL-2, IFN- γ , IL-10 и TNF- α затем определяли в различных популяциях клеток.

Результаты первого эксперимента для одного из двух доноров показаны на ФИГУРАХ 34А-34С. Сходные результаты наблюдали также для второго донора (данные не представлены).

На ФИГУРЕ 34А показаны популяции CD4⁺ (46,2%), CD8⁺ (17,1%) и не-Т-клеток (33,9%), присутствующие в репрезентативной культуре PBMC через четыре часа после стимуляции антителом против CD3 и антителом против CD28 в присутствии соединения 10 (10 мкМ).

ФИГУРА 34В графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием IL-2 в популяции CD4⁺ Т-клеток, показанной на ФИГУРЕ 34А, обработанной соединением 10 (10 мкМ), по сравнению с контрольным носителем; и

ФИГУРА 34С графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием IL-2 в популяции CD8⁺ Т-клеток, показанной на ФИГУРЕ 34А, обработанной соединением 10 (10 мкМ), по сравнению с контрольным носителем.

Результаты второго эксперимента для одного из двух доноров показаны на ФИГУРАХ 35А-35М. Сходные результаты наблюдали также для второго донора (данные не представлены).

На ФИГУРЕ 35А показаны популяции CD4⁺ (31,8%), CD8⁺ (27,5%) и не-Т-клеток

(33,1%), присутствующие в репрезентативной культуре РВМС, через 2 суток после стимуляции антителом против CD3 и антителом против CD28 в присутствии соединения 10.

ФИГУРА 35В графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием IL-2 в популяции CD4⁺ Т-клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0 или 3,0 мкМ), репрезентативные для которых показаны на ФИГУРЕ 35А.

ФИГУРА 35С графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием IL-2 в популяции CD8⁺ Т-клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0 или 3,0 мкМ), репрезентативные для которых показаны на ФИГУРЕ 35А.

ФИГУРА 35D графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием IL-2 в популяциях не-Т-клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0 или 3,0 мкМ), репрезентативные для которых показаны на ФИГУРЕ 35А.

ФИГУРА 35Е графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием IL-10 в популяции CD4⁺ Т-клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0 или 3,0 мкМ), репрезентативные для которых показаны на ФИГУРЕ 35А.

ФИГУРА 35F графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием IL-10 в популяциях CD8⁺ Т-клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0 или 3,0 мкМ), репрезентативные для которых показаны на ФИГУРЕ 35А; и

ФИГУРА 35G графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием IL-10 в популяциях не-Т-клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0 или 3,0 мкМ), репрезентативные для которых показаны на ФИГУРЕ 35А.

ФИГУРА 35H графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием IFN- γ в популяции CD4⁺ Т-клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0 или 3,0 мкМ), репрезентативные для которых показаны на ФИГУРЕ 35А.

ФИГУРА 35I графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием IFN- γ в популяции CD8⁺ Т-клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0 или 3,0 мкМ), репрезентативные для которых показаны на ФИГУРЕ 35А.

ФИГУРА 35J графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием IFN- γ в популяциях не-Т-клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0 или 3,0 мкМ), репрезентативные для которых показаны на ФИГУРЕ 35А.

ФИГУРА 35К графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием TNF- α в популяции CD4⁺ Т-клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 или 10 мкМ), репрезентативные для которых показаны на ФИГУРЕ 35А.

ФИГУРА 35L графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием TNF- α в популяции CD8⁺ Т-клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 или 10 мкМ), репрезентативные для которых показаны на ФИГУРЕ 35А.

ФИГУРА 35М графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием TNF- α в популяциях не-Т-клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 или 10 мкМ), репрезентативные для которых показаны на ФИГУРЕ 35А.

Результаты дополнительной характеристики экспрессии IFN γ и TNF- α в не-Т-клетках (из ФИГУР 35А, 35J и 35М) показаны на ФИГУРАХ 36А-36Е. Эти результаты получены для одного донора. Сходные результаты наблюдали также для второго донора (данные не представлены).

На ФИГУРЕ 36А показана популяция не-Т-клеток из ФИГУРЫ 35А, сортированной на популяции CD56⁺CD16⁻ (2,27%), CD56⁺CD16⁺ (11,8%) и не-NK (78,5%), присутствующие в популяции не-Т-клеток в репрезентативной культуре РВМС через двое суток после стимуляции антителом против CD3 и антителом против CD28.

ФИГУРА 36В графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием IFN- γ в популяциях не-Т-CD56⁺CD16⁺ клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0 или 3,0 мкМ), репрезентативные для которых показаны на ФИГУРЕ 36А, и

ФИГУРА 36С графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием IFN- γ в популяциях не-Т-CD56⁺CD16⁻ клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0 или 3,0 мкМ), репрезентативные для которых показаны на ФИГУРЕ 36А.

ФИГУРА 36D графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием TNF- α в популяциях не-Т-CD56⁺CD16⁺ клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 или 10 мкМ), репрезентативные для которых показаны на ФИГУРЕ 36А, и

ФИГУРА 36Е графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием TNF- α в популяциях не-Т-CD56⁺CD16⁻ клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 или 10 мкМ), репрезентативные для которых показаны на ФИГУРЕ 36А.

Результаты, показанные на ФИГУРАХ 35А-М и ФИГУРАХ 36А-Е идентифицируют типы клеток, поддающихся влиянию посредством ингибирования GPR174 с использованием соединения 10: продукцию IL-2 и IL-10 индуцировали специфически в Т-

клетках, положительных как по CD4, так и по CD8, в то время как продукцию IFN- γ и TNF- α усиливали в положительных по CD4 и CD8 Т-клетки, так же как в NK-клетках. Эти данные устанавливают механизм иммунной стимуляции посредством ингибирования GPR174.

ПРИМЕР 12

В этом примере описано исследование, которое проводили для оценки последствий *in vivo* отсутствия активности GPR174 посредством сравнения эффекта иммунизации вирусом гриппа на уровень специфических для антигена вируса гриппа CD8⁺ Т-клеток у мышей дикого типа и мышей с нокаутом (КО) GPR174.

Воздействие на животных адаптированного для мышей вируса гриппа H1N1 A/PR/8/34 является широко используемой моделью для оценки иммунного ответа на острую инфекцию (см. Allen I.C., *Mouse Models of Innate Immunity: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol 1031: pp 177-188 (2013); Castiglioni P. et al., *J Immunol* 180:4956-64, 2008; Zak O., Sande MA (eds), *Handbook of Animal Models of Infection*, Academic Press: pp981-986, 1999). Соответственно, как описано в этом примере, проводили исследование для оценки последствий *in vivo* отсутствия активности GPR174 посредством сравнения эффекта иммунизации вирусом гриппа на уровень специфических для антигена вируса гриппа CD8⁺ Т-клеток у мышей дикого типа и мышей с нокаутом (КО) GPR174.

В первом эксперименте, мышей дикого типа (WT) и мышей GPR174 КО (полученных, как описано в примере 7) иммунизировали посредством внутрибрюшинной (ip) инъекции с использованием 1000 ГАЕ (гемагглютинирующих единиц) вируса гриппа A/PR/8/34. Через три недели, спленоциты получали от двух наивных, четырех иммунизированных WT и четырех иммунизированных мышей GPR174 КО и помещали в присутствии 2 мкМ известного для нуклеопротеина (NP) вируса гриппа антигенного пептида «ASNENMETM» (SEQ ID NO:5) для индукции предпочтительной пролиферации CD8⁺ Т-клеток, узнающих этот антиген в комплексе с представляющими молекулами МНС класса I. Через пять суток, количество CD8⁺ клеток, экспонирующих Т-клеточный рецептор (TCR), узнающий комплекс МНС-пептид вируса гриппа, оценивали посредством окрашивания спленоцитов с использованием антител против CD8 и декстрамеров МНС-ASNENMETM (Immudex, Denmark). Флуоресцентно меченные декстрамеры МНС представляют собой реагенты, которые несут множество комплексов МНС-пептид, и таким образом, имеют способность взаимодействовать одновременно с множеством TCR на одной Т-клетке, позволяя стабильное взаимодействие между реагентом и Т-клеткой, и которые в результате можно использовать для детекции и количественной оценки антигенспецифических Т-клеток.

Во втором эксперименте, четырех мышей WT и четырех мышей GPR174 КО иммунизировали посредством ip инъекции с использованием 1000 ГАЕ вируса гриппа A/PR/8/34. Через три недели после иммунизации, этих мышей подвергали бустер-иммунизации посредством второй инъекции 1000 ГАЕ вируса гриппа A/PR/8/34, и их спленоциты анализировали через 11 суток, вместе со спленоцитами от двух наивных

животных, посредством окрашивания декстрамером без предшествующей инкубации *in vitro*.

Результаты первого эксперимента показаны на ФИГУРЕ 37.

ФИГУРА 37 графически иллюстрирует количество окрашенных декстрамером клеток (антигенспецифических Т-клеток) как процент от тотальных CD8⁺ клеток в культурах спленоцитов, полученных от мышей WT и GPR174 KO через три недели после иммунизации вирусом гриппа A/PR/8/34, и культивированных в течение пяти суток в присутствии антигенного пептида NP. Спленоциты полученные от контрольных наивных мышей WT, также показаны на ФИГУРЕ 37. Как показано на ФИГУРЕ 37, культура спленоцитов от мышей GPR174 KO имеет более высокий процент окрашенных декстрамером CD8⁺ клеток (антигенспецифических Т-клеток) по сравнению с процентом окрашенных декстрамером CD8⁺ клеток в культурах спленоцитов, полученных от наивных мышей и мышей WT.

Результаты второго эксперимента показаны на ФИГУРЕ 38. ФИГУРА 38 графически иллюстрирует количество окрашенных декстрамером клеток (антигенспецифических Т-клеток) как процент от тотальных CD8⁺ клеток в спленоцитах, полученных от мышей WT и GPR174 KO, иммунизированных и бустер-иммунизированных через три недели с использованием 1000 ГАЕ вируса гриппа A/PR/8/34, где спленоциты анализировали через 11 суток после бустера. Спленоциты, полученные от контрольных наивных (N) мышей WT, также показаны на ФИГУРЕ 38. Как показано на ФИГУРЕ 38, спленоциты от мышей GPR174 KO имеют более высокий процент окрашенных декстрамером CD8⁺ клеток (антигенспецифических Т-клеток) по сравнению с количеством окрашенных декстрамером CD8⁺ клеток в спленоцитах, полученных от мышей WT и наивных мышей.

В общем, результаты в этом примере показывают, что в обоих условиях эксперимента, т.е., в присутствии или в отсутствие предшествующей инкубации *in vitro* антигенспецифических Т-клеток, присутствует тенденция к увеличению количества специфических для антигена вируса гриппа CD8⁺ Т-клеток в спленоцитах от мышей GPR174 KO, по сравнению с мышами WT, показывая, что GPR174 ограничивает иммунный ответ, и ингибирование GPR174 является иммуностимулирующим.

ПРИМЕР 13

В этом примере описано исследование, проведенное для оценки эффекта репрезентативного ингибирующего GPR174 соединения 10 на экспрессию ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами антигена 4 (CTLA4) на наивных Т-клетках человека и Т-клетках памяти человека.

Уровень техники/обоснование: CTLA4 экспрессируется Т-клетками, активированными посредством Т-клеточного рецептора и CD28. CTLA4 является гомологичным Т-клеточному костимулирующему белку, CD28, и обе молекулы связываются с CD80 и CD86, также называемыми B7-1 и B7-2 соответственно, на антигенпредставляющих клетках. CTLA-4 связывает CD80 и CD86 с большей аффинностью

и авидностью, чем CD28, таким образом, это позволяет ему побеждать в конкуренции с CD28 за его лиганды. CTLA4 обнаружен также в регуляторных Т-клетках и вносит вклад в их ингибирующую функцию. Блокирование или ингибирование CTLA4 служит в качестве способов обращения толерантности иммунной системы к опухоли, и таким образом, предоставляет способ иммунотерапии для пациентов с злокачественными опухолями (см., например, *Vaumeister S.H. et al., Ann Rev Immunol 34:539-73, 2016*). Этот способ называют терапией с блокированием иммунных контрольных точек.

Клетки РВМС от одного донора культивировали в течение ночи с дополнительными облученными антигенпредставляющими клетками (АРС) в присутствии различных концентраций ингибирующего GPR174 соединения 10 (0,019-6 мкМ) или эквивалентных концентраций носителя (DMSO). Антитело против CD3 (ОКТ3) затем добавляли в культуры на дополнительные 24 часа. Клетки анализировали посредством проточной цитометрии по экспрессии FOXP3, CTLA-4, CD4, CD3, CD45RA и CD25.

ФИГУРА 39А графически иллюстрирует долю наивных регуляторных Т-клеток (Т-рег) с положительным по CTLA-4 окрашиванием (процент от наивных Т-рег клеток (CD45RA+FOXP3+) в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,19, 0,38, 0,75, 1,5, 3,0 или 6,0 мкМ), через одни сутки после стимуляции, показывающую, что экспрессия CTLA4 уменьшена в наивных Т-рег клетках, обработанных ингибирующим GPR174 соединением 10, зависимым от дозы образом, по сравнению с обработанными контрольным носителем клетками.

ФИГУРА 39В графически иллюстрирует долю не регуляторных Т-клеток (не-Т-рег) с положительным по CTLA-4 окрашиванием (процент от наивных не-Т-рег клеток (CD45RA+FOXP3-) в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,19, 0,38, 0,75, 1,5, 3,0 или 6,0 мкМ) через одни сутки после стимуляции, показывающую, что экспрессия CTLA4 уменьшена в не-Т-рег клетках, обработанных ингибирующим GPR174 соединением 10 зависимым от дозы образом, по сравнению с обработанными контрольным носителем клетками.

ФИГУРА 40А графически иллюстрирует долю Т-рег памяти с положительным по CTLA-4 окрашиванием (процент от Т-рег памяти (CD45RA-FOXP3+) в культурах РВМС, обработанных ингибирующим GPR174 соединением 10 (0, 0,19, 0,38, 0,75, 1,5, 3,0 или 6,0 мкМ) через одни сутки после стимуляции, показывающую, что экспрессия CTLA4 уменьшена в Т-рег клетках памяти, обработанных соединением 10, зависимым от дозы образом, по сравнению с обработанными контрольным носителем клетками.

ФИГУРА 40В графически иллюстрирует долю не-Т-рег клеток памяти с положительным по CTLA-4 окрашиванием (процент от не-Т-рег памяти (CD45RA-FOXP3-) в культурах РВМС, обработанных ингибирующим GPR174 соединением 10 (0, 0,19, 0,38, 0,75, 1,5, 3,0 или 6,0 мкМ), через одни сутки после стимуляции, показывающую, что экспрессия CTLA4 уменьшена в не-Т-рег клетках памяти, обработанных соединением 10, зависимым от дозы образом, по сравнению с обработанными контрольным носителем

клетками.

В общем, результаты в этом примере показывают, что ингибирование GPR174 не только активирует иммунный ответ в Т-клетках, стимулированных посредством привлечения TCR и его костимулирующего белка CD28, но также предотвращает индукцию иммунной контрольной точки CTLA-4, которая в норме ограничивает активацию Т-клетки.

ПРИМЕР 14

В этом примере описано исследование, проведенное для оценки эффекта репрезентативного ингибирующего GPR174 соединения 10 на экспрессию PD-L1, TIGIT и других экспрессированных Т-клеткой молекулы иммунных контрольных точек на Т-клетках человека.

Лиганд 1 программируемой смерти (PD-L1), также известный как CD274 или B7-H1, представляет собой трансмембранный белок, который играет роль в супрессии иммунной системы. Связывание PD-L1 с PD-1 или B7.1 передает ингибирующий сигнал, который уменьшает пролиферацию Т-клеток и может также индуцировать апоптоз. По-видимому, повышающая регуляция PD-L1 позволяет злокачественным опухолям ускользать от иммунной системы хозяина. Множество ингибиторов PD-L1 находятся в разработке в качестве иммуноонкологических терапевтических средств, и для них показаны хорошие результаты (см., например, Vaumeister S.H. et al., *Ann Rev Immunol* 34:539-73, 2016; Teng F. et al., *Cancer Lett.* 414:166-173, 2017). Клинически доступные примеры включают дурвалумаб, атезолизумаб и авелумаб.

Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM (TIGIT) экспрессируется активированными цитотоксическими Т-клетками и регуляторными Т-клетками и, как показано также, подвергается повышающей регуляции на Т-клетках в множестве моделей злокачественных опухолей. Лиганды CD155 и CD112 обнаружены на дендритных клетках и макрофагах, и также экспрессируются на высоком уровне в нескольких типах злокачественных опухолей. Экспрессия TIGIT сильно коррелирует с экспрессией других коингибирующих молекул, включая PD-1. Исследования выявили TIGIT в качестве уникальной и потенциально комплементарной мишени для других ингибирующих иммунных контрольных точек. Во-первых, в дополнение к прямому ингибированию активности цитотоксической Т-клетки, TIGIT может подпитывать иммуносупрессивное микроокружение посредством своего влияния на другие иммунные клетки. Например, посредством связывания с CD155 на поверхности дендритных клеток, TIGIT увеличивает секрецию иммуносупрессивного цитокина интерлейкина-10, и привлечение TIGIT на регуляторных Т-клетках усиливает их иммуносупрессивные функции (см., например, Blake S.J. et al., *Clin Cancer Res* 22(21):5183-5188, 2016; Grogan J. et al. *J Immunother Cancer* 4(suppl 1):P209, 2016; Kurtulis S. et al., *J Clin Invest* 125(11):4053-4062, 2015; Lozano E. et al., *J Immunol* 188(8):3869-3875, 2012).

Недавние исследования позволяют предполагать, что Т-рег клетки могут

участвовать в репарации ткани, путем, отдельным от их иммуносупрессивной способности. С использованием моделей с возможностью трансплантации опухолей легкого у мышей, обнаружили, что амфирегулин (AREG), член семейства эпидермального фактора роста, подвергался заметной повышающей регуляции во внутриопухолевых Т-рег клетках. Кроме того, рестрицированная по Т-клеткам недостаточность амфирегулина приводила к заметно замедленному прогрессированию опухоли легкого. Это наблюдаемое различие в прогрессировании опухоли не являлось ассоциированным с поддающимися детекции изменениями в способности Т-клеток к иммунному ответу или в количестве Т-рег и эффекторных Т-клеток. Эти наблюдения позволяют предполагать новый «неиммунный» способ действия для внутриопухолевых Т-рег и эффекторных Т-клеток в стимуляции роста опухоли посредством продукции факторов, в норме вовлеченных в репарацию и поддержание ткани (см., например, Green J.A. et al., *J Exp Med* Oct 16 2017, doi:10.1084/jem.20170356. Epub ahead of print).

Клетки PBMC от одного донора, смешанные с дополнительными облученными антигенпредставляющими клетками (APC) и антителами против CD3 (UCHL1), инкубировали в присутствии различных концентраций ингибирующего GPR174 соединения 10 (1,25-5 мкМ) или эквивалентных концентраций носителя (DMSO). Клетки анализировали посредством проточной цитометрии по экспрессии CD4, CD8, PD-L1, TIGIT и AREG.

ФИГУРА 41 графически иллюстрирует долю CD4+ Т-клеток человека с положительным по PD-L1 окрашиванием в культурах PBMC, обработанных ингибирующим GPR174 соединением 10 (0, 1,25 или 5 мкМ), через одни сутки после стимуляции, показывающую, что экспрессия PD-L1 уменьшена в CD4+ Т-клетках, обработанных соединением 10, зависимым от дозы образом, по сравнению с обработанными контрольным носителем клетками.

ФИГУРА 42 графически иллюстрирует долю CD8+ Т-клеток человека с положительным по TIGIT окрашиванием в культурах PBMC, обработанных ингибирующим GPR174 соединением 10 (0, 1,25 или 5 мкМ), через одни сутки после стимуляции, показывающую, что экспрессия TIGIT уменьшена в CD8+ Т-клетках, обработанных соединением 10, зависимым от дозы образом, по сравнению с обработанными контрольным носителем клетками.

ФИГУРА 43 графически иллюстрирует долю CD4+ Т-клеток человека с положительным по AREG окрашиванием в культурах PBMC, обработанных ингибирующим GPR174 соединением 10 (0, 1,25 или 5 мкМ), через одни сутки после стимуляции, показывающую, что экспрессия AREG уменьшена в CD4+ Т-клетках, обработанных соединением 10, зависимым от дозы образом по сравнению с обработанными контрольным носителем клетками.

Как описано выше в примере 13, показано, что ингибирующее GPR174 соединение 10 предотвращает индукцию иммунной контрольной точки CTLA-4, которая в норме

ограничивает активацию Т-клетки. Как показано в этом примере, ингибирующее GPR174 соединение 10 уменьшало экспрессию двух дополнительных молекул иммунных контрольных точек, PD-L1 и TIGIT. Эти результаты показывают, что ингибирующее GPR174 соединение является способным к понижающей регуляции молекул, ответственных за иммунную толерантность к опухоли, что должно дополнительно увеличивать мобилизацию Т-клетки против злокачественных клеток. Кроме того, продуцируемый Т-клетками стимулирующий опухоль фактор роста амфирегулин (AREG) также подвергается понижающей регуляции после обработки ингибирующим GPR174 соединением, что, как ожидают, также может ограничивать рост опухоли.

ПРИМЕР 15

Этот пример показывает, что комбинация ингибитора GPR174 и ингибитора рецептора аденозина 2а (A2aR) приводит к синергической индукции продукции IFN- γ в РВМС человека.

РВМС человека, полученные от добровольного донора-человека, распределяли при плотности 1×10^6 клеток/лунку в 96-луночном плоскодонном планшете и стимулировали в трех репликах с использованием 1 мкг/мл антитела против CD3 (UCHT1) и 0,1 мкг/мл антитела против CD28 (CD28.2) в присутствии:

- ингибирующего GPR174 соединения 10 (3 мкМ);
- ингибирующего A2aR соединения (ZM241385, 1 мкМ или 10 мкМ);
- комбинации соединения 10 (3 мкМ) плюс 1 мкМ ZM241385;
- комбинации соединения 10 (3 мкМ) плюс 10 мкМ ZM241385; или
- контрольного носителя (DMSO).

Супернатанты из этих клеток собирали через 24 часа после стимуляции, и уровни IFN- γ определяли посредством анализа ELISA. Статистический анализ проводили с использованием однофакторного ANOVA с апостериорной коррекцией множественного сравнения Тьюки.

ФИГУРА 44 графически иллюстрирует количество IFN- γ в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции в культурах РВМС от одного донора, культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (3 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (ZM241385, 1 мкМ или 10 мкМ); комбинации соединения 10 (3 мкМ) плюс 1 мкМ ZM241385; комбинации соединения 10 (3 мкМ) плюс 10 мкМ ZM241385; или контрольного носителя (DMSO).

Как показано на ФИГУРЕ 44, увеличение в 2,3 раз наблюдали для GPR174i (3 мкМ соединение 10); увеличение в 1,2 раз наблюдали для A2Ai (ZM241385, 1 мкМ, и 10 мкМ); увеличение в 9,3 раз наблюдали для комбинации GPR174i (3 мкМ соединение 10) плюс A2Ai (ZM241385, 1 мкМ); и увеличение в 17,1 раз наблюдали для комбинации GPR174i (3 мкМ соединение 10) плюс A2Ai (ZM241385, 10 мкМ). Как показано в таблице 8 ниже, статистический анализ (однофакторного ANOVA с апостериорной коррекцией множественного сравнения Тьюки) показывает, что только комбинация ингибиторов

приводила к значимому увеличению продукции IFN- γ , по сравнению с каждым ингибитором отдельно или контрольным носителем.

Таблица 8: Статистический анализ результатов, показанных на ФИГУРЕ 44

Критерий множественного сравнения Тьюки	Обобщение значимости	Корректированное значение p
Носитель против GPR174i	ns	0,7772
Носитель против A2Ai (1 мкМ)	ns	0,9999
Носитель против A2Ai (10 мкМ)	ns	>0,9999
Носитель против GPR174i+A2Ai (1 мкМ)	****	<0,0001
Носитель против GPR174i+A2Ai (10 мкМ)	****	<0,0001
GPR174i против A2Ai (1 мкМ)	ns	0,8851
GPR174i против A2Ai (10 мкМ)	ns	0,8745
GPR174i против GPR174i +A2Ai (1 мкМ)	***	0,0002
GPR174i против GPR174i+A2Ai (10 мкМ)	****	<0,0001
A2Ai (1 мкМ) против A2Ai (10 мкМ)	ns	>0,9999
A2Ai (1 мкМ) против GPR174i+A2Ai (1 мкМ)	****	<0,0001
A2Ai (1 мкМ) против GPR174i+A2Ai (10 мкМ)	****	<0,0001
A2Ai (10 мкМ) против GPR174i+A2Ai (1 мкМ)	****	<0,0001
A2Ai (10 мкМ) против GPR174i+A2Ai (10 мкМ)	****	<0,0001
GPR174i+A2Ai (1 мкМ) против GPR174i+A2Ai (10 мкМ)	****	<0,0001

«ns»=не значимо

Результаты, показанные на ФИГУРЕ 44 и в таблице 8, показывают, что комбинированное ингибирование GPR174 и A2aR стимулирует синергическую индукцию продукции IFN- γ . Поскольку IFN- γ является центральным медиатором противоопухолевых иммунных ответов, этот результат показывает, что комбинированное ингибирование GPR174 и ингибирование A2aR значимо усиливает тип функции иммунита - известного как Т-клетка-помощник 1, или Th1, что является важным для эффективной иммунотерапии злокачественных опухолей. Важно, что оба GPR174 и A2aR активируют путь передачи сигналов G α S/циклического AMP, который хорошо охарактеризован как супрессивная контрольная точка для иммунных ответов Th1. Кроме того, антагонисты A2aR в настоящее время находятся в клинической разработке в качестве ингибиторов контрольных точек при иммунотерапии злокачественных опухолей, как и ингибиторы CD38, CD39 и CD73, ферментов, превращающих АТФ в лиганд A2aR аденозин (см. таблицу 15 ниже). Клеточный стресс и клеточная смерть в микроокружении опухолей приводят к увеличению концентраций как аденозина, так и лиганда GPR174 лизофосфатидилсерина (lysoPS), метаболита липида клеточной мембраны фосфатидилсерина (PS). Таким образом, иммуниты в и около ткани опухоли можно сдерживать посредством комбинированной

активности аденозина, PS и лизофосфатидилсерина, и эффективное освобождение ответов Th1 от этой супрессии, по-видимому, требует комбинированного ингибирования как GPR174, так и оси CD38/CD39/CD73/A2aR/A2bR. Таким образом, результаты, представленные в этом примере, показывают, что для уменьшения передачи сигналов циклического АМР до уровней, позволяющих сильный иммунитет Th1, передачу сигналов как GPR174, так и аденозина, необходимо ингибировать.

ПРИМЕР 16

В этом примере описано открытие, что фосфатидилсерин (PS) является агонистом для опосредованной GPR174 передачи сигналов Gs.

Как описано в настоящем описании, в недавнем сообщении идентифицирован лизофосфатидилсерин (LysoPS) в качестве лиганда для GPR174 (Inoue et al., *Nat Methods* 9:1021-9, 2012). LysoPS представляет собой лизофосфолипидный медиатор, образованный посредством ферментного гидролиза мембранного фосфолипида, фосфатидилсерина (PS). LysoPS секретируется клетками иммунной системы и может индуцировать множественные клеточные ответы, включая супрессию Т-клеток и дегрануляцию тучных клеток (Makide et al., *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 89:135-9, 2009).

Как описано в этом примере, авторы настоящего изобретения определили, что фосфатидилсерин (PS) также является агонистом GPR174. PS представляет собой фосфолипид и является компонентом клеточной мембраны. PS активно удерживается в направлении цитозольной (внутренней) стороны клеточной мембраны посредством фермента флиппазы. Однако, когда клетка подвергается апоптозу, PS больше не ограничен цитозольной стороной посредством флиппазы. Вместо этого, скрамблаза катализирует быстрый обмен PS между двумя сторонами клеточной мембраны. Когда PS переворачивается к внеклеточной (внешней) поверхности клетки, он действует в качестве сигнала для макрофагов к поглощению этих клеток (Verhoven B. et al., *J of Exp Med.* 182(5):1597-601, 1995).

Несколько трансмембранных рецепторов - по большей части экспрессированные фагоцитами, такими как моноциты, макрофаги и дендритные клетки - связывают PS или комплексы PS/белок и опосредуют эффероцитоз. Они включают семейство TAM рецепторных тирозинкиназ (Tyro3, Axl, MerTK), которые узнают PS в комплексе с сывороточными белками GAS6 или PROS1; белки TIM (молекулу, содержащую домен Т-клеточного иммуноглобулина и муцина), CD300, и VAI1, которые непосредственно взаимодействуют с PS; и MFG-E8, который связывает мостиком PS с интегринами (см. Arandjelovic S and Ravichandran K, *Nature Immunology* 16:907-917, 2015; Lemke G and Burstyn-Cohen T., *Ann NY Acad Sci* 1209:23-29, 2010; Morizono K and Chen I.S.Y., *Journal of Virology*, Vol 88 (8):4275-4290, 2014; и Park, S. and Kin, I., *Experimental & Molecular Medicine* 49 e331, 2017). Сигналы этих рецепторов, передаваемые клеткам, активно узнающим PS и опосредующим эффероцитоз, являются по большей части иммуносупрессивными.

В дополнение к апоптотическим клеткам, внеклеточный PS является высоко

обогащенным в микроокружении опухолей и обнаружен на поверхности клеток опухолей так же как эндотелиальных клетках кровеносных сосудов, проникающих в солидные опухоли. Кроме того, апоптотические нейтрофилы и активированные тромбоциты, где и те, и другие экспонируют, также привлекаются в солидные опухоли (см. A.K and Rao D.A., *Blood* 120:4667-4668, 2012; Schlesinger, M., *Journal of Hematology and Oncology* (11) 125, 2018; Treffers L.W. et al., *Immunological Reviews* vol 273: 312-328, 2016; и Gregory A. D. and Houghton A. M., *Cancer Research* Vol 71 (7): 2411-6, 2011). PS также обнаружен в внеклеточных везикулах (EV), происходящих из опухолей и апоптотических клеток, включая микровезикулы, экзосомы и экзомы (см., например, Zhang et al., *Cell Reports* 27:940-954, 2019 и Raposo G and Stoorgvogel W., *Jour Cell Biol* 200(4):373, 2013). Поразительно, что белки, связывающие PS являются высоко концентрированными в солидных опухолях в моделях на мышах, как детектировано посредством визуализации всего тела животного (Li R. et al., *Mol Cancer Ther* 17(1): 169-82, 2018; Desai T.J. et al., *Oncotarget* 7:30678-30690, 2016; и Birge R. B. et al., *Cell Death & Differentiation* 23: 962-978, 2016). Таким образом, высокие концентрации PS считаются основным источником опосредованной опухолью иммуносупрессии и могут играть роль в устойчивости к иммунотерапевтическим средствам против злокачественных опухолей, таким как ингибиторы контрольных точек.

Поскольку lysoPS и PS являются очень сходными по структуре, но отличаются в отношении растворимости в воде, авторы настоящего изобретения рассматривали в этом примере, могут ли липосомы, образованные из PS, агонизировать GPR174 до той же степени, что и lysoPS. Способность экспонирующих PS мембран агонизировать GPR174 может показывать, что ферменты, необходимые для гидролиза PS до lysoPS, могут не является необходимыми, чтобы присутствующий на высоком уровне PS в опухолях действовал на экспрессирующие GPR174 клетки.

Сравнение PS и LysoPS при передаче сигналов Gs в клетках HEK293, трансфицированных GPR174 дикого типа или мутантным GPR174

Однослойные липосомы из фосфатидилсерина (PS) и других фосфолипидов получали посредством гидратирования в PBS и экструзии при 50-54°C через фильтр 0,1 микрона с использованием миниэкструдера (Avanti). Лизофосфатидилсерин (Lyso-PS) является растворимым.

Клетки HEK293 выращивали в 6-луночных планшетах и трансфицировали с использованием липофектамина 2000 (Thermo Fisher Scientific), с использованием 300 нг/лунку экспрессирующей биосенсор сAMP плазмиды pGlo22F (Promega) и 2 нг плазмиды, экспрессирующей GPR174 дикого типа, или 2 нг плазмиды, экспрессирующей мутант GPR174 с более низкой исходной активностью, обозначенной как «GPR174-v38».

Через 5-6 часов после трансфекции, клетки обрабатывали трипсином и рассеивали при плотности 5000 клеток/лунку в 96-луночные планшеты и инкубировали в течение ночи. На следующие сутки, культуральную среду заменяли с использованием 100 мкл/лунку

бессывороточной среды X-vivo15 (Lonza) with 2% анализ GloSensor реагент (Promega). Планшеты инкубировали в течение 1 час при комнатной температуре и измеряли в люминометре для получения значения до добавления соединения. Липосомы из фосфатидилсерина (PS) в диапазоне концентраций от 10 нМ до 10000 нМ или лизофосфатидилсерина (Lyso-PS) в диапазоне концентраций от 10 нМ до 10000 нМ добавляли в лунки и инкубировали в течение 15 минут при комнатной температуре. Планшеты измеряли в люминометре для получения значения после добавления соединения. Определяли соотношение измерений после добавления соединения и до добавления соединения (т.е., степени индукции сигнала Glosensor посредством агониста).

ФИГУРА 45А графически иллюстрирует кратность индукции активности передачи сигналов Gs в клетках НЕК293, трансфицированных экспрессирующей GPR174 дикого типа плазмидой и экспрессирующей биосенсор cAMP плазмидой pGlo22F, в присутствии увеличивающихся концентраций липосом из фосфатидилсерина (PS) или лизофосфатидилсерина (Lyso-PS). Как показано на ФИГУРЕ 45А, как PS, так и Lyso-PS стимулируют передачу через GPR174 сигналов Gs зависимым от концентрации образом (PS с $EC_{50}=83$ нМ). Следует отметить, что кажущаяся активность PS в 4-5 раз выше, чем кажущаяся активность Lyso-PS (т.е., такой же сигнал достигают при более низкой концентрации PS), что делает маловероятным, что индуцированный липосомой сигнал можно объяснить распадом PS до Lyso-PS в ходе эксперимента по передаче сигналов. Кроме того, в этом отношении, отмечено, что прямое измерение посредством LC-MS количеств PS и Lyso-PS в используемых авторами настоящего изобретения препаратах показало присутствие только небольших количеств Lyso-PS (3%) в используемом авторами настоящего изобретения препарате PS, которое не увеличивалось после инкубации PS с клетками и средой в эксперименте передачи сигналов (данные не представлены).

ФИГУРА 45В графически иллюстрирует, с использованием увеличенного окна сигнала, по сравнению с ФИГУРОЙ 45А, кратность индукции активности передачи сигналов Gs в клетках НЕК293, трансфицированных экспрессирующей мутант GPR174-v38 плазмидой и экспрессирующей биосенсор cAMP плазмидой pGlo22F в присутствии увеличивающихся концентраций липосом из фосфатидилсерина (PS) или лизофосфатидилсерина (Lyso-PS). Как показано на ФИГУРЕ 45В, как PS, так и Lyso-PS стимулируют передачу через GPR174 сигналов Gs зависимым от концентрации образом. Окно передачи сигналов для GPR174-v38 превосходит окно для рецептора GPR174 дикого типа (GPR174-WT), но зависимость ответа от дозы липидов несколько сдвинута вправо, показывая более низкую аффинность как для PS, так и для Lyso-PS. Для этого мутантного варианта GPR174, подобно результатам, наблюдаемым для GPR174-WT, PS-липосомы служат более активным агонистом, чем Lyso-PS.

Анализ дополнительных фосфолипидов по способности функционировать в качестве агонистов GPR174

Дополнительные фосфолипиды: фосфатидилхолин (PC), фосфатидилэтаноламин

(PE), фосфатидилинозитол (PI) и фосфатидилсерин (PS): получали в форме однослойных липосом посредством гидратирования в PBS и экструзии при 50-54°C через фильтр 0,1 микрон с использованием миниэкструдера (Avanti) и анализировали по сравнению с PS по способности функционировать в качестве агонистов GPR174. Все липиды использовали при конечной концентрации 4 мкМ. Эксперимент по передаче сигналов проводили, как описано выше для ФИГУРЫ 45, но вместо временной трансфекции, использовали пул клеток НЕК293, стабильно трансфицированных с использованием GPR174 WT и биосенсора cAMP GloSensor.

ФИГУРА 46 графически иллюстрирует уровень активности передачи через GPR174 сигналов Gs в клетках НЕК293, трансфицированных экспрессирующей GPR174 плазмидой и экспрессирующей биосенсор cAMP плазмидой рGlo22F (показанный как соотношение люминесценции после добавления фосфолипида к предварительно считанному значению люминесценции) в присутствии липосом из фосфатидилсерина (PS), фосфатидилхолина (PC), фосфатидилэтаноламина (PE) и фосфатидилинозитола (PI).

Как показано на ФИГУРЕ 46, передача через GPR174 сигналов Gs была стимулирована в присутствии PS, в то время как липосомы из фосфатидилхолина (PC), фосфатидилэтаноламина (PE) и фосфатидилинозитола (PI) являлись полностью неактивными. Таким образом, показано, что передача через GPR174 сигналов Gs является специфической для LysoPS и PS.

Анализ опосредованной PS передачи сигналов GPR174 в присутствии репрезентативных ингибирующих GPR174 соединений

Эксперимент по передаче сигналов проводили, как описано для ФИГУРЫ 45, но вместо временной трансфекции, использовали пул клеток НЕК293, стабильно трансфицированных либо GPR174 WT (для соединения 10, как показано на ФИГУРЕ 47А) или GPR174-v38 для остальных тестируемых соединений, как показано на ФИГУРАХ 47В-47F)) и биосенсором cAMP GloSensor. Получали серийные разведения каждого из ингибирующих GPR174 соединений 10 (группа I), 6 (группа I), 11 (группа I), 20 (группа II), 23 (группа IV) и 30 (группа IV) в DMSO. После того, как планшеты предварительно считывали в люминометре, 1 мкл разведения соединения добавляли на лунку (с контрольными лунками, в которые вводили 1 мкл DMSO), с последующим добавлением PS-липосом до конечной концентрации 1 мкМ. Планшеты считывали в люминометре после 15 минут инкубации. Соотношение люминесценции после добавления PS и предварительно считанного значения люминесценции использовали в качестве показателя опосредованной рецептором передачи сигналов.

ФИГУРА 47А графически иллюстрирует ингибирование индуцированной PS передачи через GPR174 сигналов Gs посредством ингибирующего GPR174 соединения 10 (группа I) зависимым от дозы образом, с кажущейся IC₅₀ приблизительно 20-40 нМ. Эти данные показывают, что соединение 10 является относительно сильным антагонистом опосредованной PS передачи через GPR174 сигналов Gs. При концентрациях 1-2 мкМ, для

соединения 10 достигают почти полное ингибирование передачи сигналов PS посредством рецептора GPR174.

ФИГУРА 47B графически иллюстрирует ингибирование индуцированной PS передачи через GPR174 сигналов Gs посредством ингибирующего GPR174 соединения 6 (группа I) зависимым от дозы образом, с кажущейся IC_{50} приблизительно 0,1 мкМ.

ФИГУРА 47C графически иллюстрирует ингибирование индуцированной PS передачи через GPR174 сигналов Gs посредством ингибирующего GPR174 соединения 11 (группа I) зависимым от дозы образом, с кажущейся IC_{50} приблизительно 0,1 мкМ.

ФИГУРА 47D графически иллюстрирует ингибирование индуцированной PS передачи через GPR174 сигналов Gs посредством ингибирующего GPR174 соединения 20 (группа II) зависимым от дозы образом, с кажущейся IC_{50} приблизительно 3,0 мкМ.

ФИГУРА 47E графически иллюстрирует ингибирование индуцированной PS передачи через GPR174 сигналов Gs посредством ингибирующего GPR174 соединения 30 (группа IV) зависимым от дозы образом, с кажущейся IC_{50} приблизительно 1,3 мкМ.

ФИГУРА 47F графически иллюстрирует ингибирование индуцированной PS передачи через GPR174 сигналов Gs посредством ингибирующего GPR174 соединения 23 (группа IV) зависимым от дозы образом, с кажущейся IC_{50} приблизительно 0,15 мкМ.

Определили также (данные не представлены), что ингибирование индуцированной PS передачи через GPR174 сигналов Gs посредством ингибирующего GPR174 соединения 59 (группа Va) происходило зависимым от дозы образом, с кажущейся IC_{50} приблизительно 10 мкМ.

Как показано на ФИГУРАХ 47A-47F, опосредованную PS передачу через GPR174 сигналов Gs ингибируют посредством репрезентативных ингибирующих GPR174 соединений 6, 10, 11, 20, 23 и 30, принадлежащих к различным химическим классам (т.е., группы I, II и IV). Эти данные показывают, что соединения 6, 10, 11, 20, 23 и 30 действуют в качестве антагонистов GPR174 и ингибируют опосредованную PS-липосомой передачу сигналов cAMP. Таким образом, передача сигналов PS-липосомой через GPR174 ингибируется посредством множества ингибирующих GPR174 низкомолекулярных соединений с разнообразными химическими структурами.

Эти данные показывают, что PS является сильным и специфическим агонистом GPR174, и что соединение 10 является относительно сильным ингибитором GPR174. Способность PS непосредственно стимулировать GPR174 имеет множество последствий для иммунотерапии злокачественных опухолей. PS экспонирован на солидных опухолях, апоптотических клетках, включая клетки опухолей и нейтрофилы, внеклеточных везикулах из клеток опухоли и других клеток (экзосом), живых клетках опухолей, активированных Т-клетках и В-клетках, активированных тромбоцитах, моноцитах и макрофагах, и эндотелии сосудов. Поскольку считают, что PS, как правило, действует на иммунциты миелоидной линии посредством рецепторов эфферозитоза (описанный выше), GPR174 преимущественно экспрессируется на лимфоцитах, включая Т-клетки, В клетки и НК-

клетки, обеспечивая возможность того, что PS может напрямую модулировать адаптивные иммунные ответы. GPR174 передает сигналы посредством пути Gs-cAMP, который супрессирует функцию клеток Th1 и NK (Zidek K., *Eur Cytokine Netw* 10(3):319-28, 1999; и Serezani C. H. et al., *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* Vol 39(2): 127-132, 2008); таким образом, ингибирование GPR174 должно усиливать противоопухолевые ответы Т-клеток и НК-клеток.

Авторы настоящего изобретения также показали в этом примере, что с использованием 1-2 мкМ соединения 10 достигают почти полного ингибирования передачи сигналов PS посредством GPR174, таким образом эти концентрации ингибитора являются подходящими для функциональных исследований, для исследования модуляции Т-клеточных ответов посредством GPR174 и PS.

ПРИМЕР 17

Передача сигналов GPR174 в клетках НЕК293 после воздействия апоптотических клеток К562

В этом примере описаны экспериментальные результаты, показывающие, что апоптотические клетки стимулируют путь GPR174 передачи сигналов Gs в клетках, экспрессирующих GPR174.

Как описано в примере 16, авторы настоящего изобретения открыли, что PS является природным агонистом пути GPR174 передачи сигналов Gs. Как предусмотрено в примере 16, PS может являться экспонированным на множестве типов клеток в микроокружении опухолей; однако, в примере 16 авторы настоящего изобретения использовали только содержащие PS липосомы для стимуляции GPR174. В этом примере, авторы настоящего изобретения исследовали, может ли PS, экспонированный на клетках, также агонизировать GPR174 в проведенном авторами настоящего изобретения анализе передачи сигналов. Для этого, авторы настоящего изобретения использовали 1) линию клеток, подвергнутую апоптозу, 2) апоптотические первичные нейтрофилы и 3) активированные тромбоциты.

Апоптоз индуцировали в клетках К562 посредством обработки в течение ночи с использованием 0,8 мМ H₂O₂. Присутствие высокого процента апоптотических клеток после обработки H₂O₂ подтверждали посредством проточной цитометрии после окрашивания аннексина V (данные не представлены).

Клетки НЕК293, стабильно трансфицированные экспрессирующими GPR174 дикого типа и GloSensor плазмидами, рассеивали в 96-луночные планшеты при плотности 5000 клеток/лунку и анализировали с использованием 50 мкл/лунку 10 × 10⁶/мл суспензии необработанных клеток К562, или клеток К562, обработанных в течение ночи с использованием 0,8 мМ H₂O₂ или среды для клеток. Изменение люминесценции измеряли через 15 минут. Клетки НЕК293, стабильно трансфицированные только экспрессирующей GloSensor плазмидой, не отвечали на апоптотические клетки (данные не представлены).

ФИГУРА 48А графически иллюстрирует соотношение люминесценции после добавления к предварительно считанной люминесценции для экспрессирующих GPR174 и

GloSensor клеток НЕК293, подвергнутых воздействию культуральной среды, или неборотанных (неапоптотических) клеток К562, или апоптотических клеток К562 (обработанных с использованием H_2O_2 в течение 20 часов). Как показано на ФИГУРЕ 48А, передача сигналов GPR174 в клетках НЕК293, подвергнутых воздействию апоптотических клеток К562, являлась значимо более высокой, чем в клетках НЕК293, подвергнутых воздействию необработанных клеток К562 ($p < 10^{-4}$) или клетки НЕК293, подвергнутых воздействию только среды.

Передача сигналов GPR174 в клетках НЕК293 после воздействия апоптотических нейтрофилов

Апоптоз индуцировали в нейтрофилах крови донора посредством инкубации в течение ночи с агонистическими антителами против Fas (Fisher Scientific). Высокий процент апоптотических клеток после обработки антителами против Fas подтверждали посредством проточной цитометрии после окрашивания аннексина V (данные не представлены).

Клетки НЕК293, стабильно трансфицированные экспрессирующими GPR174 дикого типа и GloSensor плазмидами, рассеивали в 96-луночные планшеты при плотности 5000 клеток/луночку и анализировали с использованием 50 мкл/луночку 10×10^6 клеток/мл суспензии свежеевыделенных от донора нейтрофилов, или нейтрофилов, инкубированных в течение ночи с антителами против Fas или средой для клеток.

ФИГУРА 48В графически иллюстрирует соотношение люминесценции после добавления к предварительно считанной люминесценции для экспрессирующих GPR174 и GloSensor клеток НЕК293, подвергнутых воздействию культуральной среды или свежеевыделенных нейтрофилов, или апоптотических нейтрофилов (обработанных с использованием антитела против Fas). Как показано на ФИГУРЕ 48В, передача сигналов GPR174 в клетках НЕК293, подвергнутых воздействию апоптотических нейтрофилов, была значимо выше, чем в клетках НЕК293, подвергнутых воздействию свежеевыделенных нейтрофилов ($p = 0,0006$) или клетках НЕК293, подвергнутых воздействию только среды.

Передача сигналов GPR174 в клетках НЕК293 после воздействия активированных тромбоцитов

Тромбоциты крови доноров выделяли посредством дифференциального центрифугирования. Высокий процент тромбоцитов, выделенных этим способом, являлся активированным, как подтверждено проточной цитометрией после окрашивания аннексина V (данные не представлены).

Клетки НЕК293, стабильно трансфицированные экспрессирующими GPR174 дикого типа и GloSensor плазмидами, рассеивали в 96-луночные планшеты при плотности 5000 клеток/луночку и анализировали с использованием 50 мкл/луночку 5×10^8 клеток/мл тромбоцитов (обозначено как «Pl» на ФИГУРЕ 48С) или супернатантов тромбоцитов (обозначено как «суп.» на ФИГУРЕ 48С).

ФИГУРА 48С графически иллюстрирует соотношение люминесценции после

добавления к предварительно считанной люминесценции для экспрессирующих GPR174 и GloSensor клеток НЕК293, подвергнутых воздействию культурального супернатанта (суп.) или тромбоцитов (PI). Как показано на ФИГУРЕ 48С, передача сигналов GPR174 в клетках НЕК293, подвергнутых воздействию активированных тромбоцитов, была значимо выше, чем в клетках НЕК293, подвергнутых воздействию культуральных супернатантов ($p=0,03$) или клеток НЕК293.

В соответствии со способностью PS-липосом действовать в качестве сильного агониста GPR174, данные в этом примере показывают, что PS, подвергнутый воздействию на поверхности клетки - либо в результате апоптоза, как в случае клеток K562 и нейтрофилов, либо в результате активации тромбоцитов - служит в качестве агониста GPR174. Эти эффекты наблюдали при высокой концентрации клеток, что позволяет предполагать, что межклеточный контакт являлся важным для этого типа передачи сигнала. Открытие, что PS является активным естественным лигандом для GPR174, и что PS стимулирует иммуносупрессивный GPCR, а именно GPR174, на Т-лимфоцитах, представляет значительное продвижение в понимании авторами настоящего изобретения того, каким образом PS может влиять на иммунитет к опухоли. Поскольку GPR174 представляет собой сопряженный с Gs рецептор, и известно, что cAMP представляет собой иммуносупрессивное сигнал, авторы настоящего изобретения считают, что способность экспрессированного на лимфоцитах GPR174 отвечать на воздействие индуцированного апоптозом PS поверхности клеток вносит вклад в способность апоптотических клеток супрессировать адаптивную иммунную систему. Является вероятным, что некоторые типы опухолей и вирусных инфекций используют это регуляторное свойство, чтобы ускользать от иммунологического надзора посредством предоставления окружения богатой PS поверхности. Таким образом, считают, что ингибирующие GPR174 соединения имеют терапевтическую полезность для ингибирования опосредованной PS- и Lyso-PS передачи сигналов GPR174 и посредством, исключения иммуносупрессии, которая, как правило, индуцируется в присутствии апоптотических клеток и/или опухолей.

ПРИМЕР 18

В этом примере описаны экспериментальные результаты, дополнительно показывающие, что ингибирующее GPR174 соединение в комбинации с различными ингибиторами рецептора аденозина 2а (A2aR) синергически индуцируют Th1-цитокины в PBMC человека.

Как описано в примере 15, определили, что комбинация репрезентативного ингибитора GPR174 (соединение 10) и ингибитора рецептора аденозина 2а (A2aR) ZM-241385 приводила к синергической индукции продукции IFN- γ в PBMC человека.

Для расширения первоначальных обнаружений авторов настоящего изобретения, проводили дополнительные эксперименты для подтверждения того, что синергическая индукция цитокина поддается наблюдению с использованием репрезентативного ингибитора GPR174 (соединения 10), в комбинации с различными ингибиторами A2aR.

Ингибитор A2aR SCH-58261 («SCH»)

PBMC человека, полученные от добровольного донора-человека (донора 1), распределяли в средах X-vivo15 (Lonza), дополненных Glutamax, пенициллином и стрептомицином, при плотности 1×10^6 клеток/лунку в 96-луночном плоскодонном планшете и стимулировали с использованием 1 мкг/мл антитела против CD3 (UCHT1) и 0,1 мкг/мл антитела против CD28 (CD28.2) в присутствии:

ингибирующего GPR174 соединения 10 (2 мкМ);

ингибирующего A2aR соединения (SCH-58261, 0,2 мкМ, 0,6 мкМ или 2 мкМ);

ингибирующего GPR174 соединения 10 (2 мкМ) плюс ингибирующего A2aR соединения (SCH-58261, 0,2 мкМ, 0,6 мкМ или 2 мкМ); или

контрольного носителя (DMSO).

Супернатанты из этих клеток собирали через 24 часа после стимуляции, и уровни IFN- γ , IL-2 и TNF определяли посредством анализов ELISA.

ФИГУРА 49А графически иллюстрирует количество IFN- γ (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции в культурах PBMC от одного донора (донора 1), культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (2 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (SCH-58261, 0,2 мкМ, 0,6 мкМ или 2 мкМ); комбинации соединения 10 (2 мкМ) плюс 0,2 мкМ SCH-58261; комбинации соединения 10 (2 мкМ) плюс 0,6 мкМ SCH-58261 или комбинации соединения 10 (2 мкМ) плюс 2 мкМ SCH-58261; или контрольного носителя (DMSO).

Как показано на ФИГУРЕ 49А, и обобщено в таблице 9, более низкие концентрации ингибитора A2aR (0,2 мкМ и 0,6 мкМ SCH-58261) увеличивали уровни IFN- γ менее, чем в 2 раза, и ингибирующее GPR174 соединение 10 (2 мкМ) увеличивало уровни IFN- γ в 4,9 раз. В отличие от этого, комбинация ингибиторов увеличивала уровни IFN- γ в 11-12 раз, показывая синергическую активность между A2aRi и GPR174i, поскольку эти значения превышали сумму увеличений, полученных для каждого ингибитора отдельно.

ФИГУРА 49В графически иллюстрирует количество IL-2 (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции в культурах PBMC от одного донора (донора 1), культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (2 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (SCH-58261, 0,2 мкМ, 0,6 мкМ или 2 мкМ); комбинации соединения 10 (2 мкМ) плюс 0,2 мкМ SCH-58261; комбинации соединения 10 (2 мкМ) плюс 0,6 мкМ SCH-58261 или комбинации соединения 10 (2 мкМ) плюс 2 мкМ SCH-58261; или контрольного носителя (DMSO).

Как показано на ФИГУРЕ 49В, и обобщено в таблице 9, все концентрации ингибитора A2aR (0,2 мкМ, 0,6 мкМ и 2 мкМ SCH-58261), так же как ингибитора GPR174 (2 мкМ соединения 10), не оказывали эффект на накопление IL-2. В отличие от этого, комбинация ингибиторов значимо увеличивала уровни IL-2 в 1,4-1,5 раз, показывая синергическую активность между A2aRi и GPR174i, поскольку эти значения превышали сумму увеличений, полученных для каждого ингибитора отдельно.

ФИГУРА 49С графически иллюстрирует количество TNF (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции в культурах PBMC от одного донора (донора 1), культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (2 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (SCH-58261, 0,2 мкМ, 0,6 мкМ или 2 мкМ); комбинации соединения 10 (2 мкМ) плюс 0,2 мкМ SCH-58261; комбинации соединения 10 (2 мкМ) плюс 0,6 мкМ SCH-58261 или комбинации соединения 10 (2 мкМ) плюс 2 мкМ SCH-58261; или контрольного носителя (DMSO).

Как показано на ФИГУРЕ 49С и обобщено в таблице 9, более низкие концентрации ингибитора A2aR (0,2 мкМ и 0,6 мкМ SCH-58261) увеличивали уровни TNF менее чем в 3 раза, и ингибитор GPR174 (2 мкМ соединения 10) увеличивал уровни TNF в 4,2 раз. В отличие от этого, комбинация A2aRi и GPR174i увеличивала уровни TNF в 14-16 раз, показывая синергическую активность между двумя ингибиторами, поскольку эти значения превышали сумму увеличений, полученных для каждого ингибитора отдельно.

Таблица 9: Обобщение результатов из ФИГУР 49А-С

		Носитель ¹	0,2 мкМ SCH ¹	0,6 мкМ SCH ¹	2 мкМ SCH ¹
IFN- γ	Носитель	1,0	1,8	1,9*	5,9*
	2 мкМ соед. 10	4,9*	11,8*	11,3*	11,0*
IL-2	Носитель	1,0	1,0	0,9	0,8
	2 мкМ соед. 10	0,9	1,5*	1,4*	1,4*
TNF	Носитель	1,0	2,2*	2,8*	4,1*
	2 мкМ соед. 10	4,2*	14,2*	15,9*	14,7*

¹Значения кратности изменения для ингибирующего GPR174 соединения 10 и ингибирующего A2aR соединения SCH-58261 при указанных концентрациях, по сравнению с контрольным носителем.

*, $p < 0,05$, t-критерий, двустороннее распределение, двухвыборочный t-тест с одинаковыми дисперсиями.

ингибитор A2aR ZM-241385 («ZM») и ингибитор A2aR PBF-509 («PBF»)

PBMC человека, полученные от двух индивидуальных добровольных доноров-людей (донора 2 и донора 3), распределяли при плотности 1×10^6 клеток/лунку в 96-луночном плоскодонном планшете и стимулировали с использованием 1 мкг/мл антитела против CD3 (UCHL1) и 0,1 мкг/мл антитела против CD28 (CD28.2) в присутствии:

ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ);

ингибирующего A2aR соединения (ZM-241385, 0,2 мкМ);

ингибирующего A2aR соединения (PBF-509, 0,1 мкМ или 0,2 мкМ)

ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ) плюс ингибирующего A2aR соединения (ZM-241385, 0,2 мкМ); или

ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ) плюс ингибирующего A2aR соединения (PBF-509, 0,1 мкМ или 0,2 мкМ); или

контрольного носителя (DMSO).

Супернатанты из этих клеток собирали через 24 часа после стимуляции, и уровни IFN- γ , IL-2 и TNF определяли посредством анализов ELISA.

ФИГУРА 50А графически иллюстрирует количество IFN- γ (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции в культурах PBMC от одного донора (донора 2), культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (ZM, 0,2 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (PBF-509 0,1 мкМ), комбинации соединения 10 (1 мкМ) плюс 0,2 мкМ ZM; комбинации соединения 10 (1 мкМ) плюс 0,1 мкМ PBF-509; или контрольного носителя (DMSO).

Как показано на ФИГУРЕ 50А, и обобщено в таблице 10, высокую степень индукции IFN- γ наблюдали с использованием ZM или PBF-509 в присутствии соединения 10 (в 8,8 и 3,5 раз, соответственно). В отличие от этого, ZM или PBF-509 отдельно приводили к индукции IFN- γ в 1,8 раз и 1,4 раз, соответственно. Соединение 10 отдельно индуцировало IFN- γ в 1,6 раз. Таким образом, значения, полученные с использованием комбинации ингибирующего A2aR соединения (например, ZM или PBF-509) и ингибирующего GPR174 соединения (например, соединения 10), показывали синергическую активность, поскольку они превышали сумму увеличений, полученных для каждого ингибитора отдельно.

ФИГУРА 50В графически иллюстрирует количество IL-2 (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции в культурах PBMC от одного донора (донора 2), культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (ZM, 0,2 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (PBF-509 0,1 мкМ), комбинации соединения 10 (1 мкМ) плюс 0,2 мкМ ZM; комбинации соединения 10 (1 мкМ) плюс 0,1 мкМ PBF-509; или контрольного носителя (DMSO).

Как показано на ФИГУРЕ 50В и обобщено в таблице 10, высокую степень индукции IL-2 наблюдали с использованием ZM или PBF-509 в присутствии соединения 10 (в 2,6 и 2,0 раза, соответственно). В отличие от этого, ZM или PBF-509 отдельно приводили к индукции IL-2 в 1,6 и 1,3 раз, соответственно. Соединение 10 отдельно индуцировало IL-2 в 1,1 раз. Таким образом, значения, полученные с использованием комбинации ингибирующего A2aR соединения (например, ZM или PBF-509) и ингибирующего GPR174 соединения (например, соединения 10), показывали синергическую активность, поскольку они превышали сумму увеличений, полученных для каждого ингибитора отдельно.

ФИГУРА 50С графически иллюстрирует количество TNF (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции в культурах PBMC от одного донора (донора 2), культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (ZM, 0,2 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (PBF-509 0,1 мкМ), комбинации соединения 10 (1 мкМ) плюс 0,2 мкМ ZM; комбинации соединения 10 (1 мкМ) плюс 0,1 мкМ PBF-509; или контрольного носителя (DMSO).

Как показано на ФИГУРЕ 50С и обобщено в таблице 10, высокую степень индукции TNF наблюдали с использованием ZM или PBF-509 в присутствии соединения 10 (в 4,0 и

2,3 раз, соответственно). В отличие от этого, ZM или PBF-509 отдельно приводили к индукции TNF в 1,7 и 1,3 раз, соответственно. Соединение 10 отдельно индуцировало TNF в 1,5 раз. Таким образом, значения, полученные с использованием комбинации ингибирующего A2aR соединения (например, ZM или PBF-509) и ингибирующего GPR174 соединения (например, соединения 10) показывали синергическую активность, поскольку они превышали сумму увеличений, полученных для каждого ингибитора отдельно.

ФИГУРА 51А графически иллюстрирует количество IFN- γ (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции в культурах PBMC от одного донора (донора 3), культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (ZM, 0,2 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (PBF-509 0,2 мкМ), комбинации соединения 10 (1 мкМ) плюс 0,2 мкМ ZM; комбинации соединения 10 (1 мкМ) плюс 0,2 мкМ PBF-509; или контрольного носителя (DMSO).

Как показано на ФИГУРЕ 51А и обобщено в таблице 10, значимую индукцию IFN- γ наблюдали с использованием ZM или PBF-509 в присутствии соединения 10 (в 2,5 и 1,8 раз, соответственно). В отличие от этого, ZM или PBF-509 отдельно приводили к индукции IFN- γ в 1,3 и 1,2 раз, соответственно. Соединение 10 отдельно индуцировало IFN- γ в 1,2 раз. Таким образом, значения, полученные с использованием комбинации ингибирующего A2aR соединения (например, ZM или PBF-509) и ингибирующего GPR174 соединения (например, соединения 10) показывали синергическую активность, поскольку они превышали сумму увеличений, полученных для каждого ингибитора отдельно.

ФИГУРА 51В графически иллюстрирует количество of IL-2 (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции в культурах PBMC от одного донора (донора 3), культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (ZM, 0,2 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (PBF-509 0,2 мкМ), комбинации соединения 10 (1 мкМ) плюс 0,2 мкМ ZM; комбинации соединения 10 (1 мкМ) плюс 0,2 мкМ PBF-509; или контрольного носителя (DMSO).

Как показано на ФИГУРЕ 51В и обобщено в таблице 10, высокую степень индукции IL-2 наблюдали с использованием ZM или PBF-509 в присутствии соединения 10 (в 2,3 и 1,6 раз, соответственно). В отличие от этого, ZM или PBF-509 отдельно приводили к индукции IL-2 в 1,3 и 1,2 раз, соответственно. Соединение 10 отдельно индуцировало IL-2 в 1,1 раз. Таким образом, значения, полученные с использованием комбинации ингибирующего A2aR соединения (например, ZM или PBF) и ингибирующего GPR174 соединения (например, соединения 10), показывали синергическую активность, поскольку они превышали сумму увеличений, полученных для каждого ингибитора отдельно.

ФИГУРА 51С графически иллюстрирует количество TNF (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции в культурах PBMC от одного донора (донора 3), культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (ZM, 0,2 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (PBF-509 0,2 мкМ), комбинации соединения 10 (1 мкМ) плюс 0,2 мкМ ZM; комбинации

соединения 10 (1 мкМ) плюс 0,2 мкМ PBF-509; или контрольного носителя (DMSO).

Как показано на ФИГУРЕ 51С и обобщено в таблице 10, высокую степень индукции TNF наблюдали с использованием ZM или PBF-509 в присутствии соединения 10 (в 4,6 и 2,9 раз, соответственно). В отличие от этого, ZM или PBF-509 отдельно приводили к индукции TNF в 2,1 и 1,8 раз, соответственно. Соединение 10 отдельно индуцировало TNF в 1,5 раз. Таким образом, значения, полученные с использованием комбинации ингибирующего A2aR соединения (например, ZM или PBF-509) и ингибирующего GPR174 соединения (например, соединения 10) показывали синергическую активность, поскольку они превышали сумму увеличений, полученных для каждого ингибитора отдельно.

Таблица 10: Обобщение результатов, показанных на ФИГУРАХ 50А-С и 51А-С

Донор	Цитокин		Носитель ¹	ZM ¹	PBF ¹
2	IFN- γ	носитель	1,0	1,8*	1,4*
2	IFN- γ	Соед. 10	1,6*	8,8*	3,5*
2	IL-2	носитель	1,0	1,6*	1,3*
2	IL-2	Соед. 10	1,1	2,6*	2,0*
2	TNF	носитель	1,0	1,7*	1,3*
2	TNF	Соед. 10	1,5*	4,0*	2,3*
3	IFN- γ	носитель	1,0	1,2	0,9
3	IFN- γ	Соед. 10	1,2	2,5*	1,8*
3	IL-2	носитель	1,0	1,3*	1,2
3	IL-2	Соед. 10	1,1	2,3*	1,6*
3	TNF	носитель	1,0	2,1*	1,8*
3	TNF	Соед. 10	1,5*	4,6*	2,9*

¹Значения кратности изменения для ингибирующего GPR174 соединения 10 и ингибирующих A2aR соединений ZM-241385 и PBF-509, по сравнению с контрольным носителем.

*, $p < 0,05$, t-критерий, двустороннее распределение, двухвыборочный t-тест с одинаковыми дисперсиями.

Как описано в примере 15, определили, что комбинация репрезентативного ингибитора GPR174 (соединения 10) и ингибитора рецептора аденозина 2а (A2aR) ZM-241385 приводила к синергической индукции продукции IFN- γ в PBMC человека. С использованием такой же системы стимуляции PBMC, как описано в примере 15, как показано в этом примере, авторы настоящего изобретения в настоящее время наблюдали синергическую индукцию IFN- γ с использованием трех ингибиторов A2aR: ZM-241385, SCH-58261 и PBF-509 в комбинации с ингибирующим GPR174 соединением 10, как показано на ФИГУРАХ 49А, 50А и 51А. Во всех случаях, для ингибиторов A2aR показана более сильная индукция IFN- γ в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10, и сходным образом, соединение 10 являлось наиболее эффективным при комбинации с ингибитором A2aR. Как дополнительно показано на ФИГУРАХ 49В, 50В и 51В, авторы настоящего изобретения также наблюдали синергическую индукцию IL-2 с

использованием трех ингибиторов A2aR: ZM-241385, SCH-58261 и PBF-509 в комбинации с соединением 10. Как показано на ФИГУРЕ 49C, 50C и 51C, наблюдали также синергическую индукцию TNF с использованием трех ингибиторов A2aR: ZM-241385, SCH-58261 и PBF-509 в комбинации с соединением 10.

Эти обнаружения подкрепляют первоначальное обнаружение авторов настоящего изобретения, что ингибирование A2aR и GPR174 приводит к кооперативному усилению активации Т-клетки и продукции цитокинов. Поскольку цитокины, активность которых увеличена, IFN- γ , IL-2 и TNF, являются характерными для Th1-клеток, эти обнаружения привели к заключению, что комбинированное ингибирование GPCR A2aR и GPR174 может усиливать противоопухолевый иммунный ответ.

Следует отметить, что тестируемые ингибиторы A2aR принадлежат к четырем различным химическим классам, и что ни один из них не влияет на передачу сигналов GPR174 при тестировании в анализах передачи сигналов (данные не представлены). Подобным образом, ингибиторы GPR174 не влияют на передачу сигналов A2aR при оценке в анализах передачи сигналов (данные не представлены). Эти данные показывают, что во всех случаях наблюдаемые эффекты являются целевыми.

При исходных обнаружениях авторы настоящего изобретения использовали дозы 1 мкМ и 10 мкМ ZM-241385, которые должны ингибировать как A2aR, так и A2bR. В отличие от этого, в экспериментах, присутствующих в этом примере, показана активность, сходная с двумя дополнительными ингибирующими A2aR соединениями, имеющими большую специфичность для A2aR, чем для A2bR (см. таблицу 12 в примере 20).

В заключение, синергическая индукция цитокина, наблюдаемая в присутствии избирательных для A2aR доз PBF-509 (0,1 мкМ) и SCH-58261 (0,2 мкМ) в комбинации с ингибирующим GPR174 соединением 10, показывает, что ингибирование A2aR отдельно в присутствии ингибирующего GPR174 соединения (например, соединения 10) может усиливать ответы Th1 и таким образом, усиливать противоопухолевые ответы.

ПРИМЕР 19

В этом примере описана расширенная оценка синергической индукции цитокинов Th1, в которой всего 44 индивидуальных теста ингибитора A2aR ZM-241385 и ингибирующего GPR174 соединения 10 анализировали отдельно и вместе в РВМС, выделенных от 12 здоровых доноров.

Уровень техники

Как описано выше в примерах 15 и 18, синергическую индукцию IFN- γ наблюдали в РВМС, выделенных от нескольких различных доноров, с использованием трех различных ингибиторов A2aR: ZM-241385, SCH-58261 и PBF-509, когда каждый комбинировали с GPR174i (соединением 10), по сравнению с индукцией цитокинов в присутствии каждого ингибитора отдельно.

В этом примере описана расширенная оценка синергической индукции IFN- γ , в которой всего 44 индивидуальных теста ZM-241385 и соединения 10 анализировали

отдельно и вместе в РВМС, выделенных от 12 здоровых доноров.

Способы

РВМС человека, полученные от двенадцати индивидуальных добровольных доноров-людей распределяли при плотности 1×10^6 клеток/лунку в 96-луночном плоскодонном планшете и стимулировали в трех репликах с использованием 1 мкг/мл антитела против CD3 (UCHT1) и 0,1 мкг/мл антитела против CD28 (CD28.2) в присутствии:

ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ, 2 мкМ);

ингибирующего A2aR соединения (ZM-241385, 0,2 мкМ, 1 мкМ);

ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ, 2 мкМ) плюс ингибирующего A2aR соединения (ZM-241385, 0,2 мкМ, 1 мкМ); или контрольного носителя (DMSO).

Всего тестировали 44 эксперимента с использованием РВМС от 12 здоровых доноров (9 доноров для GM-CSF), где каждого донора тестировали в 1-8 отдельных экспериментов, в зависимости от донора (1-4 экспериментов для каждого, для GM-CSF). Для доноров, протестированных множество раз, среднее из реплик экспериментов использовали для показанных данных, так что каждый донор представлен одним значением. Цитокины детектировали в супернатантах с использованием платформ Legendplex (Biolegend) или MSD (MesoScale). Медиана (линия), среднее (точка) и диапазон (планки погрешностей) сводных данных показаны на ФИГУРАХ 52А-52Е. Процент доноров, для которых показана синергическая активность соединения 10 и ZM вместе (определенная как увеличение уровня цитокинов более суммы увеличений, наблюдаемых для каждого соединения отдельно) показаны на каждом графике. Однофакторный ANOVA с апостериорной коррекцией множественного сравнения Тьюки проводили для идентификации значимых различий (FC, средняя кратность изменения; ****, $p < 0,0001$; ***, $p < 0,001$; **, $p < 0,01$; *, $p < 0,05$, ns, не значимо).

Результаты

ФИГУРА 52А графически иллюстрирует кратность изменения, по сравнению с носителем, для количества IFN- γ в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции в культурах РВМС от 12 доноров, культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1-2 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (ZM, 0,2-1 мкМ); комбинации соединения 10 (1-2 мкМ) плюс 0,2-1 мкМ ZM; или контрольного носителя (DMSO).

Как показано на ФИГУРЕ 52А и обобщено в таблице 11, высокую степень индукции IFN- γ наблюдали с использованием ZM в присутствии соединения 10 (8,8 раз среднее, 25 раз максимум). В отличие от этого, ZM отдельно приводило к средней индукции IFN- γ в 2,1 раз. Самостоятельно, соединение 10 являлось немного более эффективным, чем ZM, со средней индукцией IFN- γ в 2,8 раз ($p = 0,06$), как показано в таблице 11. Среди индивидуальных доноров, для 75% (9/12) показана синергическая индукция IFN- γ , поскольку значения, полученные с использованием обоих ингибиторов, превышали сумму увеличений, полученных с использованием каждого ингибитора отдельно.

ФИГУРА 52В графически иллюстрирует кратность изменения, по сравнению с носителем, количества IL-2 в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции в культурах PBMC от 12 доноров, культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1-2 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (ZM, 0,2-1 мкМ); комбинации соединения 10 (1-2 мкМ) плюс 0,2-1 мкМ ZM; или контрольного носителя (DMSO).

Как показано на ФИГУРЕ 52В и обобщено в таблице 11, высокую степень индукции IL-2 наблюдали с использованием ZM в присутствии соединения 10 (2,7 раз среднее, 4,3 раз максимум). В отличие от этого, ZM отдельно индуцировало IL-2 в 1,4 раз в среднем. Соединение 10 самостоятельно являлось немного более эффективным, чем ZM, с получением в результате индукции IL-2 в 1,7 раз в среднем. Среди индивидуальных доноров, для 92% (11/12) показана синергическая индукция IL-2, поскольку значения, полученные с использованием обоих ингибиторов (т.е., A2aRi и GPR174i), превышали сумму увеличений, полученных с использованием каждого ингибитора отдельно.

ФИГУРА 52С графически иллюстрирует кратность изменения, по сравнению с носителем, количества TNF в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции в культурах PBMC от 12 доноров, культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1-2 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (ZM, 0,2-1 мкМ); комбинации соединения 10 (1-2 мкМ) плюс 0,2-1 мкМ ZM; или контрольного носителя (DMSO).

Как показано на ФИГУРЕ 52С и обобщено в таблице 11, в среднем, высокую степень индукции TNF наблюдали с использованием ZM в присутствии соединения 10 (8,0 раз среднее, 25 раз максимум). В отличие от этого, ZM отдельно индуцировало TNF в 2,1 раз в среднем. Соединение 10 самостоятельно являлось немного более эффективным, чем ZM, индуцируя TNF 2,7 раз в среднем. Среди индивидуальных доноров, для 67% (8/12) показана синергическая индукция TNF, поскольку значения, полученные с использованием обоих ингибиторов (т.е., A2aRi и GPR174i) превышали сумму увеличений, полученных с использованием каждого ингибитора отдельно.

ФИГУРА 52D графически иллюстрирует кратность изменения, по сравнению с носителем, количества GM-CSF в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции в культурах PBMC от 12 доноров, культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1-2 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (ZM, 0,2-1 мкМ); комбинации соединения 10 (1-2 мкМ) плюс 0,2-1 мкМ ZM; или контрольного носителя (DMSO).

Как показано на ФИГУРЕ 52D и обобщено в таблице 11, в среднем, высокую степень индукции гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) наблюдали с использованием ZM в присутствии соединения 10 (в 2,5 раз среднее, в 5,5 раз максимум). В отличие от этого, ZM отдельно индуцировало GM-CSF в 1,3 раз. Соединение 10 самостоятельно являлось немного более эффективным, чем ZM, индуцируя GM-CSF 1,4

раз в среднем. Среди индивидуальных доноров, для 89% (8/9) показана синергическая индукция GM-CSF, поскольку значения, полученные с использованием обоих ингибиторов (т.е., A2aRi и GPR174i) превышали сумму увеличений, полученных с использованием каждого ингибитора отдельно.

Таблица 11: Обобщение результатов, показанных на ФИГУРАХ 52А-52D

	IFN- γ		IL-2		TNF		GM-CSF	
	FC ¹	P ²	FC	P	FC	P	FC	P
Носитель против ZM	2,1	0,0412	1,4	<0,0001	2,1	0,0559	1,3	0,0116
Носитель против соед. 10	2,8	0,0048	1,7	0,0004	2,7	0,0074	1,4	0,0076
Носитель против соед. 10+ZM	8,8	0,0322	2,7	<0,0001	8,0	0,0365	2,5	0,0502
ZM против соед. 10	1,3	0,0625	1,2	0,2186	1,3	0,1131	1,1	0,6792
ZM против соед. 10+ZM	4,2	0,0376	1,9	0,0003	3,8	0,0451	1,9	0,0858
Соед. 10 против соед. 10+ZM	3,1	0,0549	1,6	<0,0001	3,0	0,0610	1,8	0,1049

¹Кратность изменения для указанного сравнения соединений

²значение p для критерия множественного сравнения Тьюки

Для своей расширенной оценки синергической индукции цитокинов в PBMC, авторы настоящего изобретения провели всего 44 индивидуальных тестов ингибитора A2aR ZM-241385 и ингибирующего GPR174 соединения 10, отдельно и вместе. Авторы настоящего изобретения использовали PBMC от 12 здоровых доноров, где индивидуальные тесты для одного и того же донора лежали в диапазоне от 1 до 8 реплик экспериментов, проведенных с использованием отдельных ампул криоконсервированных PBMC. Для представления данных и анализа значимости, авторы настоящего изобретения сначала вывели среднее из реплик экспериментов для одного и того же донора, так что 12 точек данных для 12 доноров сравнивали по эффектам соединения на продукцию цитокинов. В соответствии с начальными экспериментами авторов настоящего изобретения (описанных в примерах 15 и 17), для ZM-241385 и соединения 10 показана умеренная индукция IFN- γ (в среднем в 2,1 и в 2,8 раз, соответственно), в то время как их комбинация вызывала среднюю индукцию IFN- γ в 8,8 раз, лежащую в диапазоне вплоть до 25 раз, по сравнению с контрольным носителем (см. ФИГУРУ 52А). Для 75% доноров (9/12), количество IFN- γ , индуцированное комбинированными ингибиторами, превышало сумму количеств IFN- γ , индуцированных каждым ингибитором отдельно, показывая, что ингибитор GPR174 и ингибитор A2aR действовали синергически в одном и том же пути, регулирующем продукцию IFN- γ в PBMC человека. Сходные синергические эффекты наблюдали для индукции IL-2 (ФИГУРА 52В, 92% доноров), TNF (ФИГУРА 52С, 67% доноров) и GM-CSF (ФИГУРА 52D, 89% доноров), где синергические эффекты наблюдали в присутствии комбинации ZM-241385 и соединения 10 для большинства доноров для каждого цитокина.

В соответствии с ингибиторами, стимулирующими ответы Th1, следует отметить, что дополнительные цитокины, характерные для Th2 и Th17-клеток, а именно, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13 и IL-17, также измеряли в некоторых из экспериментов, описанных в этом

примере, все из которых являлись по большей части неизменными или немного уменьшенными посредством обработки соединением отдельно или в комбинации (данные не представлены).

Следует также отметить, что агонисты для AdoR (например, Ado или NECA) и GPR174 (PS или LysoPS) не были включены в эксперименты, описанные в этом примере. В предшествующих экспериментах, авторы настоящего изобретения обнаружили, что добавление этих агонистов не изменяло продукцию цитокинов, в то время как ингибиторы AdoR и GPR174 увеличивали количество цитокинов до одной и той же степени, независимо от дополнения агонистом (данные не представлены), позволяя предполагать, что естественные уровни аденозина и PS/LysoPS, присутствующие в используемых авторами настоящего изобретения культурах PBMC, являлись насыщающими. Это обнаружение также обеспечивает возможность того, что иммуносупрессивную активность эндогенных Ado и PS/LysoPS, где оба являются продуктами стресса и гибели клеток, которые являются высоко обогащенными в микроокружении опухолей (Vaupel, P. and Multhoff, G. *Front Immunol* (8):1887, 2017), можно эффективно преодолевать посредством комбинированного ингибирования их сопряженных с Gs GPCR (т.е., A2aR и GPR174), в то время как ингибирование их индивидуальных GPCR приводит к субоптимальной иммунной активации. Следует отметить, что, в большинстве экспериментов, увеличения количества цитокинов, наблюдаемые с использованием соединения 10 отдельно, были больше увеличений, полученных с использованием ZM-241385 отдельно.

Поскольку авторы настоящего изобретения наблюдали, что 0,2 мкМ ZM-241385 ингибирует как A2aR, так и A2bR (см. таблицу 12 в примере 20), они не могли исключить возможность того, что оба рецептора являлись ингибированными, для данных, показанных в этом примере. Тем не менее, эти обнаружения надежно установили, что комбинированное ингибирование GPR174 с использованием A2aR, A2bR или обоих (т.е., GPR174i плюс A2aRi, или GPR174i плюс A2bRi, или GPR174i плюс A2aRi плюс A2bRi) сильно и синергически индуцирует ответы Th1-цитокинов в тотальных PBMC человека от множества доноров-людей. Дальнейшая оценка вклада A2aR и A2bR в синергизм с GPR174 представлена ниже в примере 20.

ПРИМЕР 20

В этом примере описана дальнейшая оценка вклада A2aRi и A2bRi в синергизм с GPR174i.

Поскольку в большинстве экспериментов авторов настоящего изобретения используют дозы ZM-241385, по прогнозам, ингибирующие как A2aR, так и A2bR, авторы настоящего изобретения затем решили определить, обусловлено ли наблюдаемое увеличение уровня цитокина только блокадой A2aR, или играет ли также роль ингибирование A2bR. Оба рецептора передают сигналы через путь Gs-cAMP и как известно, супрессируют иммунные ответы, и оба рецептора считают важными мишенями для иммунотерапии, со специфическими для рецептора ингибиторами и с ингибиторами,

нацеленными как на A2aR, так и на A2bR (см., например, Vigano S. et al., *Front Immunol* vol 10: 925, 2019). Определение того, достигают ли при ингибировании обоих или любого рецептора максимальной индукция цитокина при комбинировании с ингибитором GPR174, должно делать важный вклад в разработку способов для оптимального нацеливания на оба пути.

Для исследования относительного вклада ингибирования A2aR и A2bR в синергизм с соединением 10, авторы настоящего изобретения оценивали специфические для A2aR дозы PBF-509 (0,1 мкМ) и SCH-58261 (0,2 мкМ), в присутствии и в отсутствие ингибитора A2bR MRS-1754 (1 мкМ). Кроме того, авторы настоящего изобретения оценивали эффекты аденозиндезаминазы (ADA; 0,75 мкг/мл), фермента, который осуществляет катаболизм аденозина в инозин и который должен стимулировать эффекты, сходные с двойным ингибированием A2aR и A2bR.

Способы

В начальном эксперименте, несколько ингибиторов A2aR и A2bR анализировали по специфичности для каждого рецептора, и значения IC_{50} определяли следующим образом: клетки HEK293 временно совместно трансфицировали экспрессирующими A2aR или A2bR конструкциями (Origene, MD), Cre-люцифераза, и TK-renilla в качестве внутреннего контроля (Promega) с использованием липофектамина 2000 (Invitrogen, CA), в соответствии с инструкциями производителя. Трансфицированные клетки инкубировали в течение 4-6 часов при 37°C и затем обрабатывали трипсином и переносили в 96-луночный планшет. Увеличивающиеся концентрации ингибиторов (ZM-241385, SCH-58261, PBF-509 и MRS-1754) добавляли к клеткам и затем инкубировали в течение ночи при 37°C. После инкубации в течение ночи, среды удаляли, и клетки лизировали. Активность люциферазы и renilla измеряли с использованием двойной системы для анализа люциферазы (Promega, WI), в соответствии с инструкциями производителя. Буфер для лизиса (25 мкл) добавляли к клеткам и инкубировали при комнатной температуре в течение 20-30 минут чтобы позволить лизис клеток. В лизате (10 мкл) измеряли активность люциферазы и renilla с использованием реагента LARII и Stop&Glo (50 мкл каждого) с использованием SpectraMax L (Molecular Devices, CA). Результаты показаны в таблице 12 ниже.

Таблица 12: Специфичность различных ингибиторов A2aR и A2bR

	A2A (IC_{50} нМ)	A2B (IC_{50} нМ)
ZM-241385	4,8	72
SCH-58261	40	>2000
PBF-509	5,6	680
MRS-1754	~1000	32

Отмечено, что MRS-1754 не влияла на передачу сигналов GPR174 при тестировании в анализах передачи сигналов (данные не представлены). Подобным образом, ингибитор GPR174 не влиял на передачу сигналов A2bR при оценке в анализах передачи сигналов (данные не представлены).

PBMC человека (1×10^6 клеток/лунку в 96-луночном плоскодонном планшете), полученные от донора 3 и донора 6, стимулировали с использованием 1 мкг/мл антитела против CD3 (UCHT1) и 0,1 мкг/мл антитела против CD28 (CD28,2) в присутствии:

ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ);

ингибирующего A2aR соединения ZM-241385 (0,1 мкМ);

ингибирующего A2aR соединения PBF-509 (0,1 мкМ);

ингибирующего A2aR соединения SCH-58261 (0,2 мкМ);

ингибирующего A2bR соединения MRS-1754 (1 мкМ);

аденозиндезаминазы («ADA») (0,75 мкг/мл);

и комбинаций этих реагентов, как указано в таблице 13 ниже.

Супернатанты из этих клеток собирали через 24 часа после стимуляции, и уровни IFN- γ , IL-2 и TNF определяли с использованием платформы MSD (MesoScale Discovery).

ФИГУРА 53А графически иллюстрирует количество IFN- γ (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции культур PBMC человека от одного донора (донора 3), культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ); ZM, 0,1 мкМ); PBF-509 (0,1 мкМ), SCH (0,2 мкМ), MRS (1 мкМ), аденозиндезаминазы (ADA, 0,75 мкг/мл), отдельно или в комбинации с соединением 10, или контрольного носителя.

Как показано на ФИГУРЕ 53А и обобщено в таблице 13, наивысшую степень индукции IFN- γ наблюдали, когда соединение 10 комбинировали с ингибитором A2aR (ZM, PBF-509 или SCH) или с аденозиндезаминазой (ADA), получая в результате 3,3-4,5-кратное увеличение IFN- γ , по сравнению с контрольным носителем. Самостоятельно, соединение 10 увеличивало уровни IFN- γ в 2,8 раз, в то время как ингибиторы A2aR и A2bR и ADA отдельно оказывали относительно умеренные эффекты (увеличение в 1,0-2,1 раз). Включение ингибитора A2bR (MRS) дополнительно не увеличивало уровни IFN- γ в любой комбинации. Совместно, эти обнаружения показывают, что синергическая активность между ингибированием GPR174 и ингибированием A2aR/A2bR для продукции IFN- γ в PBMC от донора 3 основана на ингибировании A2aR без вовлечения A2bR.

ФИГУРА 53В графически иллюстрирует количество IL-2 (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции культур PBMC человека от одного донора (донора 3), культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ); ZM, 0,1 мкМ); PBF-509 (0,1 мкМ), SCH (0,2 мкМ), MRS (1 мкМ), аденозиндезаминазы (ADA, 0,75 мкг/мл), отдельно или в комбинации с соединением 10, или контрольного носителя.

Как показано на ФИГУРЕ 53В и обобщено в таблице 13, наивысшую степень индукции IL-2 наблюдали, когда соединение 10 комбинировали с ингибитором A2aR (ZM, PBF-509 или SCH) или с аденозиндезаминазой (ADA), получая в результате увеличение в 4,7-5,9 раз, по сравнению с контрольным носителем. Самостоятельно, соединение 10 увеличивало уровни IL-2 в 2,9 раз, в то время как ингибиторы A2aR отдельно и ADA

отдельно оказывали относительно умеренные эффекты (увеличение в 1,6-2,3 раз). Включение ингибитора A2bR (MRS) с ингибиторами A2aR или ADA дополнительно не увеличивало уровни IL-2; однако, в культурах, лишенных ингибиторов A2aR, MRS отдельно увеличивало уровни IL-2 в 1,7 раз, и, с соединением 10, в 4,3 раз. Совместно, эти обнаружения показывают, что синергическая активность между ингибированием GPR174 и ингибированием A2aR/A2bR для продукции IL-2 в PBMC от донора 3 основана по большей части на ингибировании A2aR, но что ингибирование A2bR может также кооперироваться с ингибированием GPR174 для увеличения уровней IL-2.

ФИГУРА 53С графически иллюстрирует количество TNF (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции культур PBMC человека от одного донора (донора 3), культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ); ZM, 0,1 мкМ); PBF-509 (0,1 мкМ), SCH (0,2 мкМ), MRS (1 мкМ), аденозиндезаминазы (ADA, 0,75 мкг/мл), отдельно или в комбинации с соединением 10, или контрольного носителя.

Как показано на ФИГУРЕ 53С и обобщено в таблице 13, наивысшую степень индукции TNF наблюдали, когда соединение 10 комбинировали с ингибитором A2aR (ZM, PBF-509 или SCH) или с аденозиндезаминазой (ADA), получая в результате увеличение в 6,0-8,6 раз, по сравнению с контрольным носителем. Самостоятельно, соединение 10 увеличивало уровни TNF в 4,1 раз, в то время как ингибиторы A2aR отдельно и ADA отдельно оказывали относительно умеренные эффекты (увеличение в 1,9-3,9 раз). Включение ингибитора A2bR (MRS) с ингибиторами A2aR или ADA дополнительно не увеличивало уровни IL-2; однако, MRS отдельно увеличивало уровни IL-2 в 1,8 раз, и с PBF-509, MRS также немного увеличивало уровни TNF. Совместно, эти обнаружения показывают, что синергическая активность между ингибированием GPR174 и ингибированием A2aR/A2bR для продукции TNF в PBMC от донора 3 основана преимущественно на ингибировании A2aR.

ФИГУРА 54А графически иллюстрирует количество IFN- γ (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции культур PBMC человека от одного донора (донора 6), культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ); ZM, 0,1 мкМ); PBF-509 (0,1 мкМ), SCH (0,2 мкМ), MRS (1 мкМ), аденозиндезаминазы (ADA, 0,75 мкг/мл), отдельно или в комбинации с соединением 10, или контрольного носителя.

Как показано на ФИГУРЕ 54А и обобщено в таблице 13, наивысшую степень индукции IFN- γ наблюдали, когда соединение 10 комбинировали с ингибитором A2bR MRS и ингибитором A2aR или аденозиндезаминазой (ADA), получая в результате увеличение в 1,5-2,0 раз, по сравнению с контрольным носителем. Самостоятельно, соединение 10 значительно не увеличивало уровни IFN- γ . Подобным образом, ингибиторы A2aR и A2bR, и ADA самостоятельно не оказывали значимого эффекта. Умеренный эффект всех соединений на уровни IFN- γ в этом эксперименте вероятно, обусловлено тем фактом, что

донор 6 интенсивно отвечал на стимуляцию антителом против CD3, антителом против CD28, получая в результате очень высокую продукцию IFN- γ (8000-16000 пг/мл), которую невозможно было далее увеличивать в большой степени посредством GPR174 и ингибиторов A2aR/A2bR. Тем не менее, вовлечение ингибирования A2bR поддавалось наблюдению при комбинировании с ингибиторами A2aR и GPR174. Подобным образом, единственное значимое увеличение уровней IFN- γ в отсутствие ингибитора A2bR наблюдали для ингибитора GPR174 в комбинации с ADA (в 1,4 раз), что должно уменьшать активность аденозина как на A2aR, так и на A2bR. Дальнейшее увеличение уровней IFN- γ , наблюдаемое, когда MRS добавляли к соединению 10 и ADA (в 2,0 раз, по сравнению с контрольным носителем), может быть обусловлено возможностью, что ADA не использовали в насыщающей концентрации для этого донора, позволяя некоторую активность аденозина на A2bR для прямой или опосредованной супрессии экспрессии IFN- γ .

ФИГУРА 54В графически иллюстрирует количество IL-2 (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции культур PBMC человека от одного донора (донора 6), культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ); ZM, 0,1 мкМ); PBF-509 (0,1 мкМ), SCH (0,2 мкМ), MRS (1 мкМ), аденозиндезаминазы (ADA, 0,75 мкг/мл), отдельно или в комбинации с соединением 10, или контрольного носителя.

Как показано на ФИГУРЕ 54В и обобщено в таблице 13, наивысшую степень индукции IL-2 наблюдали, когда соединение 10 комбинировали с ингибитором A2bR (MRS) или с аденозиндезаминазой (ADA), получая в результате увеличение в 2,3-2,7 раз, по сравнению с контрольным носителем. Самостоятельно, соединение 10 увеличивало уровни IL-2 в 1,7 раз, в то время как ингибиторы A2aR отдельно и ADA отдельно не оказывали или оказывали относительно умеренные эффекты (увеличение в 1,0-1,3 раз). Комбинирование соединения 10 с ингибиторами A2aR увеличивало IL-2 до промежуточных уровней (в 1,7-2,2 раз). В культурах, лишенных ингибиторов A2aR, MRS отдельно увеличивало уровни IL-2 в 1,2 раз, и, с соединением 10, в 1,4 раз. Совместно, эти обнаружения показывают, что синергическая активность между ингибированием GPR174 и ингибированием A2aR/A2bR для продукции IL-2 в PBMC от донора 6 основана на комбинированных эффектах ингибирования как A2aR, так и A2bR.

ФИГУРА 54С графически иллюстрирует количество TNF (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции культур PBMC человека от одного донора (донора 6), культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ); ZM, 0,1 мкМ); PBF-509 (0,1 мкМ), SCH (0,2 мкМ), MRS (1 мкМ), аденозиндезаминазы (ADA, 0,75 мкг/мл), отдельно или в комбинации с соединением 10, или контрольного носителя.

Как показано на ФИГУРЕ 54С и обобщено в таблице 13, наивысшую степень индукции TNF наблюдали, когда соединение 10 комбинировали с ингибитором A2bR

(MRS) или с аденозиндезаминазой (ADA), получая в результате увеличение в 2,1-2,5 раз, по сравнению с контрольным носителем. Самостоятельно, соединение 10 увеличивало уровни TNF в 1,4 раз, в то время как ингибиторы A2aR отдельно и ADA отдельно не оказывали или оказывали относительно умеренные эффекты (увеличение в 1,1-1,4 раз). Комбинирование соединения 10 с ингибиторами A2aR увеличивало TNF до промежуточных уровней (увеличение в 1,3-1,8 раз). В культурах, лишенных ингибиторов A2aR, MRS отдельно увеличивало уровни TNF в 1,4 раз, и, с соединением 10, в 2,1 раз. Совместно, эти обнаружения показывают, что синергическая активность между ингибированием GPR174 и ингибированием A2aR/A2bR для продукции TNF в PBMC от донора 6 основана на комбинированных эффектах ингибирования как A2aR, так и A2bR.

Таблица 13: Обобщение результатов, показанных на ФИГУРЕ 53А-С и 54А-С

		Донор 3			донор 6		
		Нос. ¹	MRS ¹	MRS/Нос. ²	Нос. ¹	MRS ¹	MRS/Нос. ²
IFN- γ	Носитель	1,0	1,0	1,0	1,0	1,1	1,1
	Соед. 10	2,8*	2,2*	0,8*	1,2	1,3*	1,1
	ZM	1,4*	1,4*	1,0	1,3	1,2	0,9
	Соед. 10+ZM	3,4*	3,6*	1,0	1,2	1,7*	1,5*
	PBF	1,3*	1,5*	1,1	1,3	1,0	0,8
	Соед. 10+PBF	3,4*	3,3*	1,0	1,2	1,5*	1,3*
	SCH	2,1*	1,9*	0,9	0,8	1,3*	1,6*
	Соед. 10+SCH	4,5*	3,9*	0,9	1,1	1,5*	1,4*
	ADA	1,7*	1,1	0,7*	1,2	1,5*	1,3
	Соед. 10+ADA	3,3*	2,7*	0,8	1,4*	2,0*	1,5*
IL-2	Носитель	1,0	1,7*	1,7*	1,0	1,2*	1,2*
	Соед. 10	2,9*	4,3*	1,5*	1,7*	2,3*	1,4*
	ZM	2,1*	1,9*	0,9	1,2*	1,3*	1,0
	Соед. 10+ZM	5,9*	4,3*	0,7*	2,2*	2,7*	1,3*
	PBF	1,6*	1,7*	1,1	1,2	1,1*	1,0
	Соед. 10+PBF	4,7*	4,3*	0,9	1,9*	2,6*	1,3*
	SCH	2,3*	2,3*	1,0	1,0	1,1	1,2*
	Соед. 10+SCH	5,3*	4,6*	0,9	1,7*	2,5*	1,4*
	ADA	2,2*	1,9*	0,9	1,3*	1,3*	1,0
Соед. 10+ADA	5,2*	4,5*	0,9	2,4*	2,5*	1,0	
TNF	Носитель	1,0	1,8*	1,8*	1,0	1,4*	1,4*
	Соед. 10	4,1*	4,6*	1,1	1,4*	2,1*	1,4*
	ZM	2,4*	2,5*	1,1	1,2*	1,5*	1,2
	Соед. 10+ZM	7,4*	6,9*	0,9	1,6*	2,4*	1,5*

		Донор 3			донор 6		
		Нос. ¹	MRS ¹	MRS/Нос. ²	Нос. ¹	MRS ¹	MRS/Нос. ²
	PBF	1,9*	2,7*	1,4*	1,4*	1,5*	1,1*
	Соед. 10+PBF	6,7*	6,8*	1,0	1,8*	2,3*	1,3*
	SCH	3,9*	3,9*	1,0	1,1	1,7*	1,6*
	Соед. 10+SCH	8,6*	7,3*	0,8	1,3	2,5*	1,9*
	ADA	2,2*	1,9*	0,9	1,2*	1,4*	1,2*
	Соед. 10+ADA	6,0*	4,9*	0,8	1,9*	2,1*	1,1

¹Соотношение значений концентрации цитокина для указанной комбинации соединений, по сравнению с контрольным носителем.

²Соотношение значений концентрации цитокина для каждой комбинации соединений в присутствии против отсутствия MRS-1754.

*, $p < 0,05$, t-критерий, двустороннее распределение, двухвыборочный t-тест с одинаковыми дисперсиями.

Обнаружения, представленные в этом примере, показывают, что ингибирование как A2aR, так и A2bR, могут кооперироваться с ингибированием GPR174 для вызова максимальной индукции цитокинов, и что могут существовать условия, при которых ингибирование всех 3 GPCR приводит к наивысшей индукции цитокинов. Для донора 3, ингибирование A2aR отдельно обеспечивало максимальную индукцию цитокинов при комбинации с соединением 10, поскольку включение ингибитора A2bR (MRS) или удаление аденозина с использованием ADA дополнительно не увеличивало уровни цитокинов (за исключением небольшого увеличения количества IL-2 в отсутствие ингибитора A2aR). Для донора 6, добавление A2bR являлось необходимым для достижения наивысших уровней IFN-g, IL-2 и TNF.

Три другие мишени для иммунотерапии злокачественных опухолей в пути аденозина представляют собой CD38, CD39 и CD73, эктонуклеотидазы, вовлеченные в продукцию аденозина. CD39 и CD73 переводят АТФ в аденозин посредством удаления фосфата. Аденозин можно также получать из NAD⁺ посредством оси, сфокусированной на метаболизирующей NAD⁺ CD38, образующей аденозиндифосфат-рибозу (ADPR).

Обнаружение авторов настоящего изобретения, что в присутствии ингибитора GPR174, истощение аденозина с использованием ADA приводит к максимальной индукции цитокинов, сходной с индукцией, достигаемой с использованием комбинированного ингибирования A2aR/A2bR показывает, что комбинация ингибитора GPR174 с ингибиторами CD38, CD39 или CD73 также должна усиливать противоопухолевые иммунные ответы.

ПРИМЕР 21

Этот пример показывает, что четыре соединения в двух химических классах ингибиторов GPR174 вызвали почти идентичные профили Th1-цитокинов в тотальных РВМС, стимулированных с использованием митогенного антитела против CD3 и антитела

против CD28, и что сходные степени синергизма с ингибитором A2aR ZM-241385 получены для всех четырех ингибиторов GPR174.

Поскольку в данных, представленных к настоящему времени в анализах высвобождения цитокинов из РВМС, использовали один ингибитор GPR174 (соединение 10), являлось важным показать, что активность, наблюдаемая авторами настоящего изобретения, была обусловлена действием ингибитора на GPR174, а не нецелевой активностью, уникальной для конкретного соединения. Для исключения возможности специфической для соединения нецелевой активности, авторы настоящего изобретения тестировали три дополнительных ингибитора GPR174: два из тех же химических серий, что и соединение 10 (соединения 6 и 11, группа I), и третье соединение из другого химического класса (соединение 20, группа II). На основании значений IC_{50} , полученных с использованием этих соединений в анализе передачи сигналов (см. пример 16, фигура 47), авторы настоящего изобретения тестировали эти соединения в двух концентрациях: одной, прогнозированной как эффективно ингибирующая GPR174, и одной, которая может проявлять частичное ингибирование в анализе стимуляции тотальных РВМС.

РВМС человека (1×10^6 клеток/лунку в 96-луночном плоскодонном планшете), полученные от донора 7, стимулировали с использованием 1 мкг/мл антитела против CD3 (UCHL1) и 0,1 мкг/мл антитела против CD28 (CD28.2) в присутствии:

ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 и 0,3 мкМ);

ингибирующего GPR174 соединения 6 (1 и 0,3 мкМ);

ингибирующего GPR174 соединения 11 (1 и 0,3 мкМ);

ингибирующего GPR174 соединения 20 (10 и 3 мкМ);

каждое в присутствии и в отсутствие ингибирующего A2aR соединения ZM-241385 (0,1 мкМ).

Супернатанты из этих клеток собирали через 24 часа после стимуляции, и уровни IFN- γ , IL-2, TNF и GM-CSF определяли с использованием платформы MSD (MesoScale Discovery).

Результаты

ФИГУРА 55А графически иллюстрирует количество IFN- γ (пг/мл) в супернатантах через 24 часа после стимуляции РВМС человека (донор 7) в присутствии ингибирующих GPR174 соединений 6, 10, 11 или 20, каждого в присутствии или в отсутствие ZM.

Как показано на ФИГУРЕ 55А и обобщено в таблице 14, все четыре ингибирующие GPR174 соединения 6, 10, 11 и 20 проявляли синергизм с ZM для увеличения количества IFN- γ до уровней, превышающих сумму увеличений, полученных с использованием каждого ингибитора отдельно. Синергизм наблюдали между ZM и как высокими, так и низкими концентрациями каждого ингибитора GPR174.

ФИГУРА 55В графически иллюстрирует количество IL-2 (пг/мл) в супернатантах через 24 часа после стимуляции РВМС человека (донор 7) в присутствии ингибирующих GPR174 соединений 6, 10, 11 или 20, каждого в присутствии или в отсутствие ZM.

Как показано на ФИГУРЕ 55B и обобщено в таблице 14, все четыре ингибирующие GPR174 соединения 6, 10, 11 и 20 проявляли синергизм с ZM для увеличения количества IL-2 до уровней, превышающих сумму увеличений, полученных с использованием каждого ингибитора отдельно. Синергизм наблюдали между ZM и как высокими, так и низкими концентрациями каждого ингибитора GPR174, за исключением низкой дозы соединения 20, наименее активной из четырех соединений (см. пример 16, фигура 47).

ФИГУРА 55C графически иллюстрирует количество TNF (пг/мл) в супернатантах через 24 часа после стимуляции PBMC человека (донор 7) в присутствии ингибирующих GPR174 соединений 6, 10, 11 или 20, каждого в присутствии или в отсутствие ZM.

Как показано на ФИГУРЕ 55C и обобщено в таблице 14, все четыре ингибирующие GPR174 соединения 6, 10, 11 и 20 проявляли синергизм с ZM для увеличения количества TNF до уровней, превышающих сумму увеличений, полученных с использованием каждого ингибитора отдельно. Синергизм наблюдали между ZM и как высокими, так и низкими концентрациями каждого ингибитора GPR174, за исключением низкой дозы соединения 20, наименее активной из 4 соединений (см. пример 16, фигура 47).

ФИГУРА 55D графически иллюстрирует количество GM-CSF (пг/мл) в супернатантах через 24 часа после стимуляции PBMC человека (донор 7) в присутствии ингибирующих GPR174 соединений 6, 10, 11 или 20, каждого в присутствии или в отсутствие ZM.

Как показано на ФИГУРЕ 55D и обобщено в таблице 14, все четыре ингибирующие GPR174 соединения 6, 10, 11 и 20 проявляли синергизм с ZM для увеличения количества GM-CSF до уровней, превышающих сумму увеличений, полученных с использованием каждого ингибитора отдельно. Синергизм наблюдали между ZM и как высокими, так и низкими концентрациями каждого ингибитора GPR174, за исключением низкой дозы соединения 20, наименее активной из четырех соединений (см. пример 16, фигура 47).

Таблица 14: Обобщение результатов, показанных на Фигурах 55A-D.

		Нос.	Соединение 10		Соединение 6		Соединение 11		Соединение 20	
			1 мкМ ¹	0,3 мкМ	1 мкМ	0,3 мкМ	1 мкМ	0,3 мкМ	10 мкМ	3 мкМ
IFN- γ	Нос.	1,0	2,2*	2,1*	1,9*	2,0*	1,8*	1,9*	1,5*	1,2
	ZM	1,4*	3,7*	3,7*	3,8*	3,1*	3,4*	2,9*	2,1*	1,8*
IL-2	Нос.	1,0	1,6*	1,7*	1,5*	1,5*	1,3	1,4*	1,4*	1,3
	ZM	1,0	2,2*	2,0*	2,1*	1,9*	1,9*	1,8*	2,1*	1,6*
TNF	Нос.	1,0	2,2*	2,2*	2,1*	2,1*	1,7*	1,7*	1,5*	1,4*
	ZM	1,3*	3,8*	3,6*	4,0*	3,4*	3,0*	2,6*	2,4*	1,9*
GM-CSF	Нос.	1,0	3,1*	3,6*	2,9*	3,9*	2,4*	2,9*	2,3*	2,7*
	ZM	1,3	5,9*	6,2*	6,0*	6,2*	4,9*	4,4*	4,4*	4,6*

¹ Соотношение значений концентрации цитокина для указанной комбинации соединений, по сравнению с контрольным носителем (Нос., Нос.).

*, $p < 0,05$, t-критерий, двустороннее распределение, двухвыборочный t-тест с одинаковыми дисперсиями.

В этом примере, авторы настоящего изобретения показали, что четыре соединения, перекрывающие два химических класса ингибиторов GPR174, вызывали почти идентичные профили Th1-цитокинов в тотальных PBMC, стимулированных с использованием митогенного антитела против CD3 и антитела против CD28, и что сходные степени синергизма с ингибитором A2aR ZM-241385 получены для всех четырех ингибиторов GPR174. Это обнаружение дополнительно подтверждает, что наблюдаемые эффекты обусловлены каждым из четырех соединений, действующим на GPR174, а не на другие молекулярные мишени.

В общем, обнаружения авторов настоящего изобретения показывают, что комбинированное ингибирование GPR174 и пути аденозин/A2aR/A2bR приводит к синергическому усилению иммунных ответов. Синергизм наблюдали, когда GPR174 и ингибиторы A2aR/A2bR комбинировали, что приводило, в некоторых случаях, к выдающемуся увеличению в 25 раз уровней IFN- γ и TNF. Поскольку усиленные ответы относились к Th1-полярности, и поскольку как аденозин, так и агонисты GPR174 PS/lysoPS являются высоко обогащенными в микроокружении опухолей (см., например, Viganò S. et al., *Front Immunol* vol 10: 925, 2019; Li et al., *Molecular Cancer Therapeutics* vol 17 (1): 169-82, 2017; и Desai T.J. et al., *Oncotarget* 7:30678-30690, 2016), обнаружения авторов настоящего изобретения позволяют предполагать, что комбинированное ингибирование обоих путей у пациентов с злокачественными опухолями может являться важным для эффективного противостояния иммуносупрессивному характеру микроокружения опухоли и стимуляции иммунных ответов для уничтожения опухолей.

ПРИМЕР 22

В этом примере описана расширенная оценка синергической индукции Th1-цитокинов, в которой ингибитор A2aR (ZM-241385), ингибитор A2bR (MRS1754) и ингибитор GPR174 (соединение 10) анализировали отдельно и в комбинации, в PBMC, выделенных от 5 здоровых доноров.

Способы

Способы осуществляли, как описано в примере 20, с той модификацией, что PBMC человека от 5 здоровых доноров стимулировали в присутствии ингибитора A2aR (ZM-24138: 0,2 мкМ), ингибитора A2bR (MRS1754: 2 мкМ) и ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ) анализировали отдельно и в комбинации. Супернатанты из этих клеток собирали через 24 часа после стимуляции, и уровни IFN- γ , IL-2 и TNF определяли с использованием платформы MSD (MesoScale Discovery).

Результаты

Результаты, показывающие эффекты комбинированного ингибирования GPR174, A2aR и A2bR в нормализованных данных для 5 доноров-людей показаны на ФИГУРАХ 56А-С. Примечание: GPR174i=Соединение 10.

ФИГУРА 56А графически иллюстрирует кратность изменения, по сравнению с носителем, количества IFN- γ в культуральных супернатантах через 24 часа после

стимуляции в культурах PBMC человека от 5 доноров, культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (ZM, 0,2 мкМ); ингибирующего A2bR соединения MRS (2 мкМ) или комбинации соединения 10 (1 мкМ) плюс 0,2 мкМ ZM плюс 2 мкМ MRS, или контрольного носителя (DMSO).

ФИГУРА 56В графически иллюстрирует кратность изменения, по сравнению с носителем, количества IL-2 в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции в культурах PBMC человека от 5 доноров, культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (ZM, 0,2 мкМ); ингибирующего A2bR соединения MRS (2 мкМ) или комбинации соединения 10 (1 мкМ) плюс 0,2 мкМ ZM плюс 2 мкМ MRS, или контрольного носителя (DMSO).

ФИГУРА 56С графически иллюстрирует кратность изменения, по сравнению с носителем, количества TNF в культуральных супернатантах через 24 часа после стимуляции в культурах PBMC человека от 5 доноров, культивированных в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ); ингибирующего A2aR соединения (ZM, 0,2 мкМ); ингибирующего A2bR соединения MRS (2 мкМ) или комбинации соединения 10 (1-2 мкМ) плюс 0,2 мкМ ZM плюс 2 мкМ MRS, или контрольного носителя (DMSO).

Обсуждение

Результаты, показанные в этом примере, дополнительно подтверждают и расширяют результаты, показанные в примере 20, и показывают, что ингибирование как A2aR, так и A2bR может кооперироваться с ингибированием GPR174 для вызова максимальной индукции цитокинов, и что могут существовать условия, при которых ингибирование всех 3 GPCR приводит к наивысшей индукции цитокина.

ПРИМЕР 23

В этом примере описано исследование, которое проводили для оценки эффекта репрезентативного ингибирующего GPR174 соединения 10, отдельно или в комбинации с ингибитором A2aR (ZM-241385), на экспрессию амфирегулина (AREG).

Способы

Способы осуществляли, как описано в примере 14, с той модификацией, что клетки инкубировали в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 при 1 мкМ (GPR174i), ингибитора A2aR ZM-241385 при 0,2 мкМ или комбинации соединения 10 (1 мкМ) плюс ZM (0,2 мкМ).

Результаты

ФИГУРА 57 графически иллюстрирует кратность уменьшения количества AREG+ клеток в присутствии носителя; ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ); ZM-241385 (0,2 мкМ); или комбинации соединения 10 (1 мкМ) плюс ZM (0,2 мкМ).

Обсуждение

Результаты, показанные в этом примере, согласуются с результатами, описанными в примере 14, и показывают, что комбинация ингибитора GPR174 и ингибитора A2aR дополнительно уменьшает экспрессию AREG в активированных CD4+ Т-клетках, по

сравнению с каждым средством отдельно.

Обобщение

Как описано и показано в настоящем описании, GPR174 представляет собой орфанный GPCR, который экспрессируется почти исключительно в иммунocyтaх (Т, В и НК-клетках), и идентифицированы многочисленные ингибиторы GPR174, попадающие в шесть различных химических классов, как описано в настоящем описании. Как дополнительно описано в настоящем описании, авторы настоящего изобретения открыли, что фосфатидилсерин (PS) является агонистом GPR174. Как дополнительно описано в настоящем описании, ингибирование GPR174 стимулирует иммунную систему, в частности, ответ Th1, и супрессирует активаторы опухолей. Как дополнительно описано в настоящем описании, комбинированное ингибирование GPR174 и пути аденозина синергически усиливает продукцию Th1-цитокина. Эти обнаружения представляют новый терапевтический способ в иммунотерапии злокачественных опухолей для всех солидных опухолей. Этот терапевтический способ включает использование ингибитора GPR174 в форме одиночного средства или в комбинации с одним или несколькими ингибиторами A2aR, ингибиторами A2bR, ингибиторами CD38, ингибиторами CD39 и/или ингибиторами CD73 для лечения солидной опухоли у нуждающегося в этом субъекта. Этот способ также поддается комбинации с ингибиторами контрольных точек и видами клеточной терапии.

ФИГУРА 58 представляет собой схематическую диаграмму, иллюстрирующую, каким образом как GPR174, так и рецепторы аденозина отвечают на продукты стресса и гибели клеток. Как проиллюстрировано на ФИГУРЕ 58, как GPR174, так и рецепторы аденозина отвечают на продукты стресса и гибели клеток. Как показано на ФИГУРЕ 58, в опосредованном GPR174 пути, апоптоз и стресс приводят к получению фосфатидилсерина (PS), который является агонистом GPR174 и вызывает передачу сигналов Gs/cAMP, и приводит к иммуносупрессии. Как далее показано на ФИГУРЕ 58, в пути аденозина, подвергание разрушению/активации/стрессу клеток приводит к получению внеклеточного АТФ, который превращается в аденозин, который является агонистом для рецепторов A2A и A2B, что также вызывает передачу сигналов Gs/cAMP и иммуносупрессию. Как далее показано на ФИГУРЕ 58, путь аденозина можно ингибировать посредством ингибиторов CD39 (например, POM1, IPH52) или посредством ингибиторов CD73 (например, MEDI9447, BMS-986179), или посредством ингибитора A2aR (например, CPI-444, PBF-509, MK-3814 или AZD4635) или ингибитора A2bR. Как показано в настоящем описании, ингибирование как опосредованного GPR174 пути, так и пути аденозина приводит к эффективному уменьшению количества cAMP и иммуностимуляции.

В общем, результаты, описанные в настоящем описании, показывают (1) пути иммунитета против злокачественных опухолей, контролируемые посредством GPR174; (2) идентификацию фосфатидилсерин (PS) как сильного естественного лиганда для GPR174; (3) коллекцию новых низкомолекулярных ингибиторов GPR174; и (4) очень большое и синергическое усиление продукции «борющихся с опухолью» цитокинов Т-клетками после

комбинированного ингибирования как GPR174, так и пути аденозина, другого ключевого метаболического пути, регулирующего иммунитет опухоли. Кроме того, в этом отношении, как показано в настоящем описании, ингибиторы GPR174 усиливают вызванную ингибиторами пути аденозина продукцию борющихся с опухолью цитокинов вплоть до 25 раз. Это приводит к новому способу иммунотерапии злокачественных опухолей, нацеленному на ингибирование GPR174, который можно комбинировать с ингибиторами пути аденозина и значимо улучшать эффекты уничтожения опухолей. Ожидают, что нацеленная на GPR174 иммунотерапия может являться применимой для всех солидных опухолей (например, молочной железы, легкого, поджелудочной железы, ободочной кишки, головного мозга и т.д.).

Подобно GPR174, рецепторы аденозина A2A/A2B представляют собой GPCR. Центральные компоненты пути аденозина, рецепторы A2A/A2B, подвергали нацеливанию для иммунотерапии злокачественных опухолей в нескольких компаниях, как показано в таблице 15 ниже. GPR174 и рецепторы A2A/A2B разделяют определенные признаки. Во-первых, каждый из них увеличивает количество внутриклеточного циклического аденозинмонофосфата (сАМР), который, как хорошо известно, супрессирует тип иммунного ответа, необходимый для уничтожения клеток опухолей. Во-вторых, эти рецепторы активируются посредством молекул (т.е., PS и аденозина, соответственно), которые являются высоко обогащенными в микроокружении опухолей. Поразительно, что в экспериментах с использованием тотальных мононуклеарных клеток периферической крови человека (PBMC) где PS и аденозин естественным образом присутствуют в большом количестве, ингибиторы GPR174 проявляют синергизм с ингибиторами A2A/A2B для очень сильного увеличения ответов Т-клеток. Обнаружения включают следующие:

Ингибирование A2A/A2B отдельно приводило, в среднем, к 2-кратному увеличению количества как интерферона-гамма (IFN- γ), так и фактора некроза опухоли (TNF) и к меньшему увеличению количества гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и интерлейкина-2 (IL-2);

Ингибирование GPR174 отдельно в среднем приводит к увеличению в 2,8 раз для IFN- γ , в 2,7 раз для TNF, в 1,7 раз для IL-2 и 1,4 в раз для GM-CSF;

Комбинирование ингибитора GPR174 с ингибированием A2A и/или A2B увеличивало средние уровни IFN- γ и TNF в 8-9 раз, и уровни IL-2 и GM-CSF почти в 3 раза, с максимальным увеличением, достигающим 25 раз для IFN- γ и TNF и более 4 раз для IL-2 и GM-CSF

На пути аденозина были сфокусированы усилия для разработки иммунотерапевтического лекарственного средства в фармацевтической промышленности (см. таблицу 15). Результаты, описанные в настоящем описании, в настоящее время показывают, что относительно умеренное резкое увеличение продукции цитокинов Т-клетками, наблюдаемое при ингибировании рецепторов A2A или A2B, по отдельности или обоим вместе, можно заметно усиливать при комбинации с ингибированием пути GPR174.

Кроме того, открытие, что PS самостоятельно стимулирует иммуносупрессивный GPCR - а именно GPR174 - на Т лимфоцитах, представляет значительный прогресс в понимании авторов настоящего изобретения, каким образом PS может влиять на иммунитет против опухолей.

Эти обнаружения являются особенно важными для пациентов, устойчивых к ингибиторам контрольных точек, таким как антитело против PD-1 (например, кейтруда® и опдиво®) и против CTLA-4 (ервой®), и к таким видам клеточной терапии, как CAR-T-клеточная и адоптивная Т-клеточная терапия. Ингибиторы контрольных точек являются эффективными только у незначительной части пациентов, и высокие уровни образующих аденозин молекул наблюдали у неответающих пациентов. Кроме того, преодоление естественной иммуносупрессии в солидных опухолях представляет основную трудность для клеточной терапии. Поскольку PS и аденозин оба являются продуктами стресса и гибели клеток в солидных опухолях, ожидают, что пациенты, устойчивые к терапии ингибиторами контрольных точек или клеточной терапии, могут получать большое преимущество от комбинированного ингибирования путей GPR174 и аденозина. Проще говоря, авторы настоящего изобретения открыли, что существует два пути для торможения посредством сАМР иммунитета против опухолей и, для обеспечения более эффективной активности уничтожения опухолей, как GPR174, так и путь аденозина, необходимо ингибировать, как проиллюстрировано на ФИГУРЕ 58.

Таблица 15: Ингибиторы пути аденозина в исследованиях иммунотерапии злокачественных опухолей¹

Лекарственное средство/Лекарственное средство-кандидат	Мишень	Стадия	Дизайн	Показание	Спонсор
AZD4635	A2A	Ph 2	Монотерапия, комбинация с имфинзи® (антителом против PD-L1)	Солидные злокачественные новообразования на поздних стадиях	AstraZeneca
CPI-445	A2A	Ph1b/2	Монотерапия, комбинация с тецентрик® (антителом против PD-L1)	Немелкоклеточный рак легкого (NSCLC)	Hoffman-La Roche
NIR178	A2A	Ph 1b	Комбинация с кейтруда® и LAG525 (против LAG3)	Трижды отрицательный рак молочной железы	Novartis
NIR178	A2A	Ph 2	Монотерапия, комбинация с	Солидные злокачественн	Novartis

Лекарственное средство/Лекарственное средство-кандидат	Мишень	Стадия	Дизайн	Показание	Спонсор
			кейтруда®	ые новообразования на поздних стадиях	
NIR178	A2A	Ph 1/1b	Монотерапия, комбинация с кейтруда®	Немелкоклеточный рак легкого (NSCLC)	Palobiofarma
CPI-444	A2A	Ph 1/1b	Монотерапия, комбинация с тецентрик®	Почечноклеточный рак; NSCLC	Corvus Pharmaceuticals
EOS100850	A2A	Ph 1/1b	Монотерапия	Солидные опухоли	iTeos Therapeutics
PBF-1129	A2B	Ph 1	Монотерапия	Немелкоклеточная карцинома легкого (NSCLC)	Palobiofarma
CPI-444	A2A/A2B	Ph 1/1b	Монотерапия, комбинация с Кейтруда® или тецентрик®	Солидные опухоли	Corvus Pharmaceuticals
Даратумумаб	CD38	Ph 1	Монотерапия	Карцинома почки, рак мочевого пузыря	M.D. Anderson
ТТХ-030	CD39	Ph 1/1b	Монотерапия, комбинация с кейтруда® и химиотерапевтическими средствами	Солидная опухоль, лимфома	Tizona Therapeutics/ AbbVie
Олеклумаб	CD73	Ph 1	Монотерапия, комбинация с имфинзи® (антителом против PD-L1)	Солидные злокачественные новообразования на поздних стадиях	AstraZeneca
Олеклумаб	CD73	Ph 1	Монотерапия	Солидные злокачественные новообразования на поздних стадиях	AstraZeneca
Олеклумаб	CD73	Ph 1	Комбинация с	Мышечно-	Dana-Farber

Лекарственное средство/Лекарственное средство-кандидат	Мишень	Стадия	Дизайн	Показание	Спонсор
			имфинзи® (антителом против PD-L1)	инвазивный рак мочевого пузыря	Cancer Institute
Олеклумаб	CD73	Ph 2	Комбинация с имфинзи® (антителом против PD-L1)	Рецидивирующий рак яичника	Nordic Society of Gynecologic Oncology
Олеклумаб	CD73	Ph 2	Комбинация с имфинзи® (антителом против PD-L1)	Устойчивый к ингибированию PD-1/PD-L1 NSCLC	AstraZeneca
Олеклумаб	CD73	Ph 1b/2	Комбинация с имфинзи® (антителом против PD-L1) и химиотерапией	Трижды отрицательный рак молочной железы	AstraZeneca
Олеклумаб	CD73	Ph 1b/2	Комбинация с химиотерапией, комбинация с химиотерапией и имфинзи®	Метастазирующий рак поджелудочной железы	AstraZeneca
Олеклумаб	CD73	Ph 1b/2	Комбинация с AZD4635 (A2Ai), комбинация с осимертиниб (EGFR ^{T790M} ингибитор)	NSCLC на поздних стадиях	AstraZeneca
BMS-986179	CD73	Ph 1/2a	Монотерапия, комбинация с опдиво® (антитело против PD-1)	Солидные злокачественные новообразования на поздних стадиях	Bristol-Myers Squibb
CPI-006	CD73	Ph 1/1b	Монотерапия, комбинация с CPI-444 (A2Ai), комбинация с кейтруда®	Солидные злокачественные новообразования на поздних стадиях	Corvus Pharmaceuticals
NZV930	CD73	Ph 1/1b	Монотерапия, комбинация с кейтруда®, комбинация с NIR178 (A2Ai)	Солидные злокачественные новообразования на поздних стадиях	Novartis

¹Vigano et al., *Frontiers in Immunology*, vol 10, Article 925, June 2019

ПРИМЕР 24

В этом примере описаны эффекты генетической недостаточности GPR174 на рост мышечной карциномы ободочной кишки CT26.cl25 у мышей, обработанных с использованием истощающего регуляторные Т-клетки (Т-рег) антитела против GITR.

Модели на мышах роста опухоли обеспечивают экспериментальную платформу для мониторинга и манипуляций с иммунитетом против опухолей. Для оценки того, является ли продукт конкретного гена важным для управления характером и интенсивностью противоопухолевых иммунных ответов, общепринятым способом является инокуляция нормальным или мутантным мышам, лишенным представляющего интерес гена, линии клеток опухоли. Опухоль растет до объема, делающего необходимой эвтаназию мыши, если иммунный ответ не уменьшит скорость роста опухоли или не приведет к полному клиренсу опухолей у мышей. В предварительных исследованиях, авторы настоящего изобретения обнаружили, что карцинома CT26.cl25 ободочной кишки росла с идентичной скоростью у мышей WT и мышей, лишенных интактного гена *GPR174* (мышей *GPR174-KO*). Исследования *in vitro* авторов настоящего изобретения с использованием Т-клеток мыши и спленоцитов мышей выявило, что недостаточность GPR174 или ингибирование GPR174 увеличивало продукцию IL-2 более значимо, чем других цитокинов (см. пример 7). Поскольку IL-2 является фактором роста как для иммуносупрессивных Т-рег, так и для уничтожающих опухоль Th1 и CD8 Т-клеток, авторы настоящего изобретения сделали выводы, что это увеличение количества IL-2 у несущих опухоль мышей может стимулировать как стимулирующие опухоль Т-рег, так и уничтожающие опухоль Th1 и CD8 Т-клетки, получая в результате опосредованную Т-рег нейтрализацию противоопухолевых ответов.

Применительно к балансу потребления IL-2 между Т-рег и Th1/CD8 Т-клетками, существует фундаментальное отличие между человеком и мышами, которое следует принимать во внимание во время эффективного использования и интерпретации моделей на мышах заболевания человека. У не подвергнутых манипуляциям лабораторных мышей, включая мышей, которым только что ввели инокулят клеток опухоли, подавляющее большинство Т-клеток, экспрессирующих высокоаффинный рецептор IL-2, CD25, представляют собой Т-рег, с уровнями экспрессии CD25, заметно более высокими, чем для CD25 на других CD4 Т-клетках. В отличие от этого, распределение CD25 между Т-рег и другими CD4 Т-клетками у человека является обратным, где большинство CD4 Т-клеток, экспрессирующих CD25, представляют собой эффекторные Т-клетки, которые экспрессируют CD25, на уровнях, в большой степени перекрывающихся с Т-рег (см. Churlaud G. et al., *Frontiers in Immunology* vol 6, article 171, 2015; Akimova T. et al., *PLoS ONE*, Vol 6, Issue 8, 2011). Эффекторные Т-клетки отвечают на IL-2 провоспалительным образом, включая продукцию IFN- γ , необходимый цитокин для противоопухолевого иммунитета. Таким образом, у мышей, увеличенные уровни IL-2, обусловленные

недостаточностью GPR174, обеспечивают большое преимущество для Т-рег, в то время как у человека, увеличенные уровни IL-2 после введения ингибитора GPR174, имеют больший потенциал для благоприятствования уничтожающим опухоль эффекторным клеткам, включая Th1-клетки, CD8 Т-клетки и NK-клетки.

Чтобы позволить предполагаемому увеличенному уровню IL-2 у мышей GPR174-КО предпочтительно действовать на уничтожающие опухоль иммуноциты, авторы настоящего изобретения выбрали обработку мышей антителом (DTA-1) против GITR (продукта гена индуцированного глюкокортикоидом родственного TNFR белка), которое, как известно, истощает Т-рег клетки и стимулируют противоопухолевые ответы в других Т-клетках (см. Сое D. et al., *Cancer Immunol Immunother* 59(9):1367-77, 2010). Полное истощение Т-рег клеток с использованием высоких доз антитела против GITR известно для активации сильных противоопухолевых ответов у мышей WT, в условиях, в которых авторы настоящего изобретения могли не наблюдать различий между мышами WT и GPR174-КО. В отличие от этого, частичное или временное истощение Т-рег клеток стимулирует частичный противоопухолевый иммунитет, который можно усиливать с использованием других видов иммуностимулирующей терапии (см. Zapposodi R. et al., *Nat Med* 25(5):759-766, 2019). Поскольку частичное истощение Т-рег позволяет более эффективное потребление IL-2 уничтожающими опухоль Т-клетками, этот способ можно рассматривать как формирующий «гуманизацию» модели опухоли на мышах. Таким образом, авторы настоящего изобретения сравнивали рост линии клеток опухоли у мышей WT или GPR174-КО, которые обрабатывали с использованием низкой дозы антитела против GITR DTA-1 на только 2-3 избранных суток после инокуляции опухоли.

Способы

Карцинома ободочной кишки CT26.cl25 происходит из линии мышей BALB/c. Мышей GPR174-КО получали, как описано в примере 7. Поскольку GPR174 находится на X-хромосоме, авторы настоящего изобретения являлись способными использовать самцов мышей WT и GPR174-КО с BALB/c-толерантной иммунной системой посредством скрещивания самок 129S GPR174-КО с самцами BALB/c. Однопометным самцам F1 мышей WT или GPR174-КО (n=15) [BALB/c x 129S] инокулировали подкожно 500000 клеток CT26.cl25 на сутки 0. В первом эксперименте, на сутки 7 и 9 (ФИГ. 59А и В), или во втором эксперименте на сутки 7, 9 и 14 (ФИГ. 61А и В), всем мышам вводили внутривентральные инъекции 200 мкг антитела против GITR (клон DTA-1; Bio-X-Cell). Объем опухоли рассчитывали посредством уравнения $(\text{длина} \times \text{ширина}^2)/2$, и мышей с опухолями с измерениями $>1500 \text{ мм}^3$ подвергали эвтаназии.

Результаты

ФИГУРА 59А и ФИГУРА 59В графически иллюстрируют рост опухолей CT26 у индивидуальных мышей WT (ФИГ. 59А) и GPR174-КО (ФИГ. 59В), подвергнутых инокуляции клеток мышинной карциномы ободочной кишки CT26.cl25 на сутки 0 и обработке антителом против GITR на сутки 7 и 9.

Как показано на ФИГУРЕ 59В, рост опухоли в среднем замедлялся у мышей GPR174-КО, по сравнению с мышами WT (ФИГ. 59А).

ФИГУРА 60 графически иллюстрирует процент выживаемости несущих опухоль мышей WT и GPR174-КО, подвергнутых инокуляции клеток мышинной карциномы ободочной кишки CT26.cl25 на сутки 0 и обработке антителом против GITR на сутки 7 и 9. Как показано на ФИГУРЕ 60, мыши GPR174-КО имели более высокий процент выживаемости (т.е., были подвергнуты эвтаназии значимо позже) чем мыши WT ($p=0,03$, логарифмический ранговый критерий).

ФИГУРА 61А и ФИГУРА 61В графически иллюстрируют рост опухолей у индивидуальных мышей WT (ФИГ. 61А) и GPR174-КО (ФИГ. 61В), подвергнутых инокуляции клеток мышинной карциномы ободочной кишки CT26.cl25 на сутки 0 и обработке антителом против GITR на сутки 7, 9 и 14.

Как показано на ФИГУРЕ 61В, рост опухоли в среднем был замедлен у мышей GPR174-КО, по сравнению с мышами WT (ФИГУРА 61А).

ФИГУРА 62 графически иллюстрирует процент выживаемости несущих опухоль мышей WT и GPR174-КО, подвергнутых инокуляции клеток мышинной карциномы ободочной кишки CT26.cl25 на сутки 0 и обработке антителом против GITR на сутки 7, 9 и 14.

Как показано на ФИГУРЕ 62, мыши GPR174-КО имели более высокий процент выживаемости (т.е., были подвергнуты эвтаназии значимо позже) чем мыши WT.

Обсуждение

В этих экспериментах, целью авторов настоящего изобретения являлось определение того, вызывают ли у мышей с недостаточностью GPR174 более агрессивные противоопухолевые иммунные ответы, когда Т-рег клетки частично истощали с использованием антитела против GITR DTA-1. Как показано на ФИГУРАХ 59А-62, рост опухоли мышинной карциномы ободочной кишки CT26.cl25 замедляли у мышей GPR174-КО, по сравнению с одноплетными животными WT, и выживаемость значимо улучшалась.

ПРИМЕР 25

В этом примере описаны эффекты генетической недостаточности GPR174 на рост меланомы B16F10 у мышей, обработанных с использованием истощающего регуляторные Т-клетки (Т-рег) антитела против GITR.

В модели опухоли меланомы B16F10, ранее наблюдали, что однократная высокая доза антитела против GITR, введенная на сутки 4, приводила к замедлению роста опухоли, но не к полному отторжению опухоли у всех мышей (Zapposodi R. et al., *Nature Medicine* 25:759-766, 2019). С учетом результатов, описанных в примере 24, проводили следующее исследование для определения того, может ли временное истощение Т-рег с использованием антитела против GITR может замедлять рост опухоли и улучшать выживаемость мышей GPR174-КО, по сравнению с мышами WT, после инокуляции более

агрессивной опухоли: меланомы B16F10.

Меланома B16F10 происходит из линии мышей C57BL/6. Мышей GPR174-KO получали, как описано в примере 7. Поскольку GPR174 находится на X-хромосоме, авторы настоящего изобретения являлись способными использовать самцов мышей WT и GPR174-KO с C57BL/6-толерантной иммунной системой посредством скрещивания самок 129S GPR174-KO с самцами C57BL/6. Однопометным самцам WT или GPR174-KO (n=12) [C57BL/6×129S] F1 инокулировали внутрикожно 75000 клеток B16F10-Kb (клеток B16F10, трансфицированных с использованием H-2Kb для увеличения представления антигена CD8 T-клеткам) на сутки 0. (см. Ohta A. et al., *PNAS* 103(35):13132-13137, 2006). На сутки 4 и 14, всем мышам вводили внутривентральные инъекции 500 мкг антитела против GITR (клон DTA-1; Bio-X-Cell). Объем опухоли рассчитывали посредством уравнения (длина × ширина²)/2), и мышей с опухолями с измерениями >1500 мм³ подвергали эвтаназии.

ФИГУРА 63А и ФИГУРА 63В графически иллюстрируют рост опухолей меланомы B16F10-Kb у индивидуальных мышей WT (ФИГ. 63А) и GPR174-KO (ФИГ. 63В), подвергнутых инокуляции клеток B16F10-Kb на сутки 0 и обработке антителом против GITR на сутки 4 и 14.

Как показано на ФИГУРЕ 63В, недостаточность GPR174 замедляла рост опухоли по сравнению с ростом опухоли у мышей WT (ФИГУРА 63А). Средние размеры опухолей были значимо меньше у мышей КО на сутки 14 (p=0,01) и 16 (p=0,00005).

ФИГУРА 63С графически иллюстрирует средний объем опухоли для опухолей меланомы B16F10-Kb у мышей WT и GPR174-KO, подвергнутых инокуляции клеток B16F10-Kb на сутки 0 и обработке антителом против GITR на сутки 4 и 14. Как показано на ФИГУРЕ 63С, средние размеры опухолей были значимо меньше у мышей GPR174 КО на сутки 14 («*» обозначает: p=0,01) и 16 («***» обозначает: p=0,00005).

ФИГУРА 64 графически иллюстрирует процент выживаемости несущих опухоль меланому B16F10-Kb мышей WT и GPR174-KO, подвергнутых инокуляции клеток B16F10-Kb клетки на сутки 0 и обработке антителом против GITR на сутки 4 и 14. Как показано на ФИГУРЕ 64, мыши GPR174-KO имели более высокий процент выживаемости (т.е., были подвергнуты эвтаназии значимо позже) чем мыши WT (p=0,006, логарифмический ранговый критерий).

Обсуждение

Как показано в этом примере, в модели меланомы B16F10, недостаточность GPR174 приводила к значимому ослаблению роста опухоли и продлению выживаемости после обработки антителом против GITR. Поскольку ослабляющие T-рег виды терапии (т.е., средства, которые истощают, ослабляют или иным образом повреждают T-рег клетки), в настоящее время находятся в разработке в качестве иммунотерапевтического средства против злокачественных опухолей, данные авторов настоящего изобретения позволяют предполагать, что ингибитор GPR174 может являться более эффективным в присутствии такой совместной терапии. Лекарственные средства, которые ослабляют T-рег или

одновременно ослабляют Т-рег и усиливают активность уничтожения опухоли другими Т-клетки и/или НК-клетками, включают антитела или другие молекулы, привлекающие один или несколько из следующего: GITR, CTLA-4, CD25, LAG3, TIGIT, NRP1, TGF- β , CCR2, CCR4, CCR8, TNFR2 и/или EZH2, такие, как описано, например, в Tanaka A and Sakaguchi S, *European Journal of Immunology* vol 49(8):1140-1146, 2019; Yano H. et al., *Immunology* vol 157(3): 232-247, 2019; Ohue Y and Nishikawa H., *Cancer Science* vol 110(7):2080-2089, 2019; Han S. et al., *Front Oncol* vol 9, Article 279, 2019, содержание каждого из которых, таким образом, приведено в качестве ссылки.

Соответственно, в одном варианте осуществления настоящего изобретения, ингибирующее GPR174 средство используют в комбинации с одним или несколькими ослабляющими Т-рег средством(средствами) (т.е., средства, которые истощают, ослабляют или иным образом нарушают функцию супрессора опухолей Т-рег клеток). В некоторых вариантах осуществления, ослабляющее Т-рег средство связывается с одним или несколькими из GITR, CTLA-4, CD25, LAG3, TIGIT, NRP1, TGF- β , CCR2, CCR4, CCR8, TNFR2 и/или EZH2.

Иллюстративные ослабляющие Т-рег средства для использования в комбинации с ингибиторами GPR174 в композициях, способах и применениях, описанных в настоящем описании представлены ниже:

Связывающие GITR средства, которые можно использовать в комбинации с ингибиторами GPR174 в композициях, способах и применениях, описанных в настоящем описании, включают антитела против GITR и малые молекулы, которые связывают GITR, например, такие как: TRX518, ДТА-1 и МК-4166.

Связывающие CTLA-4 (ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами белок 4), которые можно использовать в комбинации с ингибиторами GPR174 в композициях, способах и применениях, описанных в настоящем описании, включают антитела против CTLA-4 и малые молекулы, которые связывают CTLA-4, например, такие как ипилимумаб (Bristol-Myers Squibb); тремелиумаб (MedImmune); AGEN1884 (Agenus); BCD-145 (Biocad); REGN4659 (Regeneron Pharmaceuticals); ADU-1604 (Aduro Biotech); и CS1002 (CStone Pharmaceuticals).

Связывающие CD25 средства, которые можно использовать в комбинации с ингибиторами GPR174 в композициях, способах и применениях, описанных в настоящем описании, включают антитела против CD25 и малые молекулы, которые связывают CD25, например, такие как даклизумаб; базиликсимаб и нацеленный на CD25 NIR-PIIT.

Связывающие TIGIT (Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM) средства, которые можно использовать в комбинации с ингибиторами GPR174 в композициях, способах и применениях, описанных в настоящем описании, включают антитела против TIGIT и малые молекулы, которые связывают TIGIT например, такой как, МК-7684 (Merck Sharp & Dohme); AB154 (Arcus Biosciences); MTIG7192A (Genentech); BMS-986207 (Bristol-Myers Squibb); и ASP8374 (Astellas Pharma).

Связывающие NRP1 (нейропипин 1) средства, которые можно использовать в комбинации с ингибиторами GPR174 в композициях, способах и применениях, описанных в настоящем описании включают против NRP1 антитела и малые молекулы, которые связывают NRP1 например, такие как ASP1948 (Astellas Pharma).

Связывающие TGF- β средства, которые можно использовать в комбинации с ингибиторами GPR174 в композициях, способах и применениях, описанных в настоящем описании, включают антитела против TGF- β и малые молекулы, которые связывают TGF- β , например, такие как Galunisertib (Eli Lilly); LY320082 (Eli Lilly); PF-06952229 (Pfizer) и Fresolimumab (Cambridge Antibody Technology).

Связывающие LAG-3 средства, которые можно использовать в комбинации с ингибиторами GPR174 в композициях, способах и применениях, описанных в настоящем описании, включают антитело против LAG-3 антитела и малые молекулы, которые связывают LAG-3 например, такой как, Sym022 (Symphogen); релатлимаб (Bristol-Myers Squibb); REGN3767 (Regeneron Pharmaceuticals); TSR-033 (Tesarо); IMP321 (Immutep); INCAGN02385 (Agenus); LAG525 (Novartis); и MK4280 (Merck Sharp & Dohme).

Связывающие CCR2 средства, которые можно использовать в комбинации с ингибиторами GPR174 в композициях, способах и применениях, описанных в настоящем описании, включают антитела против CCR2 и малые молекулы, которые связывают CCR2, например, такие как BMS-813160 (Bristol-Myers Squibb), MLN1202 (Millennium Pharmaceuticals), C775, STI-B0201, STI-B0211, STI-B0221, STI-B0232, карлумаб (CNTO 888; Centocor, Inc.) или STI-B0234.

Связывающие CCR4 средства, которые можно использовать в комбинации с ингибиторами GPR174 в композициях, способах и применениях, описанных в настоящем описании, включают антитела против CCR4 и малые молекулы, которые связывают CCR4 например, такие как могамулизумаб (Kyowa Kirin), N-[(3-{[3-{{(5-хлор-2-тиенил)сульфонил}амино}-4-(метилокси)-1H-индазол-1-ил]метил}фенил)метил]-2-гидрокси-2-метилпропанамид, которые описаны в Международной публикации WIPO WO2010/097395 и Публикации патента США No. 20100216860.

Связывающие CCR8 средства, которые можно использовать в комбинации с ингибиторами GPR174 в композициях, способах и применениях, описанных в настоящем описании, включают антитела против CCR8 и малые молекулы, которые связывают CCR8 например, такие как в US10087259.

Связывающие TNFR2 средства, которые можно использовать в комбинации с ингибиторами GPR174 в композициях, способах и применениях, описанных в настоящем описании, включают антитела против TNFR2 и малые молекулы, которые связывают TNFR2, например, такие как в Vanamee E and Faustman D, Trends in Molecular Medicine vol 23, Issue 11:1037-1046, 2017, содержание которого приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

Связывающие EZH2 (энхансер гомолога 2 zeste) средства, которые можно

использовать в комбинации с ингибиторами GPR174 в композициях, способах и применениях, описанных в настоящем описании, включают антитела против EZH2 и малые молекулы, которые связывают EZH2 например, такие как UNC1999, 3-деазанепланонин А (DZNcp), EI1, EPZ-5676, EPZ-6438, GSK343, EPZ005687, EPZ011989 и GSK126.

Кроме того, принимая во внимание обнаружение авторов настоящего изобретения с использованием комбинированного ингибирования A2aR/A2bR и GPR174, как описано в примерах 15 и 18-23, оптимальным способом для пациентов с злокачественными опухолями, может являться ингибирование как пути аденозина, так и GPR174 в присутствии одного или нескольких T-рег-ослабляющих средств. Такой способ может обеспечивать, чтобы индуцированный ингибитором A2aR/A2bR/GPR174 IL-2 действовал больше на реакционноспособные по отношению к опухоли эффекторные T-клетки, чем на T-рег.

ПРИМЕР 26

В этом примере описаны эффекты PS-липосом и ингибитора GPR174 на ответы T-клеток человека и мыши при выделении, а не в присутствии тотальных PBMC или спленоцитов.

В примерах, представленных выше, ингибирование GPR174 проводили в культурах PBMC или спленоцитов мыши, где клетки рассеивали при высокой плотности (1 миллион на лунку 96-луночного плоскодонного планшета). В этих условиях, PS считали присутствующим на высоком уровне, поскольку ингибиторы GPR174 являлись активными в отсутствие дополнительных PS-липосом, и поскольку дополнение 1 мкМ PS в форме липосом не изменяет очень сильно ответы T-клеток или ответы на ингибитор GPR174. В отличие от этого, в культурах из низких количеств очищенных T-клеток, GPR174 может не подвергаться воздействию PS до такой же степени. Таким образом, как описано в этом примере, авторы настоящего изобретения исследовали, супрессируют ли PS-липосомы ответы очищенных T-клеток человека и мыши, и может ли ингибитор GPR174 обращать эту супрессию. Кроме того, авторы настоящего изобретения оценивали специфичность этих эффектов посредством сравнения ответов в T-клетках мыши WT и GPR174-KO.

В дополнение к PS-липосомам, авторы настоящего изобретения тестировали экзосомы опухолей по их способности стимулировать GPR174. Экзосомы опухолей (также обозначенные как происходящие из клеток злокачественной опухоли экзосомы) представляют собой небольшие везикулы, которые высвобождаются в высоких количествах из клеток опухолей и которые являются обогащенными в подвергнутых воздействию PS (см. Kelleher R.J. et al., *Cancer Immunology Research* Vol 3(11):1269-78, 2015; Birge R.B. et al., *Cell Death & Differentiation* Vol 23:962-978, 2016). Считают, что экзосомы опухолей играют роль в связанной с злокачественными опухолями иммуносупрессии, таким образом, авторы настоящего изобретения выдвинули гипотезу, что они могут супрессировать противоопухолевый иммунитет, частично, посредством их активности по отношению к GPR174.

Очищенные Т-клетки человека (Astarte Biologics, Inc) активировали в присутствии клеток K562 (искусственных антигенпредставляющих клеток), представляющих антитело против CD3 и CD80.Fc посредством связывания Fc-рецептора, в 96-луночных планшетах с U-образным дном, содержащих среды X-vivo-15, в следующих условиях:

50000 Т-клеток на лунку

10000 клеток K562 на лунку

Антитело против CD3 (клон UCHT1; 0,5 мкг/мл)

CD80.Fc слитый белок (R&D Systems; 2 мкг/мл)

PS-липосомы (1 мкМ)

Экзосомы из линии клеток опухоли рака молочной железы MDA-MB-231 (12 мкг/мл) (EXOP-105A-1 от System Biosciences, LLC)

Ингибитор GPR174 (соединение 10, 0,5 мкМ или 3 мкМ)

Клетки культивировали в течение 24 часов, и в супернатантах оценивали концентрации цитокинов (Legendplex, Biolegend).

Получение очищенных Т-клеток мыши:

Т-клетки мыши (набор для выделения необработанных пан-Т-клеток Stemcell) от мышей WT или GPR174-КО культивировали в средах X-vivo-15 в 96-луночных плоскодонных планшетах, предварительно покрытых 50 мкг/мл антитела козы против IgG хомяка (Jackson Immunochemicals) в следующих условиях:

100000 Т-клеток на лунку

Антитело против CD3 (клон 2C11; 0,01 мкг/мл)

Антитело против CD28 (клон 37,51; 0,1 мкг/мл)

PS-липосомы (1 мкМ)

Ингибитор GPR174 (соединение 10, 1 мкМ)

Клетки культивировали в течение 24 часов, и в супернатантах оценивали концентрации цитокинов (LegendPlex, Biolegend).

ФИГУРА 65 графически иллюстрирует концентрации IL-2 в культурах стимулированных Т-клеток человека в присутствии или в отсутствие PS-липосом (PSL) или ингибитор GPR174 (соединение 10, 3 мкМ).

Как показано на ФИГУРЕ 65, PS-липосомы супрессируют продукцию IL-2 (в 0,55 раз, $p=4 \times 10^{-4}$), в то время как ингибирующее GPR174 соединение 10 обращает эту супрессию (в 2,4 раз, $p=3 \times 10^{-4}$). В отличие от этого, в отсутствие PS-липосом, соединение 10 только увеличивает продукцию IL-2 в 1,3 раз ($p=0,01$).

ФИГУРЫ 66А, В и С графически иллюстрируют концентрацию IL-2 (ФИГ. 66А), IFN- γ (ФИГ. 66В) и TNF (ФИГ. 66С) в культурах стимулированных Т-клеток человека в присутствии или в отсутствие PS-липосом, экзосом опухолей, или ингибирующего GPR174 соединения (соединения 10, 0,5 мкМ). Как показано на ФИГУРАХ 66А, В и С, происходящие из опухоли рака молочной железы человека экзосомы являлись более эффективными, чем PS-липосомы, для вызова индуцирующих цитокины ответов

посредством ингибирования GPR174. Увеличение количества IL-2 (ФИГ. 66А), IFN- γ (ФИГ. 66В) и TNF (ФИГ. 66С) в присутствии сред, PS-липосом или экзосом обобщено ниже в таблице 16. Хотя экзосомы не супрессировали продукцию цитокинов, как PS-липосомы, экзосомы могут также иметь иммуностимулирующие белки, которые противодействуют их опосредованной PS супрессии. Таким образом, супрессивные эффекты ассоциированного с экзосомой PS и гипотетические стимулирующие эффекты других ассоциированных с экзосомой признаков совместно приводят к незначительным суммарным изменениям продукции цитокинов, и добавление ингибитора GPR174 нейтрализует эффекты PS, с получением в результате суммарного увеличения продукции цитокинов выше того, которое наблюдают без экзосом.

Таблица 16: Обобщение продукции IL-2, IFN- γ и TNF в присутствии сред, PS-липосом или экзосом, как показано на ФИГ. 66А-С

Соединение 10 против носителя, в присутствии:	IL-2		IFN- γ		TNF	
	FC	значение p	FC	значение p	FC	значение p
Среды	1,2	3,3E-03	1,1	ns	1,4	1,3E-05
PS-липосомы	1,4	1,6E-05	1,3	7,3E-03	1,7	9,0E-07
Экзосомы	1,7	4,2E-04	1,4	1,5E-04	1,7	3,1E-06

FC, кратность изменения; значение p, Т-критерий, 2-сторонний, равные дисперсии; ns, не значимо

ФИГУРА 67 графически иллюстрирует кратность изменения уровней IL-2, по сравнению с носителем, в культурах стимулированных WT или GPR174-КО Т-клеток мыши в присутствии или в отсутствие PS-липосом (PSL) или ингибитора GPR174 (соединения 10, 1 мкМ).

Как показано на ФИГУРЕ 67, PS-липосомы супрессируют продукцию IL-2 только из GPR174 WT Т-клеток (WT: в 0,19 раз, $p=8 \times 10^{-4}$; КО: в 1,8 раз, $p=0,04$). Кроме того, соединение 10 обращает опосредованную PS-липосомой супрессию в WT Т-клетках (в 3,5 раз, $p=5 \times 10^{-4}$), в то же время не оказывая эффекта on GPR174-КО Т-клетки (0,9 раз, $p=0,6$). Как отмечено выше, PS-липосомы немного увеличивали уровни IL-2 в GPR174-КО Т-клетках. Это может быть обусловлено действием PS на другие рецепторы lyso-PS, которые не сопряжены с Gas, такие как P2Y10 и GPR34, и которые могут усиливать, а не супрессировать продукцию цитокинов.

Результаты, описанные в этом примере, с использованием очищенных Т-клеток человека и мыши, установили, что PS-липосомы супрессируют ответы Т-клеток специфически посредством GPR174, что ингибирующее GPR174 соединение 10 обращает эту супрессию, и что соединение 10 имеет незначительный эффект в отсутствие PS или GPR174. Кроме того, результаты в этом примере показывают, что происходящие из клеток опухоли экзосомы стимулируют GPR174, и ингибирование GPR174 в присутствии экзосом увеличивает уровни Th1-цитокинов до большей степени, чем в присутствии PS-липосом. Таким образом, обращение опосредованной происходящими из клеток опухоли экзосомами

иммуносупрессии с использованием ингибитора GPR174 может играть роль в его противоопухолевой эффективности. Кроме того, поскольку известно, что экзосомы опухолей (т.е., происходящие из клеток злокачественной опухоли экзосомы) мигрируют по всему организму пациента и стимулируют метастазирование опухоли (см. Wu M et al., *Molecular Cancer*, 18:53, 2019), ингибитор GPR174 может усиливать противоопухолевые иммунные ответы в дренирующих опухоль лимфатических узлах, так же как уменьшать образование и рост метастазов.

ПРИМЕР 27

В этом примере описаны эффекты на ответы Т-клеток мыши недостаточности GPR174 и ингибирования GPR174 при комбинации с низкомолекулярными модуляторами рецепторов аденозина A2a/A2b, с использованием культур тотальных спленоцитов мыши.

Как GPR174, так и рецепторы аденозина A2a/A2b, передают сигнал через путь Gas/cAMP, который супрессирует активацию Т-клетки. С использованием РВМС человека, авторы настоящего изобретения наблюдали, что ингибирование обеих осей приводило к синергическому усилению продукции Th1-цитокинов, как описано в примерах 15 и 18-22 в настоящем описании. Как описано в этом примере, авторы настоящего изобретения расширили эти наблюдения с использованием спленоцитов мыши WT и мыши с недостаточностью GPR174. Передача сигналов GPR174 и рецептора аденозина преимущественно супрессирует продукцию IL-2 из спленоцитов мыши, таким образом, в настоящем описании, авторы настоящего изобретения представили только уровни IL-2 для этих экспериментов.

Для получения суспензии отдельных клеток из спленоцитов мыши, селезенки разрезали на куски 1-2 мм³ с использованием лезвия бритвы и инкубировали при 37°C с использованием 10 мкг/мл ДНКазы и 1 мг/мл коллагеназы D с встряхиванием в течение 90 мин. Фрагменты и клетки селезенки затем продавливали через нейлоновую сетку, и полученную суспензию клеток промывали. В 96-луночных плоскодонных планшетах, спленоциты культивировали в четырех репликах с использованием следующих условий в течение 2 суток, после чего в супернатантах тестировали уровни цитокинов с использованием платформы MSD.

1000000 спленоцитов на лунку

Антитело против CD3 (клон 2C11; 0,1 мкг/мл)

Антитело против CD28 (клон 37.51; 0,1 мкг/мл)

Ингибитор GPR174 (соединение 10, 1 мкМ или 0,3 мкМ, или контрольный носитель DMSO)

Ингибитор GPR174 (соединение 6, 0,3 мкМ или контрольный носитель DMSO)

Агонист рецептора аденозина (NECA, 0,1 мкМ)

Антагонист рецептора аденозина A2a/A2b (ZM-241385, 0,1 мкМ или 0,2 мкМ, или контрольный носитель DMSO)

ФИГУРА 68А и ФИГУРА 68В графически иллюстрируют эффекты антагониста

рецептора аденозина A2a/A2b ZM-241385 (0,1 мкМ), ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ), или обоих соединений (ZN-241385 плюс соединение 10) на уровни IL-2 в супернатантах культивированных спленоцитов, выделенных от n=3 мышей WT (ФИГ. 68А) или n=3 однопометных мышей GPR174-КО (ФИГ. 68В) после 2 суток стимуляции антителом против CD3 и антителом против CD28.

Как показано на ФИГУРЕ 68А, соединение 10 увеличивало уровни IL-2 более чем в 4 раза ($p < 10^{-5}$) только в культурах спленоцитов WT, в то время как уровни для контрольного носителя в культурах GPR174-КО (ФИГУРА 68В) были в среднем более чем в 6 выше, чем уровни для культур WT ($p < 10^{-9}$), показывая, что эта активность соединения 10 является специфической для GPR174, и что недостаточность GPR174 фенотипирует активность соединения 10. В отличие от этого, ZM-241385 оказывал умеренный эффект, увеличивающей уровни IL-2 в среднем в 1,3 раз у мышей как WT, так и GPR174-КО ($p < 0,05$). Авторы настоящего изобретения выдвинули гипотезу, что слабый ответ на антагонизм рецептора A2a/A2b был обусловлен низкими уровнями эндогенного аденозина в условиях культивирования. Таким образом, как показано ниже, авторы настоящего изобретения повторили этот эксперимент с использованием спленоцитов WT в присутствии агониста рецептора аденозина NECA.

ФИГУРА 69 графически иллюстрирует эффекты антагониста рецептора аденозина A2a/A2b ZM-241385 (0,2 мкМ), ингибирующего GPR174 соединения 10 (0,3 мкМ) или ингибирующего GPR174 соединения 6 (0,3 мкМ), или ZM-241385 плюс соединение 10, или ZM-241385 плюс соединение 6 на уровни IL-2 в супернатантах культивированных спленоцитов, выделенных от 3 мышей WT после 2 суток стимуляции антителом против CD3 и антителом против CD28 в присутствии агониста рецептора аденозина NECA (0,1 мкМ).

Как показано на ФИГУРЕ 69, оба ингибирующих GPR174 соединения 10 и 6 увеличивали уровни IL-2 в 2-3 раза ($p < 0,05$). Когда NECA включали в культуру, ZM-241385 увеличивало уровни IL-2 в среднем в 2 раза, в отсутствие или в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10 или 6 ($p < 0,01$).

ФИГУРА 70А и 70В графически иллюстрируют эффекты антагониста рецептора аденозина A2a/A2b ZM-241385 (0,2 мкМ), ингибирующего GPR174 соединения 10 (0,3 мкМ) или соединения 6 (0,3 мкМ), или ZM-241385 отдельно или в комбинации с любым ингибирующим GPR174 соединением на уровни IL-2 в супернатантах культивированных спленоцитов, выделенных от 3 мышей WT (ФИГ. 70А) и 3 мышей GPR174-КО (ФИГ. 70В) после 2 суток стимуляции антителом против CD3 и антителом против CD28 в присутствии агониста рецептора аденозина NECA (0,1 мкМ).

Как показано на ФИГУРЕ 70А, в спленоцитах WT с использованием ZM-241383 уровни IL-2 увеличивали в 2,3-2,6 раз ($p < 0,01$), и ингибирующие GPR174 соединения 10, и 6 увеличивали уровни IL-2 в 1,7-2,0 раз ($p < 0,02$). В отличие от этого, ZM в комбинации с ингибирующим GPR174 соединением 10 увеличивало уровни IL-2 в 5,7-6,7 раз ($p < 0,001$), и

ZM в комбинации с ингибирующим GPR174 соединением 6 увеличивало уровни IL-2 в 4,9-5,9 раз, показывая синергическое усиление продукции IL-2, когда как A2aR/A2bR, так и GPR174, ингибировали в присутствии NECA.

В соответствии с этой моделью синергизма, как показано на ФИГУРЕ 70B, ZM-241385 являлось более эффективным с использованием спленоцитов GPR174-KO, увеличивая уровни IL-2 в 3,5-4,1 раз ($p < 0,001$). Как ожидали, ингибирующие GPR174 соединения не являлись активными в спленоцитах GPR174-KO, за исключением умеренной нецелевой активности с использованием соединения 6 в 2 из 3 культур спленоцитов (KO1 и KO2, $p < 0,05$).

В культурах спленоцитов мыши, как ингибирование GPR174, так и недостаточность GPR174, заметно увеличивало продукцию IL-2, в то время как ингибиторы GPR174 являлись неактивными в спленоцитах GPR174-KO. Когда рецепторы аденозина проявляли агонизм с NECA, ингибирование двух путей проявляло синергизм для усиления продукции IL-2, то есть уровни, достигаемые с обоими ингибиторами, превышали сумму увеличений, наблюдаемых с каждым ингибитором отдельно. Кроме того, недостаточность GPR174 фенокопировала эффекты ингибиторов GPR174, как отдельно, так и в присутствии ингибитора A2aR/A2bR, обеспечивая дополнительную поддержку для способности двух путей действовать синергически для регуляции продукции IL-2. Поскольку ингибиторы GPR174 являются обращаемыми эффектами передачи сигналов эндогенного PS в этих культурах спленоцитов, небольшие различия в амплитуде эффектов ингибиторов GPR174 могут возникать в результате от изменчивости между экспериментами в воздействии PS на GPR174, потенциально, происходящей от небольших различий в составах и состояниях активации клеток, которые сложно контролировать.

ПРИМЕР 28

В этом примере описаны комбинированные эффекты ингибитора GPR174 и двух ингибиторов оси аденозина на индукцию IL-2 в культивированных PBMC человека.

Внеклеточный аденозин образуется преимущественно под действием ферментов, которые удаляют фосфаты из внеклеточного АТФ, который высвобождается из активированных или умирающих клеток. Эктонуклеотидазы CD39 и CD73 отщепляют первые 2 и 3-й фосфаты от АТФ, соответственно, оставляя аденозин для активации рецепторов аденозина. В этом примере, авторы настоящего изобретения старались определить, может ли ингибирование CD73 оказывать такой же эффект на культуры PBMC, как ингибирование A2aR/A2bR, и может ли ингибирование как CD73, так и A2a/A2b проявлять синергизм с ингибированием GPR174 в усилении ответа Т-клеток.

PBMC человека, полученные от добровольного донора-человека (донора 8), распределяли в средах X-vivo15 (Lonza), дополненных Glutamax, пенициллином и стрептомицином, при плотности 1×10^6 клеток/лунку в 96-луночном плоскодонном планшете и культивировали в четырех репликах в течение 3 часов в присутствии:

Ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ);

Ингибирующего A2aR/A2bR соединения ZM-241385 (0,1 мкМ);

Ингибирующего CD73 соединения: натриевой соли аденозин-5'-(α,β -метилен)дифосфата (APCP, Tocris, 10 мкМ);

Комбинаций вышеуказанных средств;
контрольного носителя (DMSO).

После этого 1 мкг/мл антитела против CD3 (UCHT1) и 0,1 мкг/мл антитела против CD28 (CD28.2) добавляли для активации Т-клеток. Супернатанты из этих клеток собирали через 24 часа после стимуляции, и уровни IL-2 определяли посредством ELISA.

ФИГУРА 71 графически иллюстрирует уровни IL-2 в супернатантах PBMC, стимулированных антителом против CD3 и антителом против CD28 в присутствии указанных соединений.

Как показано на ФИГУРЕ 71, ингибирование GPR174 с соединением 10 увеличивало уровни IL-2 в 1,4 раз, и ингибирование оси аденозина с использованием ZM-241385 или APCP увеличивало уровни IL-2 в 1,4 и 1,5 раз, соответственно ($p < 0,05$ для каждого). Комбинация ингибирующего GPR174 соединения 10 с использованием либо ZM-241385, либо APCP, увеличивало IL-2 в 2,5 раз ($p < 0,001$).

Результаты, показанные в этом примере, демонстрируют, что как ингибитор A2aR/A2bR (ZM-241385), так и ингибитор CD73 (APCP) увеличивали уровни IL-2 в одинаковой степени, либо отдельно, либо в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10. Кроме того, степень индукции IL-2 с использованием комбинированного ингибирования GPR174 и оси аденозина превышала сумму увеличений, полученных с использованием каждого ингибитора отдельно, показывая, что ингибирование оси аденозина с использованием любого ингибитора проявляло синергизм с ингибитором GPR174 для увеличения продукции IL-2.

ПРИМЕР 29

В этом примере описана супрессия продукции цитокинов из очищенных Т-клеток человека посредством PS-липосом, агониста рецептора аденозина NECA и комбинации обоих.

Если, в микроокружении опухолей, иммуносупрессию из-за высокой степени воздействия как аденозина, так и PS, невозможно преодолеть, если только не ингибированы как рецепторы аденозина A2aR/A2bR, так и GPR174, тогда из этого следует, что воздействие аналога аденозина NECA и PS-липосом совместно должно супрессировать Т-клетки *in vitro* до степени, сходной с супрессией, достигаемой с любым ингибитором отдельно. В этом примере, авторы настоящего изобретения тестировали эту гипотезу с использованием концентраций NECA и PS, обеспечивающих полный агонизм рецептора, по их способности супрессировать продукцию IL-2 из очищенных Т-клеток человека.

Очищенные Т-клетки человека (необработанные тотальные Т-клетки, Astarte Biologics, Inc.; CD3+ Т-клетки на фигурах 72А и 72В, и CD8+ Т-клетки на ФИГУРЕ 72С) стимулировали в четырех репликах при 100000 клеток на лунку в 96-луночных

плоскодонных планшетах и средах X-vivo 15 с использованием следующих реагентов:

Активатор CD3/CD28 Т-клеток человека ImmunoCult™ (StemCell) (разведение 1:50)

PS-липосомы (1 мкМ) или контрольные среды

Агонист рецептора аденозина (NECA, 0,1 мкМ или 0,05 мкМ) или контрольные среды

Комбинация обоих реагентов.

Через 24 часа культивирования (44 часа для результатов, показанных на ФИГУРЕ 72С), в культуральных средах анализировали цитокины (MesoScale Discovery).

Результаты

ФИГУРЫ 72А и 72В графически иллюстрируют супрессию продукции IL-2 (ФИГ. 72А) и IFN- γ (ФИГ. 72В) из очищенных Т-клеток посредством PS-липосом и NECA, отдельно или вместе. Для культур CD8 Т-клеток (ФИГУРА 72С), включены указанные концентрации ZM-241385 и соединения 10.

Как показано на ФИГУРАХ 72А, 72В и 72С, и обобщено ниже в таблице 17, как PS, так и NECA супрессируют цитокин почти до такой же степени, как супрессия, достигаемая с использованием обоих вместе.

Таблица 17: Обобщение продукции IL-2 и IFN- γ в различных условиях, показанных на ФИГУРАХ 72А и 72В

	IL-2		IFN- γ	
	FC	значение p	FC	значение p
PS против сред	0,51	3,0E-04	0,41	7,8E-04
NECA против сред	0,42	1,0E-04	0,31	4,6E-04
PS +NECA против сред	0,34	5,3E-05	0,27	2,6E-04

FC, кратность изменения; p, значение p для Т-критерия, 2-стороннего, равные дисперсии.

Эти обнаружения дополнительно поддерживают модель, что, в присутствии высоких степеней агонизма GPR174 и A2aR/A2bR, ингибирование обоих путей является необходимым для освобождения Т-клеток от опосредованной cAMP супрессии. Эта гипотеза поддерживается обнаружением, что супрессия, достигаемая с использованием NECA или PS-липосом отдельно, являлась почти такой же сильной, как супрессия, наблюдаемая с использованием комбинации обоих агонистов. Это позволяет предполагать, что как GPR174, так и A2aR/A2bR подпитывают один и тот же компартмент cAMP; или что их индивидуальные компартменты cAMP могут полностью привлекать опосредованную cAMP супрессию продукции цитокинов; и, чтобы эффективно нейтрализовать эту супрессию в присутствии PS/lysoPS и аденозина, как GPR174, так и A2aR/A2bR необходимо ингибировать.

В общем, как показано в настоящем описании, GPR174 представляет собой рестрицированный иммунной системой сопряженный с Gas GPCR, и PS, экспонированный на липосомах и клеточных мембранах, стимулирует GPR174, поддерживая модель

активной опосредованной GPR174 иммуносупрессии в микроокружении опухолей. В условиях, когда присутствуют как PS/lysoPS, так и аденозин, ингибирование обеих осей является необходимым для эффективного восстановления функции Т-клетки (например, по-видимому, обращение опосредованной PS+NECA супрессии продукции IFN- γ из CD8 Т-клеток человека требует синергической активности ZM и соединения 10; см. ФИГУРУ 72С). Как далее показано в настоящем описании, недостаточность GPR174 усиливает противоопухолевые иммунные ответы у мышей.

Как описано в настоящем описании, внеклеточный фосфатидилсерин (PS) является сильным модулятором иммунных ответов. Различные скрамблазы фосфолипидов отвечают на различные клеточные процессы для экспонирования PS либо в ходе апоптоза, либо в ходе активации множества типов клеток, включая тромбоциты, лимфоциты, эндотелиальные клетки и клетки опухолей. В то время как хорошо известно, что PS, экспонированный в ходе апоптоза, супрессирует воспалительные ответы в фагоцитах в ходе эффероцитоза, широко не исследовали, может ли любая форма экспонированного PS действовать напрямую на Т-лимфоциты. Как описано в настоящем описании, авторы настоящего изобретения показывают, что PS супрессирует Т-клетки посредством GPR174, сопряженного с G α s GPCR, ранее описанного как рецептор для лизофосфатидилсерина (lysoPS), растворимого катаболита PS. PS-липосомы, как обнаружено, являются в 5х более активными, чем lysoPS, в стимуляции зависимого от GPR174 образования cAMP, и PS, экспонированные на апоптотических клетках, тромбоцитах и активированных Т-клетках, все индуцировали передачу сигналов GPR174 в репортерной линии клеток. В соответствии с хорошо описанным иммуносупрессивным характером передачи сигналов cAMP, PS-липосомы супрессировали продукцию IL-2 Т-клетками человека и продукцию IL-2 у мышей из Т-клеток WT, но не GPR174-KO. Эффективно используя скрининг новой библиотеки модулирующих GPCR химических соединений, авторы настоящего изобретения идентифицировали многочисленные ингибиторы GPR174, перекрывающие множество химических классов, и ингибитор GPR174 обращал опосредованную PS-липосомой супрессию Т-клеток человека и Т-клеток WT мыши, в то время как не оказывал эффекта на Т-клетки GPR174-KO мыши. В модели сингенной опухоли на мышах, недостаточность GPR174 значимо увеличивала контроль роста опухоли в присутствии субоптимальной совместной терапии антителом против GITR. Во многих отношениях, GPR174 является сходным с рецепторами аденозина A2A/A2B, в том что и те, и другие супрессируют Т-клетки посредством передачи сигналов cAMP в ответ на продукты стресса и гибели клеток, присутствующие на высоком уровне в микроокружении опухолей, и авторы настоящего изобретения обнаружили, что оба пути действуют синергически для сдерживания ответов Т-клеток. В культурах спленоцитов мыши, содержащих эндогенные уровни аденозина и PS, ингибитор A2A усиливал ответы Т-клеток более эффективно в клетках с нокаутом GPR174, чем в клетках WT. В сходных культурах PBMC человека, ингибиторы GPR174 и A2A/A2B, или ингибиторы GPR174 и аденозиндезаминазы,

синергически усиливали продукцию IL-2. Обнаружения авторов настоящего изобретения показывают, что ингибирование как GPR174, так и пути аденозина может являться важным для эффективного преодоления опосредованной сАМР иммуносупрессии в микроокружении опухолей.

ДРУГИЕ ВАРИАНТЫ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

Содержание всех публикаций, патентных заявок и патентов, упомянутых в настоящем описании, приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

Различные модификации и варианты описанных способов, композиций и соединений, по настоящему изобретению очевидны специалисту в данной области без отклонения от объема и содержания настоящего изобретения. Несмотря на то, что описание описано в связи с желательными вариантами осуществления, следует понимать, что описание, как заявлено в формуле изобретения, не должно быть необоснованно ограничено такими конкретными вариантами осуществления. Действительно, различные модификации описанных вариантов осуществления описания, очевидные специалисту в области медицины, иммунологии, фармакологии, онкологии или родственных областях, предназначены для включения в объем настоящего изобретения.

В соответствии с вышеуказанным, настоящее изобретение относится к следующим вариантам осуществления.

1. Способ ингибирования как опосредованного GPR174 пути передачи сигналов, так и по меньшей мере одного из опосредованной АТФ-аденозином-A2aR и/или АТФ-аденозином-A2bR передачи сигналов, и/или ингибитора CD38, CD39 и/или CD73, и/или иммуносупрессии Т-рег в клетке, где указанный способ включает стадии: приведения в контакт клетки, экспрессирующей GPR174 и содержащей опосредованный GPR174 путь передачи сигналов Gs, с ингибирующим GPR174 соединением, и приведение в контакт указанной клетки с по меньшей мере одним ингибитором опосредованной АТФ-аденозином-A2aR и/или ингибитором опосредованной АТФ-аденозином-A2bR передачи сигналов, таким образом, ингибирование как опосредованного GPR174 пути передачи сигналов, так и опосредованной АТФ-аденозином-A2aR и/или A2bR передачи сигналов в указанной клетке, и/или ингибитором CD38, CD39 и/или CD73, и/или ослабляющим Т-рег средством, где ингибиторы приводят в контакт с клеткой одновременно (например, совместно вводят отдельно или вместе), или последовательно в любом порядке, при условии, что эффекты первого введенного ингибитора остаются присутствующими на время введения второго ингибитора или ослабляющего средства.

2. Способ в соответствии с параграфом 1, где указанный GPR174 представляет собой GPR174 человека, имеющий последовательность, указанную как SEQ ID NO:1, или природный вариант GPR174, имеющий по меньшей мере 95% идентичность с SEQ ID NO:1.

3. Способ в соответствии с параграфом 1 или 2, где указанное ингибирующее GPR174 соединение выбрано из группы, состоящей из низкомолекулярного соединения, антитела, которое специфически связывает GPR174, и ингибитора экспрессии.

4. Способ в соответствии с параграфом 1 или 2, где указанное ингибирующее GPR174 соединение представляет собой малую молекулу, такую как синтетическое или полусинтетическое соединение.

5. Способ в соответствии с параграфом 1 или 2, где указанное ингибирующее GPR174 соединение представляет собой антагонист опосредованного GPR174 пути передачи сигналов.

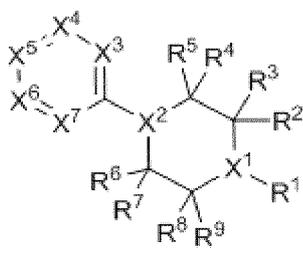
6. Способ в соответствии с параграфом 1 или 2, где указанное ингибирующее GPR174 соединение представляет собой обратный агонист опосредованного GPR174 пути передачи сигналов.

7. Способ в соответствии с параграфом 1 или 2, где указанное ингибирующее GPR174 соединение представляет собой частичный обратный агонист опосредованного GPR174 пути передачи сигналов.

8. Способ в соответствии с параграфом 1 или 2, где указанное ингибирующее GPR174 соединение ингибирует зависимую от LysoPS активацию рецептора GPR174.

9. Способ в соответствии с параграфом 1 или 2, где указанное ингибирующее GPR174 соединение изменяет клеточное распределение рекомбинантного полипептида GPR174, модифицированного для включения сигнала ядерной локализации, по сравнению с клеточным распределением рекомбинантного полипептида GPR174 в отсутствие соединения.

10. Способ в соответствии с параграфом 1 или 2, где указанное ингибирующее GPR174 соединение имеет структуру в соответствии со следующей формулой (I),



(I)

или ее стереоизомером, или ее фармацевтически приемлемой солью, где,

X¹ представляет собой N или CR¹⁰;

X² представляет собой N или CR¹¹;

X³ представляет собой N или CR¹²;

X⁴ представляет собой N или CR¹³;

X⁵ представляет собой N или CR¹⁴;

X⁶ представляет собой N или CR¹⁵;

X⁷ представляет собой N или CR¹⁶;

каждый из R¹, R², R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸ и R⁹ независимо представляет собой H, гидроксигруппу, тиол, необязательно замещенный амин, необязательно замещенный амид, циано, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₂-C₆ алкенил,

необязательно замещенный C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкокси, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилокси, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилокси, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоил, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоилоил, гидроксикарбонил, необязательно замещенный C₂-C₇ алкоксикарбонил, необязательно замещенный карбоксаид, необязательно замещенный C₁-C₆ алканоилокси, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоилоилокси, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфинил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфонил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилсульфинил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилсульфинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклилсульфинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклилсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₆ гетероалкил, необязательно замещенный C₂-C₆ гетероалкенил, необязательно замещенный C₂-C₆ гетероалкинил, необязательно замещенный C₃-C₁₀ циклоалкил, необязательно замещенный C₄-C₁₀ циклоалкенил, необязательно замещенный C₈-C₁₀ циклоалкинил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₂-C₆ алкенил, или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₂-C₆ алкинил, или

R² и R³ объединяются с формированием =O, =S или =NR¹⁷; или

R⁴ и R⁵ объединяются с формированием =O, =S или =NR¹⁷; или

R⁶ и R⁷ объединяются с формированием =O, =S или =NR¹⁷; или

R⁸ и R⁹ объединяются с формированием =O, =S или =NR¹⁷;

каждый из R¹⁰, R¹¹, R¹², R¹³, R¹⁴, R¹⁵ и R¹⁶ независимо представляет собой H, гидроксигруппу, галоген, тиол, необязательно замещенный амин, необязательно замещенный амид, циано, нитро, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкокси, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилокси, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилокси, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоил, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоилоил, гидроксикарбонил, необязательно замещенный C₂-C₇ алкоксикарбонил, необязательно замещенный карбоксаид, необязательно замещенный C₁-C₆ алканоилокси, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоилокси, необязательно

замещенный C_2-C_{10} гетероарилоилокси, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероциклоилоилокси, необязательно замещенный C_1-C_6 алкилсульфинил, необязательно замещенный C_1-C_6 алкилсульфонил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилсульфинил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилсульфонил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилсульфинил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилсульфонил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкинил, необязательно замещенный C_3-C_{10} циклоалкил, необязательно замещенный C_4-C_{10} циклоалкенил, необязательно замещенный C_8-C_{10} циклоалкинил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил C_2-C_6 алкенил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил C_2-C_6 алкинил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил C_2-C_6 алкенил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил C_2-C_6 алкинил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил C_2-C_6 алкенил, или необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил C_2-C_6 алкинил; или

один из:

(i) R^{12} и R^{13} , вместе с атомами, к которым каждый из них присоединен, объединяются с формированием необязательно замещенного 5-, 6- или 7-членного кольца;

(ii) R^{13} и R^{14} , вместе с атомами, к которым каждый из них присоединен, объединяются с формированием необязательно замещенного 5-, 6- или 7-членного кольца;

(iii) R^{14} и R^{15} , вместе с атомами, к которым каждый из них присоединен, объединяются с формированием необязательно замещенного 5-, 6- или 7-членного кольца;

и

(iv) R^{15} и R^{16} , вместе с атомами, к которым каждый из них присоединен, объединяются с формированием необязательно замещенного 5-, 6- или 7-членного кольца;

и

R^{17} представляет собой H, гидроксил, циано, необязательно замещенный амино, необязательно замещенный амидо, необязательно замещенный карбоксамид, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинил, необязательно замещенный C_1-C_6 алканоил, необязательно замещенный C_7-C_{11} арилоил, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероциклоилоил, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероарилоил, необязательно замещенный C_1-C_6 алкилсульфинил, необязательно замещенный C_1-C_6 алкилсульфонил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилсульфинил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилсульфонил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилсульфинил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилсульфонил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкенил, необязательно замещенный C_2-C_6

гетероалкинил, необязательно замещенный C₃-C₁₀ циклоалкил, необязательно замещенный C₄-C₁₀ циклоалкенил, необязательно замещенный C₈-C₁₀ циклоалкинил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₂-C₆ алкенил, или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₂-C₆ алкинил;

где три или менее из X³, X⁴, X⁵, X⁶ и X⁷ представляют собой N; и

по меньшей мере один из X¹ и X² представляет собой N.

11. Способ в соответствии с параграфом 10, где X¹ представляет собой N.

12. Способ в соответствии с параграфом 10 или 11, где X² представляет собой N.

13. Способ в соответствии с любым из параграфов 10-12, где X³ представляют собой CR¹².

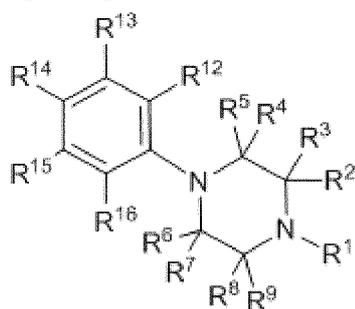
14. Способ в соответствии с любым из параграфов 10-13, где X⁴ представляют собой CR¹³.

15. Способ в соответствии с любым из параграфов 10-14, где X⁵ представляют собой CR¹⁴.

16. Способ в соответствии с любым из параграфов 10-15, где X⁶ представляют собой CR¹⁵.

17. Способ в соответствии с любым из параграфов 10-16, где X⁷ представляют собой CR¹⁶.

18. Способ в соответствии с параграфом 10, где указанное выделенное соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (IA):



(IA)

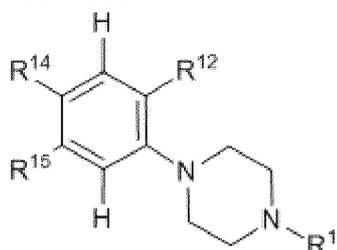
19. Способ в соответствии с любым из параграфов 10-18, где R² представляет собой H, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₃-C₁₀ циклоалкил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил или необязательно

H, галоген, циано, нитро, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₃-C₁₀ циклоалкил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоил, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоилоил, гидроксикарбонил, необязательно замещенный C₂-C₇ алкоксикарбонил или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероцикл.

47. Способ в соответствии с параграфом 46, где R¹⁶ представляет собой H или необязательно замещенный C₁-C₆ алкил.

48. Способ в соответствии с параграфом 47, где R¹⁶ представляет собой H.

49. Способ в соответствии с параграфом 10, где указанное выделенное соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (IB):



(IB)

50. Способ в соответствии с любым из параграфов 10-49, где R¹² представляет собой H, галоген, циано, нитро, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкокси, необязательно замещенный C₁-C₆ алканоил, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфонил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилсульфонил, гидроксикарбонил, необязательно замещенный C₂-C₇ алкоксикарбонил, необязательно замещенный карбоксамид, необязательно замещенный C₁-C₆ алканоилокси, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоилоилокси, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил, или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероцикл.

51. Способ в соответствии с параграфом 50, где R¹² представляет собой H, галоген, циано, нитро, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкокси, необязательно замещенный C₁-C₆ алканоил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфонил, гидроксикарбонил, необязательно замещенный C₂-C₇ алкоксикарбонил, необязательно замещенный карбоксамид, необязательно замещенный C₁-C₆ алканоилокси, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероцикл.

52. Способ в соответствии с параграфом 51, где R¹² представляет собой H, галоген, циано, нитро, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₂-C₇

алкоксикарбонил, необязательно замещенный карбоксами́д, необязательно замещенный C₁-C₆ алканоилокси или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил.

53. Способ в соответствии с параграфом 52, где R¹² представляет собой H, галоген, нитро, необязательно замещенный C₂-C₇ алкоксикарбонил или необязательно замещенный C₁-C₆ алканоилокси.

54. Способ в соответствии с параграфом 53, где R¹² представляет собой галоген.

55. Способ в соответствии с параграфом 54, где R¹² представляет собой фтор.

56. Способ в соответствии с параграфом 53, где R¹² представляет собой нитро.

57. Способ в соответствии с любым из параграфов 10-56, где R¹⁴ представляет собой H, галоген, циано, нитро, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, гидроксикарбонил, необязательно замещенный C₂-C₇ алкоксикарбонил, необязательно замещенный карбоксами́д, необязательно замещенный C₁-C₆ алканоилокси, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклилоилокси, необязательно замещенный C₁-C₆ алканоил, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфонил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилсульфинил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил.

58. Способ в соответствии с параграфом 57, где R¹⁴ представляет собой H, галоген, циано, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₂-C₇ алкоксикарбонил, необязательно замещенный карбоксами́д, необязательно замещенный C₁-C₆ алканоилокси, необязательно замещенный C₁-C₆ алканоил, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфонил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилсульфонил или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил.

59. Способ в соответствии с параграфом 58, где R¹⁴ представляет собой H, галоген, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₂-C₇ алкоксикарбонил, необязательно замещенный карбоксами́д, необязательно замещенный C₁-C₆ алканоилокси, необязательно замещенный C₁-C₆ алканоил.

60. Способ в соответствии с параграфом 59, где R¹⁴ представляет собой галоген, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, или необязательно замещенный C₁-C₆ алканоил.

61. Способ в соответствии с параграфом 60, где R¹⁴ представляет собой галоген.

62. Способ в соответствии с параграфом 61, где R¹⁴ представляет собой фтор.

63. Способ в соответствии с параграфом 60, где R¹⁴ представляет собой необязательно замещенный C₁-C₆ алканоил.

64. Способ в соответствии с параграфом 63, где R¹⁴ представляет собой

необязательно замещенный C₂-C₄ алканоил.

65. Способ в соответствии с параграфом 64, где R¹⁴ представляет собой незамещенный C₂-C₄ алканоил.

66. Способ в соответствии с любым из параграфов 10-65, где R¹⁵ представляет собой H, необязательно замещенный amino, необязательно замещенный амидо, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкокси, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилокси, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилокси, необязательно замещенный C₁-C₆ гетероалкил, необязательно замещенный C₃-C₁₀ циклоалкил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₁-C₆ алкил.

67. Способ в соответствии с параграфом 66, где R¹⁵ представляет собой H, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкокси, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилокси, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилокси, необязательно замещенный C₁-C₆ гетероалкил, необязательно замещенный C₃-C₁₀ циклоалкил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил.

68. Способ в соответствии с параграфом 67, где R¹⁵ представляет собой H или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил.

69. Способ в соответствии с параграфом 68, где R¹⁵ представляет собой H.

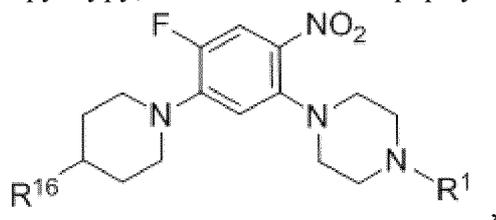
70. Способ в соответствии с параграфом 68, где R¹⁵ представляет собой необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил.

71. Способ в соответствии с параграфом 70, где R¹⁵ представляет собой пиперидинил.

72. Способ в соответствии с параграфом 70, где R¹⁵ представляет собой замещенный метилом пиперидинил.

73. Способ в соответствии с параграфом 70, где R¹⁵ представляет собой бензпиперидинил.

74. Способ в соответствии с любым из параграфов 10-73, где выделенное соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (IC):



(IC)

где R¹⁶ представляет собой H или C₁-C₆ алкил.

75. Способ в соответствии с параграфом 74, где R¹⁶ представляет собой H или метил.

82. Способ в соответствии с параграфом 79, где R^1 представляет собой обязательно замещенный C_2-C_6 алканоил.

83. Способ в соответствии с параграфом 82, где R^1 представляет собой ацетил, пропаноил, н-бутаноил, изобутаноил или т-пентаноил.

84. Способ в соответствии с параграфом 79, где R^1 представляет собой обязательно замещенный C_7-C_{11} арилоил.

85. Способ в соответствии с параграфом 84, где R^1 представляет собой 4-фторбензоил или бензоил.

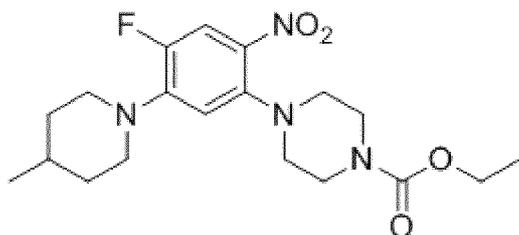
86. Способ в соответствии с параграфом 79, где R^1 представляет собой обязательно замещенный C_6-C_{10} арилсульфонил.

87. Способ в соответствии с параграфом 86, где R^1 представляет собой *m*-толилсульфонил или фенилсульфонил.

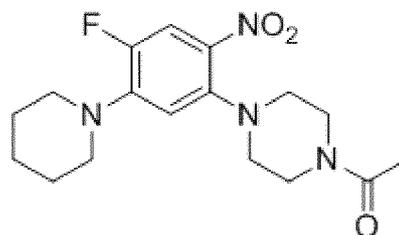
88. Способ в соответствии с параграфом 79, где R^1 представляет собой обязательно замещенный C_2-C_{10} гетероарилоил.

89. Способ в соответствии с параграфом 88, где R^1 представляет собой 2-тиофенкарбонил.

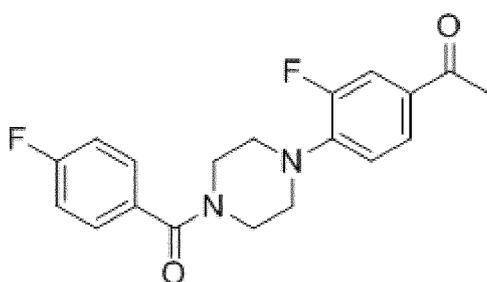
90. Способ в соответствии с параграфом 10, где выделенное соединение представляет собой соединение 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 или 18:



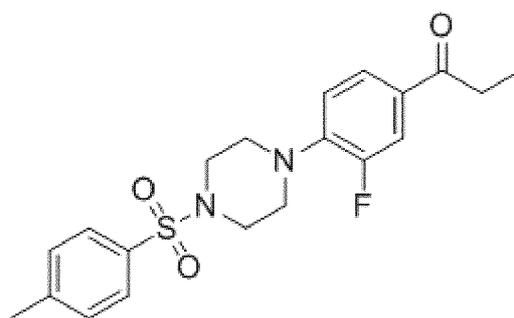
1



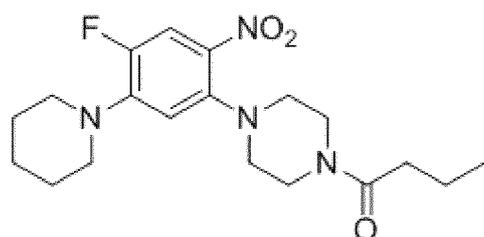
2



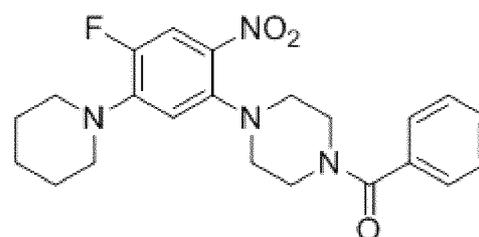
3



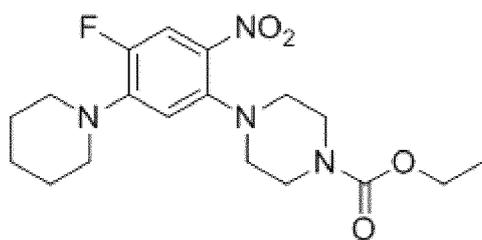
4



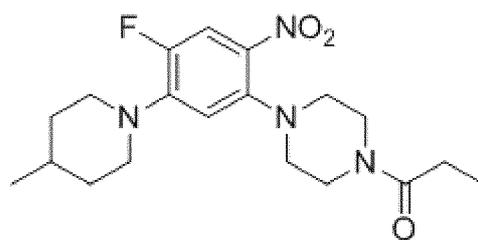
5



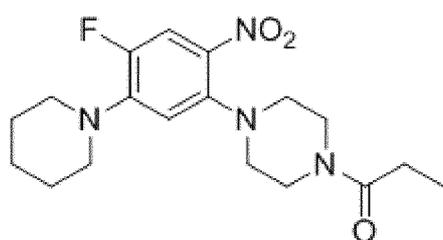
6



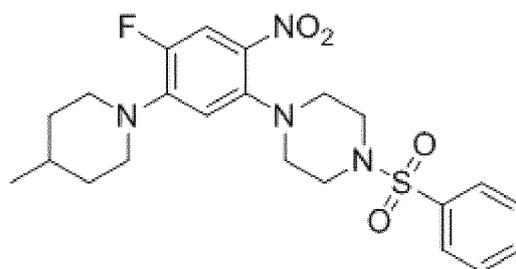
7



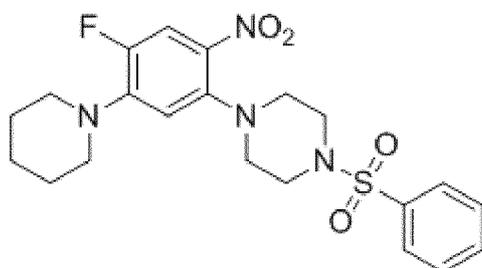
8



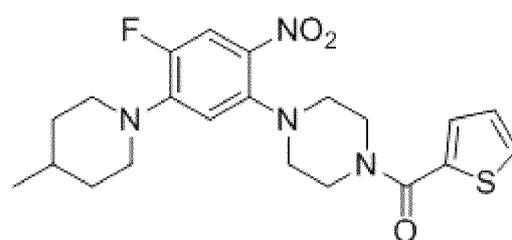
9



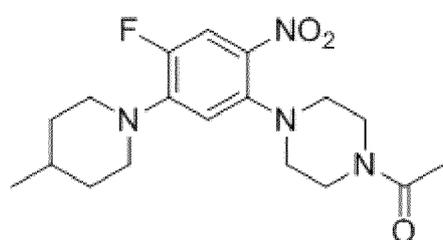
10



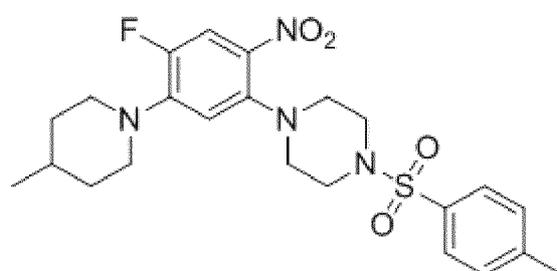
11



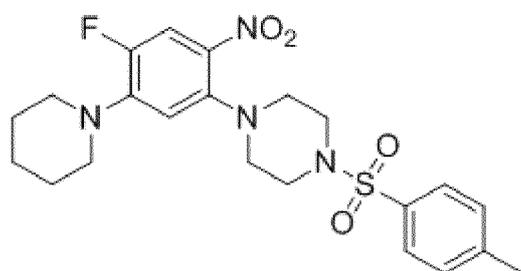
12



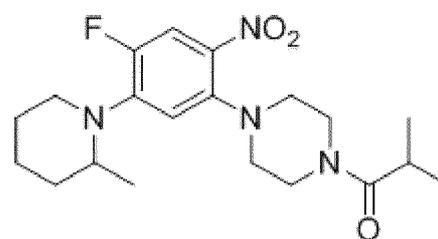
13



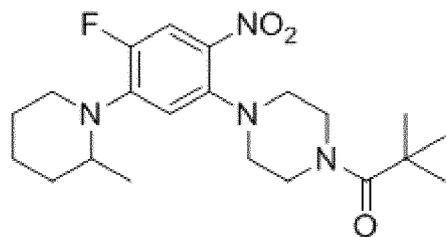
14



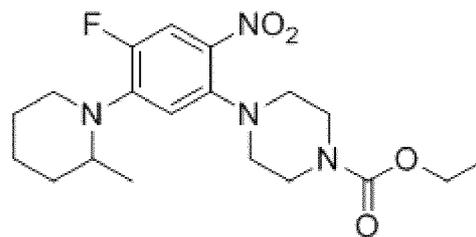
15



16

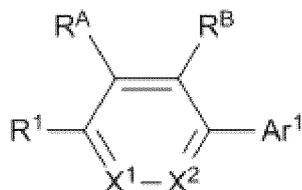


17



18

91. Способ в соответствии с параграфом 1 или 2, где указанное ингибирующее GPR174 соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (II):



(II)

или ее стереоизомером, или ее таутомером, или ее фармацевтически приемлемой солью, где,

X^1 представляет собой N или CR^2 ;

X^2 представляет собой N или CR^3 ;

R^A и R^B , вместе с атомами, к которым они присоединены, объединяются с формированием необязательно замещенного 5-членного кольца, необязательно замещенного 6-членного кольца, или необязательно замещенного 7-членного кольца;

R^1 представляет собой H, гало, гидроксигруппу, необязательно замещенный амино, необязательно замещенный амидо, тиол, циано, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинил, необязательно замещенный C_1-C_6 алкокси, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилокси, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилокси, необязательно замещенный C_2-C_6 алканоил, необязательно замещенный C_7-C_{11} арилоил, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероарилоил, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероциклоилоил, гидроксикарбонил, необязательно замещенный сложный эфир, необязательно замещенный карбоксамид, необязательно замещенный C_1-C_6 алканоилокси, необязательно замещенный C_7-C_{11} арилоилокси, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероарилоилокси, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероциклоилоилокси, необязательно замещенный C_1-C_6 тиоалкил, необязательно замещенный C_1-C_6 алкилсульфинил, необязательно замещенный C_1-C_6 алкилсульфонил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилтио, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилсульфинил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилсульфонил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилтио, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилсульфинил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилсульфонил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклисульфил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклисульфонил, необязательно замещенный сульфамойл, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил,

необязательно замещенный C₂-C₆ гетероалкенил, необязательно замещенный C₂-C₆ гетероалкинил, необязательно замещенный C₃-C₁₀ циклоалкил, необязательно замещенный C₄-C₁₀ циклоалкенил, необязательно замещенный C₈-C₁₀ циклоалкинил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₂-C₆ алкенил или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₂-C₆ алкинил; и

Ar¹ представляет собой необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил.

92. Способ в соответствии с параграфом 91, где R^A и R^B, вместе с атомами, к которым каждый из них присоединен, объединяются с формированием необязательно замещенного карбоциклического кольца.

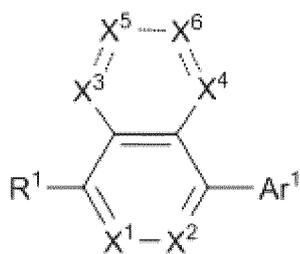
93. Способ в соответствии с параграфом 91, где R^A и R^B, вместе с атомами, к которым каждый из них присоединен, объединяются с формированием необязательно замещенного гетероциклического кольца.

94. Способ в соответствии с любым из параграфов 91-93, где R^A и R^B, вместе с атомами, к которым каждый из них присоединен, объединяются с формированием необязательно замещенного 6-членного кольца.

95. Способ в соответствии с любым из параграфов 91-94, где R^A и R^B, вместе с атомами, к которым каждый из них присоединен, объединяются с формированием необязательно замещенного неароматического кольца.

96. Способ в соответствии с любым из параграфов 91-94, где R^A и R^B, вместе с атомами, к которым каждый из них присоединен, объединяются с формированием необязательно замещенного ароматического кольца.

97. Способ в соответствии с параграфом 91, где выделенное соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (IIA):



(IIA)

где:

X³ представляет собой N или CR⁴;

X^4 представляет собой N или CR^5 ;

X^5 представляет собой N или CR^6 ;

X^6 представляет собой N, CR^7 или отсутствует; и

каждый из R^4 , R^5 , R^6 , и R^7 независимо представляет собой H, гало, гидрокси, необязательно замещенный амино, необязательно замещенный амидо, тиол, циано, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинил, необязательно замещенный C_1-C_6 алкокси, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилокси, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилокси, необязательно замещенный C_2-C_6 алканоил, необязательно замещенный C_7-C_{11} арилоил, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероарилоил, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероциклилоил, гидроксикарбонил, необязательно замещенный сложный эфир, необязательно замещенный карбоксаид, необязательно замещенный C_1-C_6 алканоилокси, необязательно замещенный C_7-C_{11} арилоилокси, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероарилоилокси, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероциклилоилокси, необязательно замещенный C_1-C_6 тиаалкил, необязательно замещенный C_1-C_6 алкилсульфинил, необязательно замещенный C_1-C_6 алкилсульфонил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилтио, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилсульфинил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилсульфонил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилтио, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилсульфинил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилсульфонил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклилсульфинил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклилсульфонил, необязательно замещенный сульфамойл, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкинил, необязательно замещенный C_3-C_{10} циклоалкил, необязательно замещенный C_4-C_{10} циклоалкенил, необязательно замещенный C_8-C_{10} циклоалкинил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил C_2-C_6 алкенил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил C_2-C_6 алкинил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил C_2-C_6 алкенил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил C_2-C_6 алкинил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил C_2-C_6 алкенил или необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил C_2-C_6 алкинил;

где

три или менее из X^1 , X^2 , X^3 , X^4 , X^5 , и X^6 представляют собой N.

98. Способ в соответствии с параграфом 97, где X^3 представляет собой CR^4 .

99. Способ в соответствии с параграфом 97 или 98, где X^4 представляет собой CR^5 .

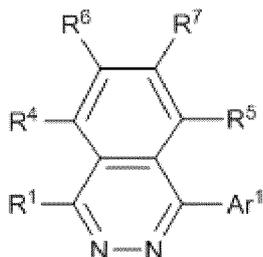
100. Способ в соответствии с любым из параграфов 97-99, где X^5 представляет собой CR^6 .

101. Способ в соответствии с любым из параграфов 97-100, где X^6 представляет собой CR^7 .

102. Способ в соответствии с любым из параграфов 91-101, где X^1 представляет собой N.

103. Способ в соответствии с любым из параграфов 91-102, где X^2 представляет собой N.

104. Способ в соответствии с параграфом 97, где выделенное соединение имеет структуру формулы (IIВ):



(IIВ)

105. Способ в соответствии с любым из параграфов 97-104, где R^4 представляет собой H, необязательно замещенный amino, гало, необязательно замещенный амидо, циано, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 алкокси, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилокси, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилокси, необязательно замещенный C_2-C_6 алканоил, необязательно замещенный C_7-C_{11} арилоил, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероарилоил, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероциклоилоил, гидроксикарбонил, необязательно замещенный сложный эфир, необязательно замещенный карбоксамид, необязательно замещенный C_1-C_6 алканоилокси, необязательно замещенный C_7-C_{11} арилоилокси, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероарилоилокси, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероциклоилоилокси, необязательно замещенный C_1-C_6 алкилсульфонил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилсульфонил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилсульфонил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклилсульфонил, необязательно замещенный сульфоамил, необязательно замещенный C_1-C_6 тиоалкил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный C_3-C_{10} циклоалкил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил или необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил C_1-C_6 алкил.

106. Способ в соответствии с параграфом 105, где R^4 представляет собой H, необязательно замещенный amino, гало, необязательно замещенный амидо, циано, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный сложный эфир, необязательно замещенный сложный эфир, необязательно замещенный карбоксамид, необязательно замещенный C_1-C_6 алканоилокси, необязательно замещенный C_7-C_{11}

арилоилокси, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероарилоилокси, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероциклоилокси, необязательно замещенный C_1-C_6 алкилсульфонил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилсульфонил, необязательно замещенный сульфоамил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил или необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил.

107. Способ в соответствии с параграфом 106, где R^4 представляет собой H, гало, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 алкилсульфонил, необязательно замещенный карбоксамид или необязательно замещенный сульфоамил.

108. Способ в соответствии с параграфом 107, где R^4 представляет собой H.

109. Способ в соответствии с любым из параграфов 97-108, где R^5 представляет собой H, необязательно замещенный amino, гало, необязательно замещенный амидо, необязательно замещенный карбоксамид, циано, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 алкокси, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилокси, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилокси, необязательно замещенный C_2-C_6 алканоил, необязательно замещенный C_7-C_{11} арилоил, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероарилоил, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероциклоилоил, гидроксикарбонил, необязательно замещенный сложный эфир, необязательно замещенный C_1-C_6 алкилсульфонил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилсульфонил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилсульфонил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклилсульфонил, необязательно замещенный C_1-C_6 тиоалкил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный C_3-C_{10} циклоалкил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил или необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил C_1-C_6 алкил.

110. Способ в соответствии с параграфом 109, где R^5 представляет собой H, необязательно замещенный amino, гало, циано, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 алкокси, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилокси, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилокси, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил или необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил.

111. Способ в соответствии с параграфом 109, где R^5 представляет собой H, необязательно замещенный amino, гало, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилокси, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилокси или необязательно замещенный C_6-C_{10} арил.

112. Способ в соответствии с параграфом 109, где R^5 представляет собой H.

113. Способ в соответствии с любым из параграфов 97-112, где R^6 представляет

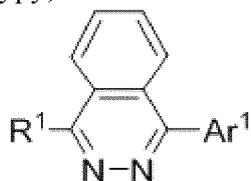
замещенный C₁-C₉ гетероцикллилсульфонил, необязательно замещенный сульфоамид, необязательно замещенный C₁-C₆ тиоалкил, необязательно замещенный C₁-C₆ гетероалкил, необязательно замещенный C₃-C₁₀ циклоалкил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероцикллил или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероцикллил C₁-C₆ алкил.

118. Способ в соответствии с параграфом 117, где R⁷ представляет собой H, необязательно замещенный amino, гало, необязательно замещенный амидо, циано, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный сложный эфир, необязательно замещенный сложный эфир, необязательно замещенный карбоксамид, необязательно замещенный C₁-C₆ алканоилокси, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоилокси, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфонил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилсульфонил, необязательно замещенный сульфоамид, необязательно замещенный C₁-C₆ гетероалкил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероцикллил.

119. Способ в соответствии с параграфом 118, где R⁷ представляет собой H, гало, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфонил, необязательно замещенный карбоксамид или необязательно замещенный сульфоамид.

120. Способ в соответствии с параграфом 119, где R⁷ представляет собой H.

121. Способ в соответствии с параграфом 91, где выделенное соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (IIС):

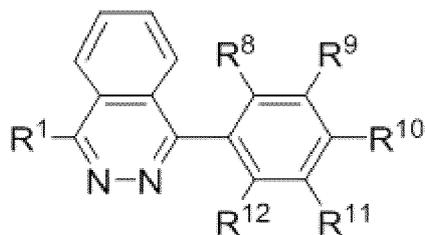


(IIС)

122. Способ в соответствии с любым из параграфов 91-121, где Ar¹ представляет собой необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил.

123. Способ в соответствии с параграфом 122, где Ar¹ представляет собой необязательно замещенный C₆ арил.

124. Способ в соответствии с параграфом 91, где выделенное соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (IIД):



(III)

где:

каждый из R^8 , R^9 , R^{10} , R^{11} и R^{12} независимо представляет собой H, гало, гидроксигруппы, обязательно замещенный амин, обязательно замещенный амидо, тиол, циано, обязательно замещенный C_1 - C_6 алкил, обязательно замещенный C_2 - C_6 алкенил, обязательно замещенный C_2 - C_6 алкинил, обязательно замещенный C_1 - C_6 алкокси, обязательно замещенный C_6 - C_{10} арилокси, обязательно замещенный C_1 - C_9 гетероарилокси, обязательно замещенный C_2 - C_6 алканоил, обязательно замещенный C_7 - C_{11} арилоил, обязательно замещенный C_2 - C_{10} гетероарилоил, обязательно замещенный C_2 - C_{10} гетероциклоилоил, гидроксикарбонил, обязательно замещенный сложный эфир, обязательно замещенный карбоксамида, обязательно замещенный C_1 - C_6 алканоилокси, обязательно замещенный C_7 - C_{11} арилоилокси, обязательно замещенный C_2 - C_{10} гетероарилоилокси, обязательно замещенный C_2 - C_{10} гетероциклоилоилокси, обязательно замещенный C_1 - C_6 тиоалкил, обязательно замещенный C_1 - C_6 алкилсульфинил, обязательно замещенный C_1 - C_6 алкилсульфонил, обязательно замещенный C_6 - C_{10} арилтио, обязательно замещенный C_6 - C_{10} арилсульфинил, обязательно замещенный C_6 - C_{10} арилсульфонил, обязательно замещенный C_1 - C_9 гетероарилтио, обязательно замещенный C_1 - C_9 гетероарилсульфинил, обязательно замещенный C_1 - C_9 гетероарилсульфонил, обязательно замещенный C_1 - C_9 гетероциклисульфенил, обязательно замещенный C_1 - C_9 гетероциклисульфонил, обязательно замещенный сульфамид, обязательно замещенный C_1 - C_6 гетероалкил, обязательно замещенный C_2 - C_6 гетероалкенил, обязательно замещенный C_2 - C_6 гетероалкинил, обязательно замещенный C_3 - C_{10} циклоалкил, обязательно замещенный C_4 - C_{10} циклоалкенил, обязательно замещенный C_8 - C_{10} циклоалкинил, обязательно замещенный C_6 - C_{10} арил, обязательно замещенный C_6 - C_{10} арил C_1 - C_6 алкил, обязательно замещенный C_6 - C_{10} арил C_2 - C_6 алкенил, обязательно замещенный C_6 - C_{10} арил C_2 - C_6 алкинил, обязательно замещенный C_1 - C_9 гетероарил, обязательно замещенный C_1 - C_9 гетероарил C_1 - C_6 алкил, обязательно замещенный C_1 - C_9 гетероарил C_2 - C_6 алкенил, обязательно замещенный C_1 - C_9 гетероарил C_2 - C_6 алкинил, обязательно замещенный C_1 - C_9 гетероцикл, обязательно замещенный C_1 - C_9 гетероцикл C_1 - C_6 алкил, обязательно замещенный C_1 - C_9 гетероцикл C_2 - C_6 алкенил или обязательно замещенный C_1 - C_9 гетероцикл C_2 - C_6 алкинил;

или любые два из соседних R^8 , R^9 , R^{10} , R^{11} и R^{12} , вместе с двумя соседними атомами

углерода, к которым они присоединены, формируют 5, 6 или 7-членное необязательно замещенное карбоциклическое или гетероциклическое кольцо.

125. Способ в соответствии с параграфом 124, где R^8 представляет собой H, гало или необязательно замещенный C_1-C_6 алкил.

126. Способ в соответствии с параграфом 125, где R^8 представляет собой H.

127. Способ в соответствии с любым из параграфов 124-126, где R^{11} представляет собой H, гало или необязательно замещенный C_1-C_6 алкил.

128. Способ в соответствии с параграфом 127, где R^{11} представляет собой H.

129. Способ в соответствии с любым из параграфов 124-128, где R^{12} представляет собой H, гало или необязательно замещенный C_1-C_6 алкил.

130. Способ в соответствии с параграфом 129, где R^{12} представляет собой H.

131. Способ в соответствии с любым из параграфов 124-130, где R^9 представляет собой H, необязательно замещенный amino, гало, необязательно замещенный амидо, необязательно замещенный карбоксамид, циано, нитро, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 алкокси, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилокси, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилокси, необязательно замещенный C_2-C_6 алканоил, необязательно замещенный C_7-C_{11} арилоил, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероарилоил, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероциклоил, гидроксикарбонил, необязательно замещенный сложный эфир, необязательно замещенный C_1-C_6 алкилсульфинил, необязательно замещенный C_1-C_6 алкилсульфонил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилсульфинил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилсульфонил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилсульфинил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилсульфонил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклилсульфонил, необязательно замещенный сульфамойл, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный C_3-C_{10} циклоалкил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил или необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил C_1-C_6 алкил.

132. Способ в соответствии с параграфом 131, где R^9 представляет собой H, необязательно замещенный амидо, гало, циано, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный сложный эфир, необязательно замещенный C_1-C_6 алкилсульфонил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилсульфонил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилсульфонил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклилсульфонил, необязательно замещенный сульфамойл, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил или необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил.

133. Способ в соответствии с параграфом 132, где R^9 представляет собой H, необязательно замещенный карбоксамид, гало, необязательно замещенный C_1-C_6

алкилсульфонил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклилсульфонил или необязательно замещенный сульфамойл.

134. Способ в соответствии с параграфом 133, где R^9 является необязательно замещенным сульфамойлом.

135. Способ в соответствии с параграфом 134, где R^9 является незамещенным сульфамойлом.

136. Способ в соответствии с любым из параграфов 124-135, где R^{10} представляет собой H, гало, циано, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинил, необязательно замещенный C_2-C_6 алканоил, гидроксикарбонил, необязательно замещенный сложный эфир, необязательно замещенный карбоксамид, необязательно замещенный C_1-C_6 тиоалкил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный C_3-C_{10} циклоалкил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил или необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил C_1-C_6 алкил.

137. Способ в соответствии с параграфом 136, где R^{10} представляет собой H, гало, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный C_3-C_{10} циклоалкил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил или необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил C_1-C_6 алкил.

138. Способ в соответствии с параграфом 137, где R^{10} представляет собой необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил или необязательно замещенный C_3-C_{10} циклоалкил.

139. Способ в соответствии с параграфом 137, где R^{10} представляет собой необязательно замещенный C^1-C^6 алкил.

140. Способ в соответствии с параграфом 139, где R^{10} представляет собой метил.

141. Способ в соответствии с любым из параграфов 91-140, где R^1 представляет собой H, гидроксигруппа, необязательно замещенный амино, гало, тиол, необязательно замещенный амидо, необязательно замещенный карбоксамид, циано, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_6 алкокси, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилокси, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилокси, необязательно замещенный C_1-C_6 алканоилокси, необязательно замещенный C_7-C_{11} арилоилокси, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероарилоилокси, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероциклилоилокси, необязательно замещенный C_1-C_6 тиоалкил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный C_3-C_{10} циклоалкил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил или

необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₁-C₆ алкил.

142. Способ в соответствии с параграфом 141, где R¹ представляет собой H, необязательно замещенный amino, необязательно замещенный амидо, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкокси, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилокси, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилокси, необязательно замещенный C₁-C₆ гетероалкил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₁-C₆ алкил.

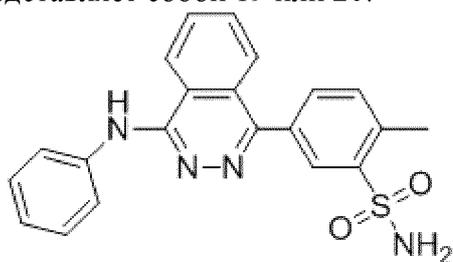
143. Способ в соответствии с параграфом 142, где R¹ представляет собой H, необязательно замещенный amino, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилокси, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилокси, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил.

144. Способ в соответствии с параграфом 143, где R¹ является необязательно замещенным amino.

145. Способ в соответствии с параграфом 144, где R¹⁰ представляет собой замещенный amino, где по меньшей мере один заместитель представляет собой фенил.

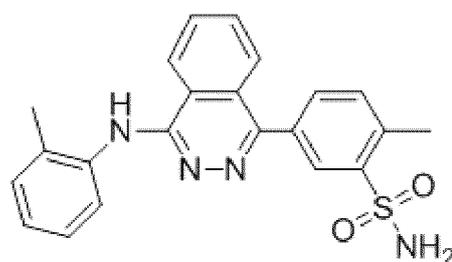
146. Способ в соответствии с параграфом 144, где R¹ представляет собой замещенный amino, где по меньшей мере один заместитель представляет собой *o*-толил.

147. Способ в соответствии с параграфом 91, где выделенное соединение представляет собой 19 или 20:



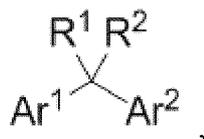
19

или



20

148. Способ в соответствии с параграфом 1 или 2, где указанное выделенное соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (III):



(III)

или ее стереоизомером, или ее таутомером, или ее фармацевтически приемлемой солью, где

каждый из R¹ и R² независимо представляет собой H, гало, циано, необязательно

замещенный C₁-C₆ алкил или необязательно замещенный C₁-C₆ гетероалкил; и

каждый из Ar¹ и Ar² независимо представляет собой необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил.

149. Способ в соответствии с параграфом 148, где Ar¹ представляет собой необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил.

150. Способ в соответствии с параграфом 149, где Ar¹ представляет собой необязательно замещенный C₆ арил.

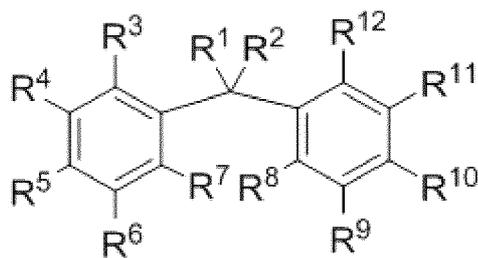
151. Способ в соответствии с параграфом 150, где Ar¹ представляет собой замещенный фенил.

152. Способ в соответствии с любым из параграфов 149-151, где Ar² представляет собой необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил.

153. Способ в соответствии с параграфом 152, где Ar² представляет собой необязательно замещенный C₆ арил.

154. Способ в соответствии с параграфом 153, где Ar² представляет собой замещенный фенил.

155. Способ в соответствии с параграфом 148, где выделенное соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (ША):



(ША)

где

каждый из R³, R⁴, R⁵, R⁶, R⁷, R⁸, R⁹, R¹⁰, R¹¹ и R¹² независимо представляет собой H, гало, гидрокси, необязательно замещенный amino, необязательно замещенный амидо, тиол, циано, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкокси, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилокси, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилокси, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоил, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоилоил, гидроксикарбонил, необязательно замещенный сложный эфир, необязательно замещенный карбоксамид, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоилокси, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоиламино, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоиламино, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоиламино, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоилоиламино, необязательно замещенный C₁-C₆ тиоалкил,

необязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфинил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфонил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилтио, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилсульфинил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилтио, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилсульфинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилсульфонил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклилсульфинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклилсульфонил, необязательно замещенный сульфамойл, необязательно замещенный C₁-C₆ гетероалкил, необязательно замещенный C₂-C₆ гетероалкенил, необязательно замещенный C₂-C₆ гетероалкинил, необязательно замещенный C₃-C₁₀ циклоалкил, необязательно замещенный C₄-C₁₀ циклоалкенил, необязательно замещенный C₈-C₁₀ циклоалкинил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₂-C₆ алкенил или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₂-C₆ алкинил.

156. Способ в соответствии с любым из параграфов 148-155, где R¹ представляет собой H, гало или необязательно замещенный C₁-C₆ алкил.

157. Способ в соответствии с параграфом 156, где R¹ представляет собой H, гало или метил.

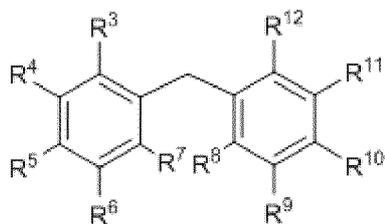
158. Способ в соответствии с параграфом 157, где R¹ представляет собой H.

159. Способ в соответствии с любым из параграфов 148-158, где R² представляет собой H, гало или необязательно замещенный C₁-C₆ алкил.

160. Способ в соответствии с параграфом 159, где R² представляет собой H, гало или метил.

161. Способ в соответствии с параграфом 160, где R² представляет собой H.

162. Способ в соответствии с параграфом 148, где выделенное соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (IIIВ):



(IIIВ)

163. Способ в соответствии с любым из параграфов 148-162, где R³ представляет собой H, гало или необязательно замещенный C₁-C₆ алкил.

164. Способ в соответствии с параграфом 163, где R^3 представляет собой H.

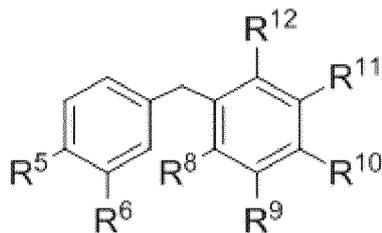
165. Способ в соответствии с любым из параграфов 148-164, где R^4 представляет собой H, гало или необязательно замещенный C_1-C_6 алкил.

166. Способ в соответствии с параграфом 165, где R^4 представляет собой H.

167. Способ в соответствии с любым из параграфов 148-166, где R^7 представляет собой H, гало или необязательно замещенный C_1-C_6 алкил.

168. Способ в соответствии с параграфом 167, где R^7 представляет собой H.

169. Способ в соответствии с параграфом 148, где выделенное соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (IIIС):



(IIIС)

170. Способ в соответствии с любым из параграфов 148-169, где R^{11} представляет собой H, гало или необязательно замещенный C_1-C_6 алкил.

171. Способ в соответствии с параграфом 170, где R^{11} представляет собой H.

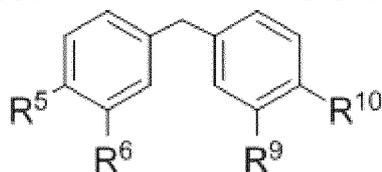
172. Способ в соответствии с любым из параграфов 148-171, где R^{12} представляет собой H, гало или необязательно замещенный C_1-C_6 алкил.

173. Способ в соответствии с параграфом 172, где R^{12} представляет собой H.

174. Способ в соответствии с любым из параграфов 148-173, где R^8 представляет собой H, гало, или необязательно замещенный C_1-C_6 алкил.

175. Способ в соответствии с параграфом 174, где R^8 представляет собой H.

176. Способ в соответствии с параграфом 148, где выделенное соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (IIIД):



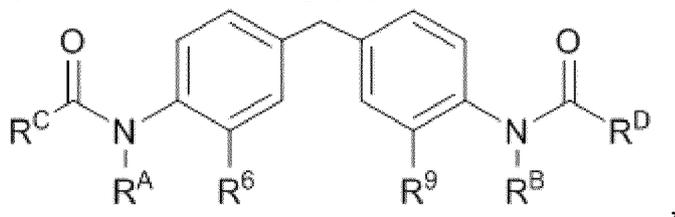
(IIIД)

177. Способ в соответствии с любым из параграфов 148-176, где R^5 представляет собой H, гало, циано, необязательно замещенный amino, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_2-C_6 алканоил, необязательно замещенный C_7-C_{11} арилоил, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероарилоил, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероциклоил, необязательно замещенный C_2-C_6 алканоилокси, необязательно замещенный C_7-C_{11} арилоилокси, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероарилоилокси, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероциклоилокси, необязательно замещенный C_2-C_6

необязательно замещенный амино, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоилокси, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоилокси, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоиламино, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоиламино, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоиламино, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоилоиламино, гидроксикарбонил, или необязательно замещенный карбоксаимид.

182. Способ в соответствии с параграфом 181, где R¹⁰ представляет собой необязательно замещенный амино, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоиламино, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоиламино, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоиламино или необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоилоиламино.

183. Способ в соответствии с параграфом 148, где выделенное соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (ШЕ):



(ШЕ)

где:

каждый из R^A и R^B независимо представляет собой H или необязательно замещенный C₁-C₆ алкил; и

каждый из R^C и R^D независимо представляет собой H, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₃-C₁₀ циклоалкил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероцикл.

184. Способ в соответствии с параграфом 183, где R^A представляет собой H.

185. Способ в соответствии с параграфом 183 или 184, где R^B представляет собой H.

186. Способ в соответствии с любым из параграфов 183-185, где R^C представляет собой необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил.

187. Способ в соответствии с параграфом 184, где R^C представляет собой необязательно замещенный C₄ гетероарил.

188. Способ в соответствии с параграфом 187, где R^C представляет собой необязательно замещенный тиофен-2-ил.

189. Способ в соответствии с любым из параграфов 183-188, где R^D представляет собой необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил.

190. Способ в соответствии с параграфом 189, где R^D представляет собой

необязательно замещенный C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₆ гетероалкил или необязательно замещенный C₃-C₁₀ циклоалкил.

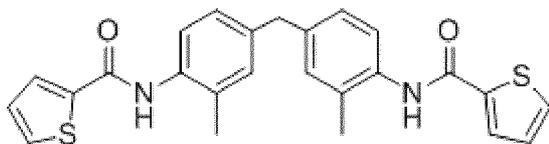
202. Способ в соответствии с параграфом 201, где R⁹ представляет собой H или необязательно замещенный C₁-C₆ алкил.

203. Способ в соответствии с параграфом 202, где R⁹ представляет собой H.

204. Способ в соответствии с параграфом 202, где R⁹ представляет собой C₁-C₆ алкил.

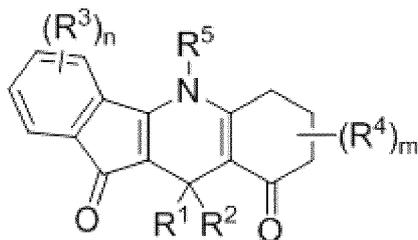
205. Способ в соответствии с параграфом 204, где R⁹ представляет собой метил.

206. Способ в соответствии с параграфом 148, где выделенное соединение представляет собой соединение 21:



21

207. Способ в соответствии с параграфом 1 или 2, где указанное ингибирующее GPR174 соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (IV):



(IV)

или ее стереоизомером, или ее таутомером или ее фармацевтически приемлемой солью, где

каждый из R¹ и R² независимо представляет собой H, гидроксигруппу, гало, необязательно замещенный амино, необязательно замещенный амидо, тиол, циано, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкокси, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилокси, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарилокси, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоил, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоилоил, гидроксикарбонил, необязательно замещенный сложный эфир, необязательно замещенный карбоксамид, необязательно замещенный C₁-C₆ алканоилокси, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоилокси, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклоилоилокси, необязательно замещенный C₁-C₆ тиоалкил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфинил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфонил, необязательно

C_2-C_6 алкинил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил C_2-C_6 алкенил или необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил C_2-C_6 алкинил;

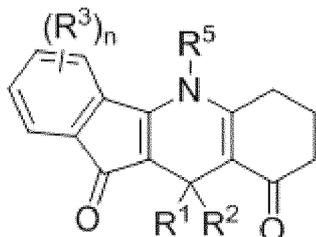
R^5 представляет собой H, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинил, необязательно замещенный C_1-C_6 алкокси, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилокси, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилокси, необязательно замещенный C_2-C_6 алканойл, необязательно замещенный C_7-C_{11} арилоил, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероарилоил, необязательно замещенный C_2-C_{10} гетероциклилоил, необязательно замещенный C_1-C_6 алкилоксикарбонил, необязательно замещенный C_1-C_6 алкилсульфинил, необязательно замещенный C_1-C_6 алкилсульфонил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилсульфинил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилсульфонил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилсульфинил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарилсульфонил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклилсульфинил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклилсульфонил, необязательно замещенный C_1-C_6 гетероалкил, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкенил, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероалкинил, необязательно замещенный C_3-C_{10} циклоалкил, необязательно замещенный C_4-C_{10} циклоалкенил, необязательно замещенный C_8-C_{10} циклоалкинил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил C_2-C_6 алкенил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил C_2-C_6 алкинил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил C_2-C_6 алкенил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероарил C_2-C_6 алкинил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил C_2-C_6 алкенил или необязательно замещенный C_1-C_9 гетероциклил C_2-C_6 алкинил.

n представляет собой 0, 1, 2, 3 или 4; и

m представляет собой 0, 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

208. Способ в соответствии с параграфом 207, где m представляет собой 0.

209. Способ в соответствии с параграфом 207, где выделенное соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (IVA):



(IVA)

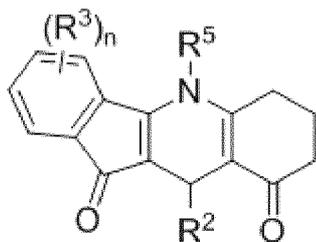
210. Способ в соответствии с любым из параграфов 207-209, где R^1 представляет

с собой H, гало, необязательно замещенный amino, необязательно замещенный амидо, тиол, циано или необязательно замещенный C₁-C₆ алкил.

211. Способ в соответствии с параграфом 210, где R¹ представляет собой H, гало или необязательно замещенный C₁-C₆ алкил.

212. Способ в соответствии с параграфом 211, где R¹ представляет собой H.

213. Способ в соответствии с параграфом 207, где выделенное соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (IVB):



(IVB)

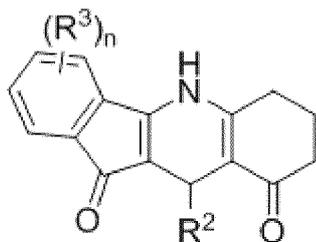
214. Способ в соответствии с любым из параграфов 207-213, где R⁵ представляет собой H, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоил, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероарилоил, необязательно замещенный C₂-C₁₀ гетероциклилоил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилоксикарбонил, необязательно замещенный C₁-C₆ алкилсульфонил или необязательно замещенный C₆-C₁₀ арилсульфонил.

215. Способ в соответствии с параграфом 214, где R⁵ представляет собой H, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₂-C₆ алканоил, необязательно замещенный C₇-C₁₁ арилоил или необязательно замещенный C₁-C₆ алкилоксикарбонил.

216. Способ в соответствии с параграфом 215, где R⁵ представляет собой H, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил или необязательно замещенный C₂-C₆ алканоил.

217. Способ в соответствии с параграфом 216, где R⁵ представляет собой H.

218. Способ в соответствии с параграфом 207, где выделенное соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (IVC):



(IVC)

219. Способ в соответствии с любым из параграфов 207-218, где R² представляет собой H, необязательно замещенный C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₂-C₆

алкенил, необязательно замещенный C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₆ гетероалкил, необязательно замещенный C₂-C₆ гетероалкенил, необязательно замещенный C₂-C₆ гетероалкинил, необязательно замещенный C₃-C₁₀ циклоалкил, необязательно замещенный C₄-C₁₀ циклоалкенил, необязательно замещенный C₈-C₁₀ циклоалкинил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₂-C₆ алкенил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил C₂-C₆ алкинил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₁-C₆ алкил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₂-C₆ алкенил, или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил C₂-C₆ алкинил.

220. Способ в соответствии с параграфом 219, где R² представляет собой необязательно замещенный C₃-C₁₀ циклоалкил, необязательно замещенный C₄-C₁₀ циклоалкенил, необязательно замещенный C₈-C₁₀ циклоалкинил, необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил.

221. Способ в соответствии с параграфом 220, где R² представляет собой необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил, необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероциклил.

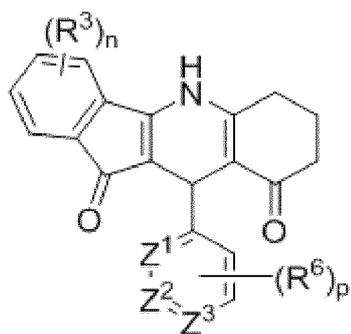
222. Способ в соответствии с параграфом 221, где R² представляет собой необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил или необязательно замещенный C₁-C₉ гетероарил.

223. Способ в соответствии с параграфом 222, где R² представляет собой необязательно замещенный C₆-C₁₀ арил.

224. Способ в соответствии с параграфом 223, где R² является необязательно замещенным фенил.

225. Способ в соответствии с параграфом 222, где R² является необязательно замещенным пиридил.

226. Способ в соответствии с параграфом 207, где выделенное соединение имеет структуру, в соответствии с формулой (IVD):



(IVD)

где R^6 в каждом случае независимо представляет собой, гало, необязательно замещенный C_1-C_6 алкил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкенил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арил, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероарил, необязательно замещенный C_2-C_6 гетероциклил, необязательно замещенный C_2-C_6 алкинил, необязательно замещенный амино, необязательно замещенный амидо, тиол, циано, нитро, C_1-C_6 алкилсульфонил, гидроксикарбонил, необязательно замещенный C_2-C_7 алкоксикарбонил, необязательно замещенный C_6-C_{10} арилокси или необязательно замещенный C_2-C_6 гетероарилокси;

Z^1 представляет собой С или N;

Z^2 представляет собой С или N;

Z^3 представляет собой N или С; и

r представляет собой 0, 1, 2, 3, 4 или 5.

227. Способ в соответствии с параграфом 226, где Z^1 представляет собой С, Z^2 представляет собой С, и Z^3 представляет собой N.

228. Способ в соответствии с параграфом 226, где Z^1 представляет собой С, Z^2 представляет собой N, и Z^3 представляет собой С.

229. Способ в соответствии с параграфом 226, где Z^1 представляет собой N, Z^2 представляет собой С, и Z^3 представляет собой С.

230. Способ в соответствии с параграфом 226, где Z^1 представляет собой С, Z^2 представляет собой С, и Z^3 представляет собой С.

231. Способ в соответствии с любым из параграфов 226-230, где r представляет собой 0.

232. Способ в соответствии с любым из параграфов 226-231, где r представляет собой 1.

233. Способ в соответствии с любым из параграфов 226-232, где r представляет собой 2.

234. Способ в соответствии с параграфом 232, где R^6 находится в p - или m -положении.

235. Способ в соответствии с любым из параграфов 226-234, где R^6 представляет собой метокси, метил, гидроксил, этокси, этил, необязательно замещенный фенокси, необязательно замещенный циклопентилокси, t -бутокси, аллиокси, изопропилокси, n -пентилокси, трифторметилокси, дифторметилокси, фтор, хлор, нитро, 2-гидроксиэтилокси, необязательно замещенный 1,3,4-оксадиазолил или необязательно замещенный пирролидил.

236. Способ в соответствии с любым из параграфов 207-235, где R^3 представляет собой H, гало, необязательно замещенный амино, необязательно замещенный амидо, тиол, циано, гидроксикарбонил, необязательно замещенный сложный эфир или необязательно замещенный C_1-C_6 алкил.

237. Способ в соответствии с любым из параграфов 207-235, где n представляет

собой 0.

238. Способ в соответствии с параграфом 207, где выделенное соединение представляет собой соединение 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 45, 47, 48, 49, 50, 51 или 52.

239. Способ в соответствии с параграфом 1, где указанное соединение имеет структуру, перечисленную в таблице 1.

240. Способ в соответствии с любым из параграфов 1-239, где указанное ингибирующее GPR174 соединение представляет собой обратный агонист и уменьшает по меньшей мере один опосредованный GPR174 путь передачи сигналов по меньшей мере до 1/2 по сравнению с исходной активностью при концентрации менее чем 10 мкМ.

241. Способ в соответствии с любым из параграфов 1-239, где указанное ингибирующее GPR174 соединение представляет собой антагонист и ингибирует по меньшей мере один опосредованный GPR174 путь передачи сигналов в присутствии агониста.

242. Способ в соответствии с любым из параграфов 1-239, где указанное ингибирующее GPR174 соединение является специфическим для GPR174, по сравнению с одним или несколькими GPCR в эталонной панели GPCR.

243. Способ в соответствии с любым из параграфов 1-239, где указанная клетка представляет собой эукариотическую клетку.

244. Способ в соответствии с параграфом 243, где указанная клетка представляет собой клетку млекопитающего.

245. Способ в соответствии с параграфом 244, где указанная клетка находится в млекопитающем.

246. Способ в соответствии с параграфом 244 или 245, где указанная клетка представляет собой клетку человека.

247. Способ в соответствии с параграфом 245, где указанное млекопитающее представляет собой человека.

248. Способ в соответствии с любым из параграфов 1-247, где указанную клетку приводят в контакт *in vivo*.

249. Способ в соответствии с любым из параграфов 245 или 247, где указанное млекопитающее страдает от или подвержено риску развития злокачественной опухоли.

250. Способ в соответствии с любым из параграфов 245, 247 или 249, где субъект страдает от или подвержен риску развития злокачественной опухоли, и клетка отличается тем, что применимо по меньшей мере одно или несколько из следующего:

клетка представляет собой регуляторную Т-клетку, экспрессирующую GPR174, и ингибирование пути передачи сигналов GPR174 супрессирует рост и/или пролиферацию Т-рег.;

клетка представляет собой эффекторную Т-клетку, и ингибирование GPR174 стимулирует рост и/или пролиферацию;

251. Способ в соответствии с любым из параграфов 245, 247 или 249, где субъект страдает от или подвержен риску развития опухоли .

252. Способ в соответствии с любым из параграфов 1-251, где ингибитор опосредованной АТР-аденозин-А2аR передачи сигналов представляет собой антагонист рецептора аденозин-А2А (А2А).

253. Способ в соответствии с любым из параграфов 1-251, где ингибитор опосредованной АТР-аденозин-А2bR передачи сигналов представляет собой антагонист рецептора аденозин-А2b (А2В).

254. Способ в соответствии с любым из параграфов 1-251, где ингибитор фермента, деградирующего АТР до аденозина, представляет собой ингибитор CD73.

255. Способ в соответствии с любым из параграфов 1-251, где ингибитор фермента, деградирующего АТР до аденозина, представляет собой ингибитор CD38 или ингибитор CD39.

256. Способ в соответствии с любым из параграфов 1-251, включающих как ингибирование опосредованного GPR174 пути передачи сигналов, так и ингибирование иммуносупрессии Т-рег, где клетка находится в субъекте-человеке, страдающем злокачественной опухолью; и способ включает стадии приведения в контакт указанной клетки с ингибирующим GPR174 соединением и ослабляющим Т-рег средством.

257. Способ в соответствии с параграфом 256, где ослабляющее Т-рег средство связывает один или несколько из GITR, CTLA-4, CD25, LAG3, TIGIT, NRP1, TGF- β , CCR2, CCR4, CCR8, TNFR2 и/или EZH2.

258. Способ в соответствии с параграфом 257, где ослабляющее Т-рег средство представляет собой малую молекулу или антитело против GITR, против CTLA-4, против CD25, против LAG3, против TIGIT, против NRP1, против TGF- β , против CCR2, против CCR4, против CCR8, против TNFR2 и/или против EZH2.

259. Способ в соответствии с любым из параграфов 256-258, дополнительно включающий приведение в контакт указанной клетки с по меньшей мере одним ингибитором опосредованной АТР-аденозин-А2аR и/или ингибитором опосредованной АТР-аденозин-А2bR передачи сигналов, и/или ингибитором CD38, CD39 и/или CD73.

260. Способ лечения или предотвращения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом субъекта, где указанный способ включает введение указанному субъекту соединения, которое ингибирует опосредованный GPR174 путь передачи сигналов, и по меньшей мере одного из антагониста А2аR, антагониста А2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего Т-рег средства, где ингибирующее GPR174 соединение характеризуется по меньшей мере одним из следующих критериев:

указанное соединение имеет структуру, выбранную из группы, состоящей из формул I-VI;

указанное соединение изменяет кажущуюся аффинность связывания любого из

эталонных соединений 1-59 (как указано в таблице 1) с GPR174; или

указанное соединение вызывает различие в модулирующей активности любого из эталонных соединений 1-59 (как указано в таблице 1), в анализе опосредованного GPR174 пути передачи сигналов, при тестировании в присутствии указанного эталонного соединения по сравнению с модулирующей активностью эталонного соединения отдельно;

где ингибирование как опосредованного GPR174 пути передачи сигналов, так и пути АТР-аденозин-А2аR и/или А2bR, и/или ослабление Т-рег приводит к лечению или предотвращению указанной злокачественные опухоли у нуждающегося в этом субъекта, и где ингибитор GPR174 и ингибитор пути АТР-аденозина-А2аR или А2bR или ослабляющее Т-рег средство вводят одновременно (например, совместно вводят отдельно или вместе), или последовательно в любом порядке, при условии, что эффекты первого введенного ингибитора остаются присутствующими на время введения второго ингибитора или ослабляющего средства.

261. Способ в соответствии с параграфом 260, где указанное соединение ингибирует опосредованный GPR174 путь передачи сигналов Gs.

262. Способ в соответствии с параграфом 260, где способ включает введение комбинации соединения, ингибирующего опосредованный GPR174 путь передачи сигналов, и ингибитора пути АТР-аденозина-А2аR или А2bR.

263. Способ в соответствии с параграфом 260, включающий введение комбинации соединения, ингибирующего опосредованный GPR174 путь передачи сигналов, и ослабляющего Т-рег средства.

264. Способ в соответствии с параграфом 263, где ослабляющее Т-рег средство связывает один или несколько из GITR, CTLA-4, CD25, LAG3, TIGIT, NRP1, TGF- β , CCR2, CCR4, CCR8, TNFR2 и/или EZH2.

265. Способ в соответствии с параграфом 264, где ослабляющее Т-рег средство представляет собой малую молекулу или антитело против GITR, против CTLA-4, против CD25, против LAG3, против TIGIT, против NRP1, против TGF- β , против CCR2, против CCR4, против CCR8, против TNFR2 и/или против EZH2.

266. Способ в соответствии с любым из параграфов 263-265, где способ дополнительно включает введение по меньшей мере одного ингибитора опосредованной АТР-аденозином-А2аR и/или ингибитора опосредованной АТР-аденозином-А2bR передачи сигналов и/или ингибитора CD38, CD39 и/или CD73.

267. Способ в соответствии с любым из параграфов 260-266, где субъект страдает злокачественной опухолью, ассоциированной с одной или несколькими опухолями, содержащими Т-рег.

268. Способ в соответствии с любым из параграфов 260-267, где злокачественная опухоль выбрана из группы, состоящей из: рака молочной железы, меланомы, рака ободочной кишки, урологической злокачественной опухоли, рака легкого, мелкоклеточного и немелкоклеточного рака легкого, рецидивирующих или

невосприимчивых злокачественных новообразований, неходжскинской лимфомы и лимфомы Ходжкина, лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфоцитарной лимфомы, лимфомы ЦНС, Т-клеточную лимфому, связанной со СПИД лимфомы, острого лимфобластного лейкоза, злокачественных опухолей желудочно-кишечного тракта, рака печени, печеночноклеточной карциномы, рака яичника, рака поджелудочной железы, рака желчного протока, рака предстательной железы, карциномы почки, рака мочевого пузыря, колоректального рака, множественной миеломы, мезотелиомы, рака шейки матки, рака влагалища, рака анального канала, рака ротоглотки, миелогенного лейкоза, рака желудка, носоглоточной карциномы, карциномы головы и шеи, глиобластомы, глиосаркомы, плоскоклеточной злокачественной опухоли мозга, злокачественной глиомы, диффузных глиом ствола головного мозга, рака пищевода, рака щитовидной железы, астроцитомы, злокачественной опухоли грудной клетки, рака эндометрия, карциномы клеток кожи, лейкоза, ацинарно-клеточной карциномы, аденокарциномы, бронхиолоальвеолярной карциномы, холангиокарциномы, хордомы, гигантоклеточной карциномы, карциномы кишечника, карциномы ободочной кишки, карциномы большой слюнной железы, злокачественной одонтогенной неоплазии, злокачественной опухоли оболочки периферического нерва, рака кожи, рака яичка, опухоли зародышевых клеток, нейроэндокринной карциномы, карциномы паращитовидной железы, карциномы гипофиза, хориокарциномы плаценты, злокачественной опухоли мошонки, карциномы трахеи, переходноклеточной карциномы, рака тела матки, рака вульвы, рака почки, рака прямой кишки, карциномы фаллопиевых труб, перитонеальной карциномы, эпителиальной злокачественной опухоли, плевральной мезотелиомы, саркоматоидной карциномы, синовиальной саркомы, нефробластомы, нейробластомы, острого миелоидного лейкоза взрослых, миелодиспластической/миелопролиферативной неоплазии, эмбриональной карциномы, саркомы Капоши, злокачественной опухоли кости, рака тела матки, рака желудка, карциномы эндометрия, злокачественной опухоли тонкого кишечника, злокачественной опухоли эндокринной системы, рака паращитовидной железы, рака надпочечника, саркомы мягких тканей, рака мочеиспускательного канала, рака полового члена, рака мочеочника, карциномы почечной лоханки, неоплазии центральной нервной системы, ангиогенеза первичной опухоли, опухоли оси позвоночника, эпидермоидной злокачественной опухоли, индуцированных внешней средой опухолей, включая опухоли, индуцированные асбестом, аденосаркомы, аденосквамозной карциномы, адренкортикальной карциномы, астроцитарных опухолей, базальноклеточной карциномы, хондросаркомы, саркомы Юинга, рака желчного пузыря, гипофарингеальной злокачественной опухоли, внутриглазной меланомы, рака гортани, лейомиосаркомы, злокачественной опухоли губ и полости рта, злокачественных мезотелиальных опухолей, злокачественной тимомы, медуллобластомы, медуллоэпителиомы, карциномы из клеток Меркеля, мукоэпидермоидной карциномы, миелодиспластического синдрома, рака носовой полости и околоносовых пазух, остеосаркомы, пульмональной бластомы,

пинеальных и супратенториальных примитивных нейроэктодермальных опухолей, неоплазии плазматических клеток, ретинобластомы, рабдомиосаркомы, саркомы, нейроэктодермальных опухолей и опухоли Вильмса.

269. Способ в соответствии с любым из параграфов 260-267, где субъект имеет опухоль, включающую клетки Т-рег и страдает от злокачественной опухоли, выбранной из группы, состоящей из рака молочной железы, легкого (такого как мелкоклеточный рак легкого или немелкоклеточный рак легкого), колоректального рака, рака шейки матки, почки, яичника, меланомы, рака поджелудочной железы, печеночноклеточного рака, рака желудка, глиобластомы, глиомы, рака мочевого пузыря, миеломы (такой как множественная миелома), рака предстательной железы, щитовидной железы, яичка, и пищевода.

270. Способ в соответствии с любым из параграфов 260-269, дополнительно включающий введение одного или нескольких дополнительных лекарственных средств.

271. Способ в соответствии с любым из параграфов 260-270, где указанное ингибирующее GPR174 соединение имеет структуру в соответствии с любым из параграфов 10-239.

272. Способ стимуляции опосредованного Т-клетками иммунитета у субъекта, включающий введение указанному субъекту композиции, включающей ингибирующее GPR174 соединение и по меньшей мере один из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего Т-рег средства, где ингибирование опосредованного GPR174 пути передачи сигналов и путь АТФ-аденозин-А2аR и/или А2bR и/или ослабление Т-рег приводит к стимуляции опосредованного Т-клетками иммунитета у указанного субъекта, где ингибитор GPR174 и ингибитор пути АТФ-аденозин-А2аR и/или А2bR и/или ослабляющее Т-рег средство вводят одновременно (например, совместно вводят отдельно или вместе), или последовательно в любом порядке, при условии, что эффекты первого введенного ингибитора остаются присутствующими на время введения второго ингибитора или ослабляющего средства.

273. Способ в соответствии с параграфом 272, где указанное ингибирующее GPR174 соединение выбрано из группы, состоящей из соединений, перечисленных в любом из параграфов 3-239.

274. Способ в соответствии с параграфом 272 или 273, где композиция содержит антагонист А2аR.

275. Способ в соответствии с параграфом 272 или 273, где композиция содержит антагонист А2bR.

276. Способ в соответствии с параграфом 272 или 273, где композиция содержит ингибитор CD38.

277. Способ в соответствии с параграфом 272 или 273, где композиция содержит ингибитор CD73.

278. Способ в соответствии с параграфом 272 или 273, где композиция содержит

ослабляющее T-рег средство.

279. Способ в соответствии с параграфом 278, где ослабляющее T-рег средство связывает один или несколько из GITR, CTLA-4, CD25, LAG3, TIGIT, NRP1, TGF- β , CCR2, CCR4, CCR8, TNFR2 и/или EZH2.

280. Способ в соответствии с параграфом 279, где ослабляющее T-рег средство представляет собой малую молекулу или антитело против GITR, против CTLA-4, против CD25, против LAG3, против TIGIT, против NRP1, против TGF- β , против CCR2, против CCR4, против CCR8, против TNFR2 и/или против EZH2.

281. Способ в соответствии с любым из параграфов 278-280, где композиция дополнительно содержит по меньшей мере один из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39 и/или ингибитора CD73.

282. Фармацевтическая композиция, включающая терапевтически эффективное количество комбинации ингибирующего GPR174 соединения и по меньшей мере одного из: антагониста рецептора аденозина A2A, антагониста рецептора аденозина A2B, ингибитора CD73 и/или ингибитора CD38, и/или ингибитора CD39 в фармацевтически приемлемом носителе.

283. Композиция из параграфа 282, где ингибирующее GPR174 соединение выбрано из группы, состоящей из соединений, перечисленных в любом из параграфов 3-239.

284. Композиция из параграфа 282 или 283, где композиция содержит комбинацию ингибитора GPR174 и антагониста рецептора аденозина A2A.

285. Композиция из параграфа 282 или 283, где композиция содержит комбинацию ингибитора GPR174 и антагониста рецептора аденозина A2B.

286. Композиция из параграфа 282 или 283, где композиция содержит комбинацию ингибитора GPR174, антагониста рецептора аденозина A2A и антагониста рецептора аденозина A2B.

287. Композиция из параграфа 282 или 283, где композиция содержит комбинацию ингибитора GPR174 и ингибитора CD73.

288. Композиция из параграфа 282 или 283, где композиция содержит комбинацию ингибитора GPR174 и ингибитора CD38 или ингибитора CD39.

289. Композиция из любого из параграфов 282-288, где композиция дополнительно содержит ослабляющее T-рег средство.

290. Композиция из параграфа 289, где ослабляющее T-рег средство связывает один или несколько из GITR, CTLA-4, CD25, LAG3, TIGIT, NRP1, TGF- β , CCR2, CCR4, CCR8, TNFR2 и/или EZH2.

291. Композиция в соответствии с параграфом 290, где ослабляющее T-рег средство представляет собой малую молекулу или антитело против GITR, против CTLA-4, против CD25, против LAG3, против TIGIT, против NRP1, против TGF- β , против CCR2, против CCR4, против CCR8, против TNFR2 и/или против EZH2.

292. Композиция в соответствии с любым из параграфов 282-291, где указанная

композиция представляет собой единичную дозированную форму.

293. Композиция в соответствии с любым из параграфов 282-292, где композицию составляют для перорального, внутривенного, внутрибрюшинного, внутримышечного, местного, ректального, кожного, подкожного, назального введения, введения в кожу (например, в форме чрескожного пластыря), интрацеребровентрикулярного, интрапаренхимного, интрастекального, ингаляционного, интракраниального или глазного введения.

294. Фармацевтическая композиция, включающая терапевтически эффективное количество комбинации ингибирующего GPR174 соединения и ослабляющего T-рег средства в фармацевтически приемлемом носителе.

295. Композиция из параграфа 294, где ослабляющее T-рег средство связывает один или несколько из GITR, CTLA-4, CD25, LAG3, TIGIT, NRP1, TGF- β , CCR2, CCR4, CCR8, TNFR2 и/или EZH2.

296. Композиция в соответствии с параграфом 295, где ослабляющее T-рег средство представляет собой малую молекулу или антитело против GITR, против CTLA-4, против CD25, против LAG3, против TIGIT, против NRP1, против TGF- β , против CCR2, против CCR4, против CCR8, против TNFR2 и/или против EZH2.

297. Композиция по любому из пп.294-296, где композиция дополнительно содержит по меньшей мере один из: антагониста рецептора аденозина A2A, антагониста рецептора аденозина A2B, ингибитора CD73 и/или ингибитора CD38 и/или ингибитора CD39.

298. Композиция в соответствии с любым из параграфов 294-297, где указанная композиция представляет собой единичную дозированную форму.

299. Композиция в соответствии с любым из параграфов 294-298, где композицию составляют для перорального, внутривенного, внутрибрюшинного, внутримышечного, местного, ректального, кожного, подкожного, назального введения, введения в кожу (например, в форме чрескожного пластыря), интрацеребровентрикулярного, интрапаренхимного, интрастекального, ингаляционного, интракраниального или глазного введения.

300. Способ увеличения противоопухолевого иммунного ответа у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества ингибирующего GPR174 соединения и антагониста рецептора аденозина A2A и/или антагониста рецептора аденозина A2B, и/или ослабляющего T-рег средства, где ингибирующее GPR174 соединение и антагонист рецептора A2A и/или антагонист рецептора A2B, и/или ослабляющее T-рег средство вводят одновременно (например, совместно вводят отдельно или вместе), или последовательно в любом порядке, при условии, что эффекты первого введенного ингибитора остаются присутствующими на время введения второго ингибитора или ослабляющего средства.

301. Способ в соответствии с параграфом 300, включающий введение антагониста

рецептора аденозина A2A.

302. Способ в соответствии с параграфом 300, включающий введение антагониста рецептора аденозина A2B.

303. Способ в соответствии с параграфом 300, включающий введение антагониста рецептора аденозина A2A и антагонист рецептора A2B.

304. Способ в соответствии с любым из параграфов 300-303, включающий введение ослабляющего T-рег средства.

305. Способ в соответствии с параграфом 304, где ослабляющее T-рег средство связывает один или несколько из GITR, CTLA-4, CD25, LAG3, TIGIT, NRP1, TGF- β , CCR2, CCR4, CCR8, TNFR2 и/или EZH2.

306. Способ в соответствии с параграфом 305, где ослабляющее T-рег средство представляет собой малую молекулу или антитело против GITR, против CTLA-4, против CD25, против LAG3, против TIGIT, против NRP1, против TGF- β , против CCR2, против CCR4, против CCR8, против TNFR2 и/или против EZH2.

307. Способ усиления противоопухолевого иммунного ответа у субъекта, которого в настоящее время подвергают или подвергали лечению с использованием по меньшей мере одного из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39 и/или ингибитора CD73, включающий введение эффективного количества ингибитора GPR174 для стимуляции усиленного противоопухолевого иммунного ответа у субъекта.

308. Способ из параграфа 307, где ингибирующее GPR174 соединение выбрано из группы, состоящей из соединений, перечисленных в любом из параграфов 3-239.

309. Способ из параграфа 307 или 308, дополнительно включающий введение ослабляющего T-рег средства.

310. Способ из параграфа 309 где ослабляющее T-рег средство связывает один или несколько из GITR, CTLA-4, CD25, LAG3, TIGIT, NRP1, TGF- β , CCR2, CCR4, CCR8, TNFR2 и/или EZH2.

311. Способ в соответствии с параграфом 310, где ослабляющее T-рег средство представляет собой малую молекулу или антитело против GITR, против CTLA-4, против CD25, против LAG3, против TIGIT, против NRP1, против TGF- β , против CCR2, против CCR4, против CCR8, против TNFR2 и/или против EZH2.

312. Способ усиления противоопухолевого иммунного ответа у субъекта, которого в настоящее время подвергают или подвергали лечению с использованием ослабляющего T-рег средства, включающий введение эффективного количества ингибитора GPR174 для стимуляции усиленного противоопухолевого иммунного ответа у субъекта.

313. Способ из параграфа 312, где ослабляющее T-рег средство связывает один или несколько из GITR, CTLA-4, CD25, LAG3, TIGIT, NRP1, TGF- β , CCR2, CCR4, CCR8, TNFR2 и/или EZH2.

314. Способ из параграфа 313, где ослабляющее T-рег средство представляет собой малую молекулу или антитело против GITR, против CTLA-4, против CD25, против LAG3,

против TIGIT, против NRP1, против TGF- β , против CCR2, против CCR4, против CCR8, против TNFR2 и/или против EZH2.

315. Способ из любого из параграфов 312-314, где ингибирующее GPR174 соединение выбрано из группы, состоящей из соединений, перечисленных в любом из параграфов 3-239.

316. Способ ингибирования опосредованной PS активации передачи через GPR174 сигналов Gs в иммуноците, экспрессирующем GPR174, включающий приведение указанного иммуноцита в контакт с ингибитором передачи через GPR174 сигналов Gs, либо в форме одиночного средства, либо в комбинации с по меньшей мере одним из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства.

317. Способ в соответствии с параграфом 316, где опосредованная PS активация передачи через GPR174 сигналов Gs относится к связанному с мембраной PS.

318. Способ в соответствии с параграфом 316, где опосредованная PS активация передачи через GPR174 сигналов Gs относится к несвязанному с мембраной PS.

319. Способ в соответствии с параграфом 316, где связанный с мембраной PS присутствует на по меньшей мере одном из апоптотических клеток, клеток опухолей, экзосом, эндотелиальных клеток кровеносных сосудов, проникающих в солидные опухоли, или активированных тромбоцитов.

320. Способ в соответствии с любым из параграфов 316-319, где ингибитор GPR174 представляет собой низкомолекулярный ингибитор, выбранный из группы, состоящей из соединений, перечисленных в любом из параграфов 10-239.

321. Способ в соответствии с параграфом 320, где низкомолекулярный ингибитор ингибирует зависимую от PS активацию передачи сигналов GPR174 в иммуноците, экспрессирующем GPR174, по меньшей мере на 25%.

322. Способ в соответствии с параграфом 316, где ингибитор передачи через GPR174 сигналов Gs представляет собой антитело, которое специфически связывает GPR174.

323. Способ в соответствии с параграфом 316, где иммуноцит, экспрессирующий GPR174, присутствует у субъекта-млекопитающего, и ингибитор передачи через GPR174 сигналов Gs приводят в контакт *in vivo* у указанного субъекта.

324. Способ в соответствии с параграфом 323, где указанный субъект-млекопитающее представляет собой субъекта-человека.

325. Способ в соответствии с параграфом 323 или 324, где субъект страдает от или является носителем неоплазии, не узнаваемой организмом как собственная.

326. Способ в соответствии с параграфом 323 или 324, где субъект страдает от или подвержен риску развития злокачественной опухоли.

327. Способ в соответствии с любым из параграфов 316-326, где ослабляющее T-рег средство связывает один или несколько из GITR, CTLA-4, CD25, LAG3, TIGIT, NRP1, TGF- β , CCR2, CCR4, CCR8, TNFR2 и/или EZH2.

328. Способ в соответствии с параграфом 327, где ослабляющее T-рег средство представляет собой малую молекулу или антитело против GITR, против CTLA-4, против CD25, против LAG3, против TIGIT, против NRP1, против TGF- β , против CCR2, против CCR4, против CCR8, против TNFR2 и/или против EZH2.

329. Способ стимуляции и/или усиления иммунного ответа у субъекта-млекопитающего, страдающего от или подверженного риску развития злокачественной опухоли или метастазирования злокачественной опухоли, включающему:

(a) определение присутствия происходящих из клеток злокачественной опухоли экзосомы(экзосом), экспрессирующих фосфатидилсерин (PS), в образце, полученном от указанного субъекта-млекопитающего; и

(b) введение терапевтически эффективного количества ингибитора GPR174 указанному субъекту.

330. Способ из параграфа 329, где ингибитор GPR174 представляет собой малую молекулу ингибирующее опосредованная PS иммуносупрессия.

331. Способ из параграфа 329 или 330, где ингибитор GPR174 представляет собой малую молекулу, ингибирующую передачу через GPR174 сигналов Gs.

332. Способ из параграфа 329, где образец представляет собой ткань, клетку или экстракт клеток, или жидкость, выбранную из группы, состоящей из крови, сыворотки, плазмы, мокроты, мочи, слюны и слез.

333. Способ из параграфа 329, где стадия (a) включает приведение в контакт указанного образца с связывающим PS средством и таким образом, определение присутствия указанной происходящей из клеток злокачественной опухоли экзосомы(экзосом).

334. Способ из параграфа 329, где указанная происходящая из клетки злокачественной опухоли экзосома(экзосомы), экспрессирующая PS, происходит из клетки рака легкого, клетки рака поджелудочной железы, клетки рака яичника, клетки рака молочной железы, клетки рака ободочной кишки, клетки рака почки, клетки рака печени, клетки рака кожи, клетки злокачественной опухоли мозга, клетки рака головы и шеи или клетки рака щитовидной железы.

335. Способ из любого из параграфов 329-334, где ингибирующее GPR174 соединение выбрано из группы, состоящей из соединений, перечисленных в любом из параграфов 3-239.

336. Способ из любого из параграфов 329-335, где способ дополнительно включает введение по меньшей мере одного из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства.

337. Способ лечения злокачественной опухоли, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества ингибитора GPR174 ингибирующее передачу через GPR174 сигналов G-альфа-s таким образом, стимуляции иммунного ответа у пациента.

338. Способ из параграфа 337, где GPR174 экспрессированный на иммунocyтах, приводят в контакт с фосфатидилсерин (PS) или лизофосфатидилсерин (lysoPS) в микроокружении опухолей или ассоциированных лимфоидных тканях, и где указанный ингибитор GPR174 ингибирует опосредованную PS или lysoPS передачу сигналов GPR174.

339. Способ из параграфа 337 или 338, где злокачественная опухоль содержит живые клетки, умирающие клетки или внеклеточный везикулы, имеющие фосфатидилсерин (PS) на своей поверхности.

340. Способ по любому из параграфов 337-339, где пациент представляет собой пациента-млекопитающее.

341. Способ по любому из параграфов 337-340, где способ дополнительно включает введение по меньшей мере одного дополнительного средства, выбранного из группы, состоящей из:

i. антагониста рецептора аденозина-A2A (A2A);

ii. антагониста рецептора аденозина-A2B (A2B);

iii. ингибитора CD73;

iv. ингибитора CD38;

v. ингибитора CD39; или

vi. ослабляющего T-рег средства, где ингибитор GPR174 и по меньшей мере одно дополнительное средство вводят одновременно, или последовательно в любом порядке, при условии, что эффекты первого вышеупомянутого ингибитора или антагониста остаются присутствующими на время введения второго ингибитора или антагониста.

342. Способ из параграфа 341, где дополнительное средство представляет собой антагонист рецептора аденозина-A2A, антагонист рецептора аденозина-A2B или их комбинации.

343. Способ из параграфов 341 или 342, где дополнительное средство представляет собой ослабляющее T-рег средство.

344. Способ из параграфа 343, где ослабляющее T-рег средство связывает один или несколько из GITR, CTLA-4, CD25, LAG3, TIGIT, NRP1, TGF- β , CCR2, CCR4, CCR8, TNFR2 или EZH2.

345. Способ по любому из параграфов 343-345, где ослабляющее T-рег средство представляет собой малую молекулу.

346. Способ по любому из параграфов 343-345, где ослабляющее T-рег средство представляет собой антитело против GITR, против CTLA-4, против CD25, против LAG3, против TIGIT, против NRP1, против TGF- β , против CCR2, против CCR4, против CCR8, против TNFR2 или против EZH2.

347. Способ по любому из параграфов 337-346, где ингибитор GPR174 представляет собой низкомолекулярный ингибитор GPR174 или антитело, которое специфически связывает GPR174.

348. Способ из параграфа 347, где низкомолекулярный ингибитор GPR174

представляет собой обратный агонист передачи сигналов GPR174.

349. Способ из параграфа 347, где низкомолекулярный ингибитор GPR174 представляет собой антагонист передачи сигналов GPR174.

350. Способ из параграфа 347, где низкомолекулярный ингибитор GPR174 ингибирует зависимую от PS, LysoPS, или пепдуцина активацию передачи сигналов GPR174 в клетке, экспрессирующей GPR174, по меньшей мере на 25%.

351. Способ по любому из параграфов 337-350, где стимулированный иммунный ответ включает опосредованный Т-клетками иммунный ответ.

352. Способ из параграфа 351, где опосредованный Т-клетками иммунный ответ включает продукцию Th1-цитокинов.

353. Способ из параграфа 351, где опосредованный Т-клетками иммунный ответ включает супрессию активности, дифференцировки, роста, пролиферации Т-рег или их комбинации.

354. Способ из параграфа 351, где опосредованный Т-клетками иммунный ответ включает стимуляцию активности, дифференцировки, роста, пролиферации Т-эффектора или их комбинации.

355. Способ из параграфа 351, где опосредованный Т-клетками иммунный ответ включает стимуляцию активности, дифференцировки, роста, пролиферации Th1-клетки или их комбинации.

356. Способ из параграфа 351, где опосредованный Т-клетками иммунный ответ включает супрессию активности, дифференцировки, роста, пролиферации Th17-клетки или их комбинации.

357. Способ из параграфа 337, где стимулированный иммунный ответ включает уменьшение экспрессии ассоциированного с иммуноцитами или злокачественными клетками лиганда 1 программируемой смерти (PD-L1) или экспрессии ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами антигена 4 (CTLA4), или экспрессии Т-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM (TIGIT), или экспрессии амфирегулина (AREG).

358. Способ из параграфа 337, где стимулированный иммунный ответ включает опосредованный NK-клетками иммунный ответ.

359. Способ по любому из параграфов 351-358, где по меньшей мере часть Т-клеток или NK-клеток экспрессируют GPR174.

360. Способ по любому из параграфов 337-359, где злокачественная опухоль представляет собой солидную опухоль.

361. Способ по любому из параграфов 337-359, где злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль клеток крови.

362. Способ из параграфа 361, где опухоль инфильтрована лимфоцитами, экспрессирующими GPR174.

363. Способ из любого из параграфов 337-362, где пациент представляет собой человека.

364. Способ из любого из параграфов 337-363, где активность, дифференцировку, пролиферацию, рост Т-клетки или их комбинацию стимулируют в популяции мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), приведенной в контакт с ингибитор GPR174, по сравнению с контрольной популяцией PBMC, не приведенной в контакт с ингибитор GPR174.

365. Способ из любого из параграфов 337-364, где уровень cAMP уменьшен по меньшей мере на 20% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174.

366. Способ из параграфа 365, где продукция одного или нескольких из IL-2, INF- γ , TNF- α и GM-CSF увеличена по меньшей мере на 20% в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC), приведенных в контакт с ингибитором GPR174 и антагонистом A2A, антагонистом A2B или их комбинациями, по сравнению с контрольными клетками, не приведенными в контакт с ингибитором GPR174.

367. Способ увеличения уровня Th1-цитокинов в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) человека, включающий приведение в контакт PBMC человека с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174 и по меньшей мере одним из антагониста рецептора аденозина-A2A (A2A), антагониста рецептора аденозина-A2B (A2B) или их комбинацией.

368. Способ из параграфа 367, дополнительно включающий приведение в контакт PBMC человека с ослабляющим Т-рег средством.

369. Способ из параграфа 368, где ослабляющее Т-рег средство связывает один или несколько из GITR, CTLA-4, CD25, LAG3, TIGIT, NRP1, TGF- β , CCR2, CCR4, CCR8, TNFR2 или EZH2.

370. Способ из параграфа 369, где ослабляющее Т-рег средство представляет собой малую молекулу.

371. Способ из параграфа 369, где ослабляющее Т-рег средство представляет собой антитело против GITR, против CTLA-4, против CD25, против LAG3, против TIGIT, против NRP1, против TGF- β , против CCR2, против CCR4, против CCR8, против TNFR2 или против EZH2.

372. Способ из параграфа 367, где приведение в контакт осуществляют *in vivo*.

373. Способ из параграфа 367, где приведение в контакт осуществляют *in vitro*.

374. Способ из параграфа 367, где PBMC содержат иммунциты.

375. Способ из параграфа 367, где PBMC содержат Т-клетки или НК-клетки.

376. Способ по любому из параграфов 367-375, где уровень по меньшей мере одного из IFN- γ , IL-2, TNF или GM-CSF увеличен по меньшей мере на 20%.

377. Фармацевтическая композиция, включающая комбинацию ингибитора передачи сигналов GPR174 и по меньшей мере одного из антагониста рецептора аденозина-

A2A (A2A) антагониста рецептора аденозина-A2B (A2B), ингибитора CD73 и/или ингибитора CD38, или ингибитора CD39, и фармацевтически приемлемый наполнитель.

378. Композиция из параграфа 377, где ингибитор GPR174 представляет собой антитело, которое специфически связывает GPR174.

379. Композиция из параграфа 377, где ингибитор GPR174 представляет собой малую молекулу.

380. Фармацевтическая композиция из параграфа 379, где низкомолекулярный ингибитор GPR174 не содержит алкильную цепь, содержащую 10 или более атомов С.

381. Фармацевтическая композиция из параграфа 377, где ингибитор GPR174 не представляет собой пепдуцин, LysoPS или соединение, описанное в US20150361119A1.

382. Фармацевтическая композиция из параграфа 379, где ингибитор GPR174 имеет молекулярную массу от приблизительно 50 Да до приблизительно 2500 Да.

383. Фармацевтическая композиция из параграфа 379, где ингибитор GPR174 имеет молекулярную массу от приблизительно 50 Да до приблизительно 800 Да.

384. Фармацевтическая композиция из параграфа 377, где ингибитор GPR174 конкурентно связывается с GPR174 по сравнению с любым из соединений 1-59.

385. Фармацевтическая композиция из любого из параграфов 377-384, где композиция дополнительно содержит ослабляющее Т-рег средство.

386. Фармацевтическая композиция из параграфа 385, где ослабляющее Т-рег средство связывает один или несколько из GITR, CTLA-4, CD25, LAG3, TIGIT, NRP1, TGF- β , CCR2, CCR4, CCR8, TNFR2 и/или EZH2.

387. Композиция из параграфа 386, где ослабляющее Т-рег средство представляет собой малую молекулу.

388. Композиция из параграфа 387, где ослабляющее Т-рег средство представляет собой антитело против GITR, против CTLA-4, против CD25, против LAG3, против TIGIT, против NRP1, против TGF- β , против CCR2, против CCR4, против CCR8, против TNFR2 и/или против EZH2.

387. Фармацевтическая композиция, включающая терапевтически эффективное количество комбинации ингибирующего GPR174 соединения и ослабляющего Т-рег средства в фармацевтически приемлемом носителе.

388. Композиция из параграфа 387, где ослабляющее Т-рег средство связывает один или несколько из GITR, CTLA-4, CD25, LAG3, TIGIT, NRP1, TGF- β , CCR2, CCR4, CCR8, TNFR2 и/или EZH2.

389. Композиция из параграфа 388, где ослабляющее Т-рег средство представляет собой малую молекулу.

390. Композиция из параграфа 388, где ослабляющее Т-рег средство представляет собой антитело против GITR, против CTLA-4, против CD25, против LAG3, против TIGIT, против NRP1, против TGF- β , против CCR2, против CCR4, против CCR8, против TNFR2 и/или против EZH2.

391. Композиция по любому из параграфов 387-390, где композиция дополнительно содержит по меньшей мере один из: антагониста рецептора аденозина A2A, антагониста рецептора аденозина A2B, ингибитора CD73 и/или ингибитора CD38, и/или ингибитора CD39.

392. Композиция по любому из параграфов 377-391, где указанная композиция находится в единичной дозированной форме.

393. Композиция по любому из параграфов 385-392, где композицию составляют для перорального, внутривенного, внутривентриального, внутримышечного, местного, ректального, кожного, подкожного, назального введения, введения в кожу (например, в форме чрескожного пластыря), интрацеребровентрикулярного, интрапаренхимного, интратекального, ингаляционного, интракраниального или глазного введения.

394. Способ усиления противоопухолевого иммунного ответа у субъекта, которого в настоящее время подвергают или подвергали лечению с использованием по меньшей мере одного из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, включающий введение эффективного количества ингибитора GPR174 для стимуляции усиленного противоопухолевого иммунного ответа у субъекта.

395. Способ из параграфа 394, где субъекта в настоящее время подвергают или подвергали лечению с использованием антагониста рецептора аденозина-A2A или антагониста рецептора аденозина-A2B, или их комбинация.

396. Способ из параграфа 394, где субъекта в настоящее время подвергают или подвергали лечению с использованием ослабляющего T-рег средства.

397. Способ из параграфа 396, где ослабляющее T-рег средство связывает один или несколько из GITR, CTLA-4, CD25, LAG3, TIGIT, NRP1, TGF- β , CCR2, CCR4, CCR8, TNFR2 и/или EZH2.

398. Способ из параграфа 394, 395 или 396, где ингибитор передачи через GPR174 сигналов Gs представляет собой низкомолекулярный ингибитор или антитело, которое специфически связывает GPR174.

399. Способ из параграфа 398, где малая молекула представляет собой обратный агонист передачи сигналов GPR174.

400. Способ из параграфа 398, где малая молекула представляет собой антагонист передачи сигналов GPR174.

401. Способ из параграфа 398, где низкомолекулярный ингибитор GPR174 ингибирует зависимую от PS, LysoPS или пепдуцина активацию передачи сигналов GPR174 в клетке, экспрессирующей GPR174, по меньшей мере на 25%.

402. Способ стимуляции и/или усиления иммунного ответа у субъекта-млекопитающего, страдающего от или подверженного риску развития злокачественной опухоли или метастазирования злокачественной опухоли, включающий:

(a) определение присутствия происходящих из клеток злокачественной опухоли

экзосомы(экзосом), экспрессирующих фосфатидилсерин (PS), в образце, полученном от указанного субъекта-млекопитающего; и

(b) введение терапевтически эффективного количества ингибитора GPR174 указанному субъекту.

403. Способ из параграфа 402, где ингибитор GPR174 представляет собой малую молекулу, ингибирующее опосредованную PS иммуносупрессию.

404. Способ из параграфа 402, где образец представляет собой ткань, клетку или экстракт клеток, или жидкость, выбранную из группы, состоящей из крови, сыворотки, плазмы, мокроты, мочи, слюны и слез.

405. Способ из параграфа 402, где стадия (a) включает приведение в контакт указанного образца с связывающим PS средством и таким образом, определение присутствия указанной происходящей из клеток злокачественной опухоли экзосомы(экзосом).

406. Способ из параграфа 402, где указанная происходящая из клетки злокачественной опухоли экзосома(экзосомы), экспрессирующая PS, происходит из клетки рака легкого, клетки рака поджелудочной железы, клетки рака яичника, клетки рака молочной железы, клетки рака ободочной кишки, клетки рака почки, клетки рака печени, клетки рака кожи, клетки злокачественной опухоли мозга, клетки рака головы и шеи или клетки рака щитовидной железы.

407. Способ из любого из параграфов 402-406, где способ дополнительно включает введение указанному субъекту по меньшей мере одного из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения злокачественной опухоли, включающий введение пациенту терапевтически эффективного количества ингибитора GPR174, ингибирующего передачу через GPR174 сигналов G-альфа-s, таким образом, стимуляции иммунного ответа у пациента.

2. Способ по п.1, где GPR174, экспрессированный на иммунocyтах, приводят в контакт с фосфатидилсерином (PS) или лизофосфатидилсерином (lysoPS) в микроокружении опухолей или ассоциированных лимфоидных тканей, и где указанный ингибитор GPR174 ингибирует опосредованную PS или lysoPS передачу сигналов GPR174.

3. Способ по п.1 или 2, где злокачественная опухоль содержит живые клетки, умирающие клетки или внеклеточные везикулы, имеющие фосфатидилсерин (PS) на своей поверхности.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где пациент представляет собой пациента-млекопитающего.

5. Способ по любому из пп. 1-4, дополнительно включающий введение по меньшей мере одного дополнительного средства, выбранного из группы, состоящей из:

i. антагониста рецептора аденозина-A2A (A2A);

ii. антагониста рецептора аденозина-A2B (A2B);

iii. ингибитора CD73;

iv. ингибитора CD38;

v. ингибитора CD39; или

vi. ослабляющего T-рег средства, где ингибитор GPR174 и по меньшей мере одно дополнительное средство вводят одновременно, или последовательно в любом порядке, при условии, что эффекты первого вышеупомянутого ингибитора или антагониста остаются присутствующими на время введения второго ингибитора или антагониста.

6. Способ по п.5, где дополнительное средство представляет собой антагонист рецептора аденозина-A2A, антагонист рецептора аденозина-A2B или их комбинации.

7. Способ по п.5 или 6, где дополнительное средство представляет собой ослабляющее T-рег средство.

8. Способ по п.7, где ослабляющее T-рег средство связывает один или несколько из GITR, CTLA-4, CD25, LAG3, TIGIT, NRP1, TGF- β , CCR2, CCR4, CCR8, TNFR2 или EZH2.

9. Способ по любому из пп. 5-8, где ослабляющее T-рег средство представляет собой малую молекулу.

10. Способ по любому из пп. 5-8, где ослабляющее T-рег средство представляет собой антитело против GITR, против CTLA-4, против CD25, против LAG3, против TIGIT, против NRP1, против TGF- β , против CCR2, против CCR4, против CCR8, против TNFR2 или против EZH2.

11. Способ по любому из пп. 1-10, где ингибитор GPR174 представляет собой низкомолекулярный ингибитор GPR174 или антитело, которое специфически связывает

GPR174.

12. Способ по п.11, где низкомолекулярный ингибитор GPR174 представляет собой обратный агонист передачи сигналов GPR174.

13. Способ по п.11, где низкомолекулярный ингибитор GPR174 представляет собой антагонист передачи сигналов GPR174.

14. Способ по п.11, где низкомолекулярный ингибитор GPR174 ингибирует зависимость от PS, LysoPS или пептида активацию передачи сигналов GPR174 в клетке, экспрессирующей GPR174, по меньшей мере на 25%.

15. Способ по любому из пп. 1-14, где стимулированный иммунный ответ включает опосредованный Т-клетками иммунный ответ.

16. Способ по п.15, где опосредованный Т-клетками иммунный ответ включает продукцию Th1-цитокинов.

17. Способ по п.15, где опосредованный Т-клетками иммунный ответ включает супрессию активности, дифференцировки, роста, пролиферации Т-рег или их комбинаций.

18. Способ по п.15, где опосредованный Т-клетками иммунный ответ включает стимуляцию активности, дифференцировки, роста, пролиферации Т-эффектора или их комбинаций.

19. Способ по п.15, где опосредованный Т-клетками иммунный ответ включает стимуляцию активности, дифференцировки, роста, пролиферации Th1-клетки или их комбинаций.

20. Способ по п.15, где опосредованный Т-клетками иммунный ответ включает супрессию активности, дифференцировки, роста, пролиферации Th17-клетки или их комбинаций.

21. Способ по п.1, где стимулированный иммунный ответ включает уменьшение экспрессии ассоциированного с иммуноцитами или злокачественными клетками лиганда 1 программируемой смерти (PD-L1) или экспрессии ассоциированного с цитотоксическими Т-лимфоцитами антигена 4 (CTLA4), или экспрессии Т-клеточного иммунорецептора с доменами Ig и ITIM (TIGIT), или экспрессии амфирегулина (AREG).

22. Способ по п.1, где стимулированный иммунный ответ включает опосредованный NK-клетками иммунный ответ.

23. Способ по любому из пп. 15-22, где по меньшей мере часть Т-клеток или NK-клеток экспрессируют GPR174.

24. Способ по любому из пп. 1-23, где злокачественная опухоль представляет собой солидную опухоль.

25. Способ по любому из пп. 1-23, где злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль клеток крови.

26. Способ по п.24, где опухоль инфильтрована лимфоцитами, экспрессирующими GPR174.

27. Способ по любому из пп. 1-25, где пациент представляет собой человека.

28. Способ по любому из пп. 1-27, где активность, дифференцировку,

пролиферацию, рост Т-клетки или их комбинацию стимулируют в популяции мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) приводят в контакт с ингибитором GPR174, по сравнению с контрольной популяцией PBMC, не приведенной в контакт с ингибитором GPR174.

29. Способ по любому из пп. 1-28, где уровень cAMP уменьшен по меньшей мере на 20% в клетке, экспрессирующей GPR174, приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174, по сравнению с контрольной клеткой, экспрессирующей GPR174, не приведенной в контакт с низкомолекулярным ингибитором GPR174.

30. Способ по п.28, где продукция одного или нескольких из IL-2, INF- γ , TNF- α и GM-CSF увеличена по меньшей мере на 20% в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC), приведенных в контакт с ингибитором GPR174 и антагонистом A2A, антагонистом A2B или их комбинации по сравнению с контрольными клетками, не приведенными в контакт с ингибитором GPR174.

31. Способ увеличения уровня Th1-цитокинов в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) человека, включающий приведение в контакт PBMC человека с низкомолекулярным ингибитором передачи сигналов GPR174 и по меньшей мере одним из антагониста рецептора аденозина-A2A (A2A), антагониста рецептора аденозина-A2B (A2B) или их комбинацией.

32. Способ по п.31, дополнительно включающий приведение в контакт PBMC человека с ослабляющим Т-рег средством.

33. Способ по п.32, где ослабляющее Т-рег средство связывает один или несколько из GITR, CTLA-4, CD25, LAG3, TIGIT, NRP1, TGF- β , CCR2, CCR4, CCR8, TNFR2 или EZH2.

34. Способ по п.33, где ослабляющее Т-рег средство представляет собой малую молекулу.

35. Способ по п.33, где ослабляющее Т-рег средство представляет собой антитело против GITR, против CTLA-4, против CD25, против LAG3, против TIGIT, против NRP1, против TGF- β , против CCR2, против CCR4, против CCR8, против TNFR2 или против EZH2.

36. Способ по п.31, где приведение в контакт осуществляют *in vivo*.

37. Способ по п.31, где приведение в контакт осуществляют *in vitro*.

38. Способ по п.31, где PBMC содержат иммуноциты.

39. Способ по п.31, где PBMC содержат Т-клетки или НК-клетки.

40. Способ по любому из пп. 31-39, где уровень по меньшей мере одного из IFN- γ , IL-2, TNF или GM-CSF увеличен по меньшей мере на 20%.

41. Фармацевтическая композиция, включающая комбинацию ингибитора передачи сигналов GPR174 и по меньшей мере одного из антагониста рецептора аденозина-A2A (A2A) антагониста рецептора аденозина-A2B (A2B), ингибитора CD73 и/или ингибитора CD38, или ингибитора CD39 и фармацевтически приемлемый наполнитель.

42. Композиция по п.41, где ингибитор GPR174 представляет собой антитело, которое специфически связывает GPR174.
43. Композиция по п.41, где ингибитор GPR174 представляет собой малую молекулу.
44. Фармацевтическая композиция по п.43, где низкомолекулярный ингибитор GPR174 не содержит алкильную цепь, содержащую 10 или более атомов С.
45. Фармацевтическая композиция по п.41, где ингибитор GPR174 не представляет собой пептидин, LysoPS, или соединение, описанное в US20150361119A1.
46. Фармацевтическая композиция по п.43, где ингибитор GPR174 имеет молекулярную массу от приблизительно 50 Да до приблизительно 2500 Да.
47. Фармацевтическая композиция по п.43, где ингибитор GPR174 имеет молекулярную массу от приблизительно 50 Да до приблизительно 800 Да.
48. Фармацевтическая композиция по п.41, где ингибитор GPR174 конкурентно связывается с GPR174, по сравнению с любым из соединений 1-59.
49. Фармацевтическая композиция по любому из пп. 41-48, где композиция дополнительно содержит ослабляющее T-рег средство.
50. Фармацевтическая композиция по п.49, где ослабляющее T-рег средство связывает один или несколько из GITR, CTLA-4, CD25, LAG3, TIGIT, NRP1, TGF- β , CCR2, CCR4, CCR8, TNFR2 и/или EZH2.
51. Композиция по п.50, где ослабляющее T-рег средство представляет собой малую молекулу.
52. Композиция по п.50, где ослабляющее T-рег средство представляет собой антитело против GITR, против CTLA-4, против CD25, против LAG3, против TIGIT, против NRP1, против TGF- β , против CCR2, против CCR4, против CCR8, против TNFR2, и/или против EZH2.
53. Фармацевтическая композиция, включающая терапевтически эффективное количество комбинации ингибирующего GPR174 соединения и ослабляющего T-рег средства в фармацевтически приемлемом носителе.
54. Композиция по п.53, где ослабляющее T-рег средство связывает один или несколько из GITR, CTLA-4, CD25, LAG3, TIGIT, NRP1, TGF- β , CCR2, CCR4, CCR8, TNFR2 и/или EZH2.
55. Композиция по п.54, где ослабляющее T-рег средство представляет собой малую молекулу.
56. Композиция по п.54, где ослабляющее T-рег средство представляет собой антитело против GITR, против CTLA-4, против CD25, против LAG3, против TIGIT, против NRP1, против TGF- β , против CCR2, против CCR4, против CCR8, против TNFR2 и/или против EZH2.
57. Композиция по любому из пп.53-56, где композиция дополнительно содержит по меньшей мере один из: антагониста рецептора аденозина A2A, антагониста рецептора аденозина A2B, ингибитора CD73 и/или ингибитора CD38, и/или ингибитор CD39.

58. Композиция по любому из пп.41-57, где указанная композиция представляет собой единичную дозированную форму.

58. Композиция по любому из пп.51-58, где композицию составляют для перорального, внутривенного, внутривентриального, внутримышечного, местного, ректального, кожного, подкожного, назального введения, введения в кожу (например, в форме чрескожного пластыря), интрацеребровентрикулярного, интрапаренхимного, интратекального, ингаляционного, интракраниального или глазного введения.

59. Способ усиления противоопухолевого иммунного ответа у субъекта, которого в настоящее время подвергают или подвергали лечению с использованием по меньшей мере одного из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства, включающий введение эффективного количества ингибитора GPR174 для стимуляции усиленного противоопухолевого иммунного ответа у субъекта.

60. Способ по п.59, где субъекта в настоящее время подвергают или подвергали лечению с использованием антагониста рецептора аденозина-A2A или антагониста рецептора аденозина-A2B, или их комбинации.

61. Способ по п.59, где субъекта в настоящее время подвергают или подвергали лечению с использованием ослабляющего T-рег средства.

62. Способ по п.61, где ослабляющее T-рег средство связывает один или несколько из GITR, CTLA-4, CD25, LAG3, TIGIT, NRP1, TGF- β , CCR2, CCR4, CCR8, TNFR2 и/или EZH2.

63. Способ по п.59, 60 или 61, где ингибитор передачи через GPR174 сигналов Gs представляет собой низкомолекулярный ингибитор или антитело, которое специфически связывает GPR174.

64. Способ по п.63, где малая молекула представляет собой обратный агонист передачи сигналов GPR174.

65. Способ по п.63, где малая молекула представляет собой антагонист передачи сигналов GPR174.

66. Способ по п.63, где низкомолекулярный ингибитор GPR174 ингибирует зависимость от PS, LysoPS или пептида активацию передачи сигналов GPR174 в клетке, экспрессирующей GPR174, по меньшей мере на 25%.

67. Способ стимуляции и/или усиления иммунного ответа у субъекта-млекопитающего, страдающего от или подверженного риску развития злокачественной опухоли или метастазирования злокачественной опухоли, включающий:

(а) определение присутствия происходящих из клеток злокачественной опухоли экзосомы(экзосом) экспрессирующих фосфатидилсерин (PS), в образце, полученном от указанного субъекта-млекопитающего; и

(б) введение терапевтически эффективного количества ингибитора GPR174 указанному субъекту.

68. Способ по п.67, где ингибитор GPR174 представляет собой малую молекулу,

ингибирующую опосредованную PS иммуносупрессию.

69. Способ по п.67, где образец представляет собой ткань, клетку или экстракт клеток, или жидкость, выбранную из группы, состоящей из крови, сыворотки, плазмы, мокроты, мочи, слюны и слез.

70. Способ по п.67, где стадия (а) включает приведение в контакт указанного образца с связывающим PS средством и таким образом, определение присутствия указанной происходящей из клеток злокачественной опухоли экзосомы(экзосом).

71. Способ по п.67, где указанная происходящая из клетки злокачественной опухоли экзосома(экзосомы), экспрессирующая PS, происходит из клетки рака легкого, клетки рака поджелудочной железы, клетки рака яичника, клетки рака молочной железы, клетки рака ободочной кишки, клетки рака почки, клетки рака печени, клетки рака кожи, клетки злокачественной опухоли мозга, клетки рака головы и шеи или клетки рака щитовидной железы.

72. Способ по любому из пп. 67-71, где способ дополнительно включает введение указанному субъекту по меньшей мере одного из антагониста A2aR, антагониста A2bR, ингибитора CD38, ингибитора CD39, ингибитора CD73 и/или ослабляющего T-рег средства.

Белок GPR174 человека NP_115942.1
(SEQ ID NO:1)

MPANYTCTRPDGDNTDFRYFIYAVTYTVILVPGLIGNILALWVFYGYMKETKRAVIFMINLAIADLLQVL
SLPLRIFYYLNHDWPFPGGLCMFCFYLYVNMYASIIYFLVCISVRRFWFLMYPFRFHDCCKQKYDLYISIA
GWLIIICLACVLFPLLRTSDDTSGNRTKCFVDLPTRNVNLAQSVMMTIGELIGFVTPLLIVLYCTWKTVL
SLQDKYPMAQDLGEKQKALKMILTCAGVFLICFAPYHFSFPLDFLVKSNEIKSCLARRVILIFHSVALCL
ASLNSCLDPVIYYFSTNEFRRRLSRQDLHDSIQLHAKSFVSNHTASTMTPELC

ФИГ. 1А

кДНК GPR174 человека NP_115942.1 (NM_032553.1), SEQ ID NO:2

CACCATTAGGCAAAGATAGTTTCTCTAGAGAGAATCATGCCTGCTAATTACACGTGTACCAGGCCAGATGG
AGACAATACAGATTTTCGATACTTTATTTATGCAGTGACATACTGTCATTCTTGTGCCAGGTCTCATAG
GGAATATATTAGCCCTGTGGGTATTCTATGGTTATATGAAAGAAACAAAACGAGCTGTGATATTTATGATA
AACTTAGCCATTGCTGACTTACTACAAGTTCTTTCCTTGCCACTGAGGATCTTCTACTACTTGAATCATGA
CTGGCCATTTGGGCCTGGTCTCTGCATGTTCTGTTTCTACCTGAAGTATGTCAACATGTATGCAAGCATCT
ACTTCTTGGTCTGCATCAGTGTGCGACGATTTTGGTTTCTCATGTACCCCTTTCGCTTCCATGACTGCAA
CAGAAATATGACCTGTACATCAGCATTGCTGGCTGGCTGATCATCTGCCTTGCCTGTGTACTCTTTCCT
CCTCAGAACCAGTGATGATACCTCTGGCAATAGGACCAAATGCTTTGTGGATCTTCCTACCAGGAATGTCA
ACCTGGCCCAGTCCGTTGTTATGATGACCATTGGCGAGTTGATTGGGTTTGTAACCTCCGCTTCTGATTGTC
CTATATTGTACCTGGAAGACGGTTTTATCACTGCAAGATAAATATCCCATGGCCAAGATCTTGGAGAGAA
ACAGAAAGCCTTGAAGATGATTCTAACCTGTGCAGGGGTATTCTAATTTGCTTTGCACCTTATCATTTC
GTTTTCTTTAGATTTCTGGTGAAGTCCAATGAAATTTAAAGCTGCCTAGCCAGAAGGGTGATTCTAATA
TTTCATTCTGTGGCATTGTGTCTTGCTAGTCTGAATTCATGTCTTGACCCAGTCATATACTACTTTTCCAC
TAATGAGTTCCGAAGACGGCTTTCAAGACAAGATTTGCATGACAGCATCCAACCTCCATGCAAAATCCTTTG
TGAGTAACCATAACAGCTTCCACCATGACACCTGAATTATGCTAAAACAAAAACCAAACCTGAATGTGACCT
GAAATGCAAGTACATCAGAACATATCTGCAATACCCAAGCCACAGGGAAGAACTTGCAAAACAACACAGCT
TTTCAGTTCTGCTCTATCTTACTGCTATGGGGAATCACTTCTTCAAAGCAGGACCTATTTGGAGCATTAC
GATCCACGATTATTGATGTTGACATGTCCATGTAGTAATTTTTCTTCAAGT

2/106

ФИГ. 1В

Белок GPR174 мыши NP_001028423.1 (SEQ ID NO:3)

MTDNFTCNKTDGDNTDFRYFIYAVTYTVILVPGLIGNILALWVFYGYMKETKRAVVF
MINLAIADLLQILSLPLRIFYLNHDWPFPGGLCMFCFYLYVNMYSIYFLVCISV
RRFWFLMYPFRFNDCKQKYDLYISIIIGWLIICLACLLFPLLRTNDDTPGNRTKCFVD
LPIRNVNLAQSVAMITIGEVVGFVTPLMIVLYCTWKTALSQNKYPISQHLGEKKKA
LKMILTCAGVFLVCFVPYHFSFPLDFLVKSNEIKSCFARRVILIFHSVALCLASLNS
CLDPVIYYFTTNEFRRRLSRQDLPDNIQLHTKSYKIASNHATSTVAAELC

ФИГ. 1С

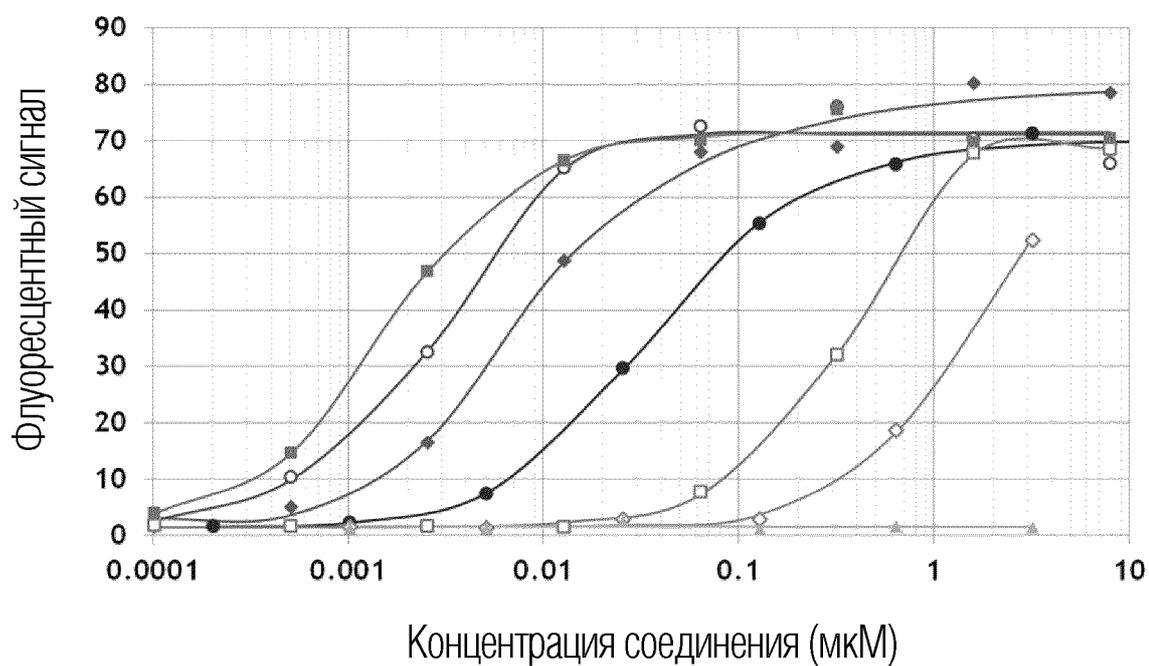
Белок GPR174 крyсы NP_001100408.1 (SEQ ID NO:4)

MTDNFTCNKTDGDNTDFRYFIYAVTYTVILVPGLIGNILALWVFGYMKETKRAVVFMINLAIADLLQIL
SLPLRIFYYLNHDWPFPGPLCMFCFYLYVNMYSIYFLVCISVRRFWFLMYPFRFNDCKQKYDLYISIV
GWLIIICLACLLFPLLRTNDDTPGNRTKCFVDLPIRNVNLAQSVAMITIGEVVGFITPLMIVLYCTWK TAL
SLQNKYPISQHLGEKKKALRMILTCAAVFLICFAPYHFSFPLDFLVKSNEIKSCLARRVILIFHSVALCL
ASLNSCLDPVIYYFTTNEFRRRLSRQELPDSIQLQTKSYKIVNNHGASPTAAELC

4/106

ФИГ. 1D

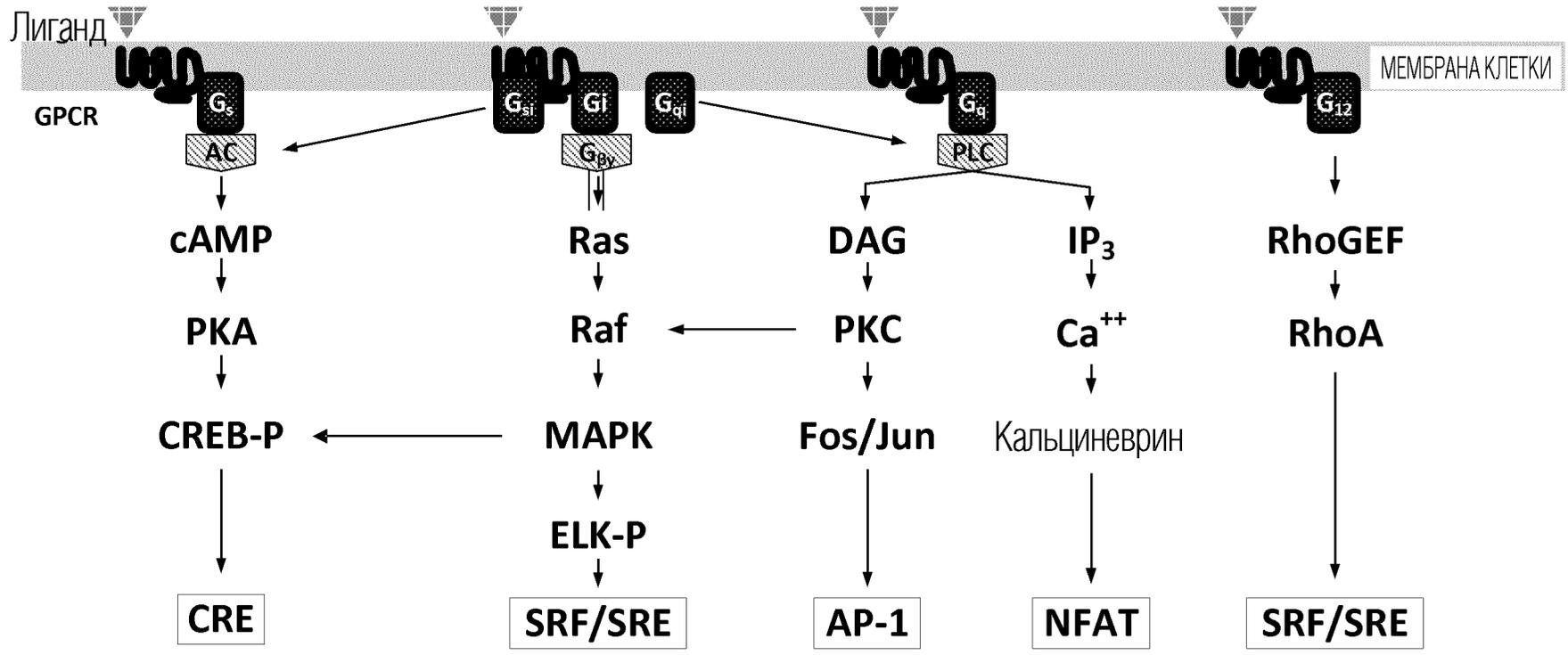
Кривые зависимости от дозы для стандартных соединений против рецептора CHRМ1



Соединение	Опубликованная активность (мкМ)
◆ Пропантелин	0.2
○ Атропин	0.5
■ Скополамин	1.0
● Пирензепин	5.0
□ nHSiD	16.0
◇ Гимбацин	60 - 120
▲ Носитель	

ФИГ. 2

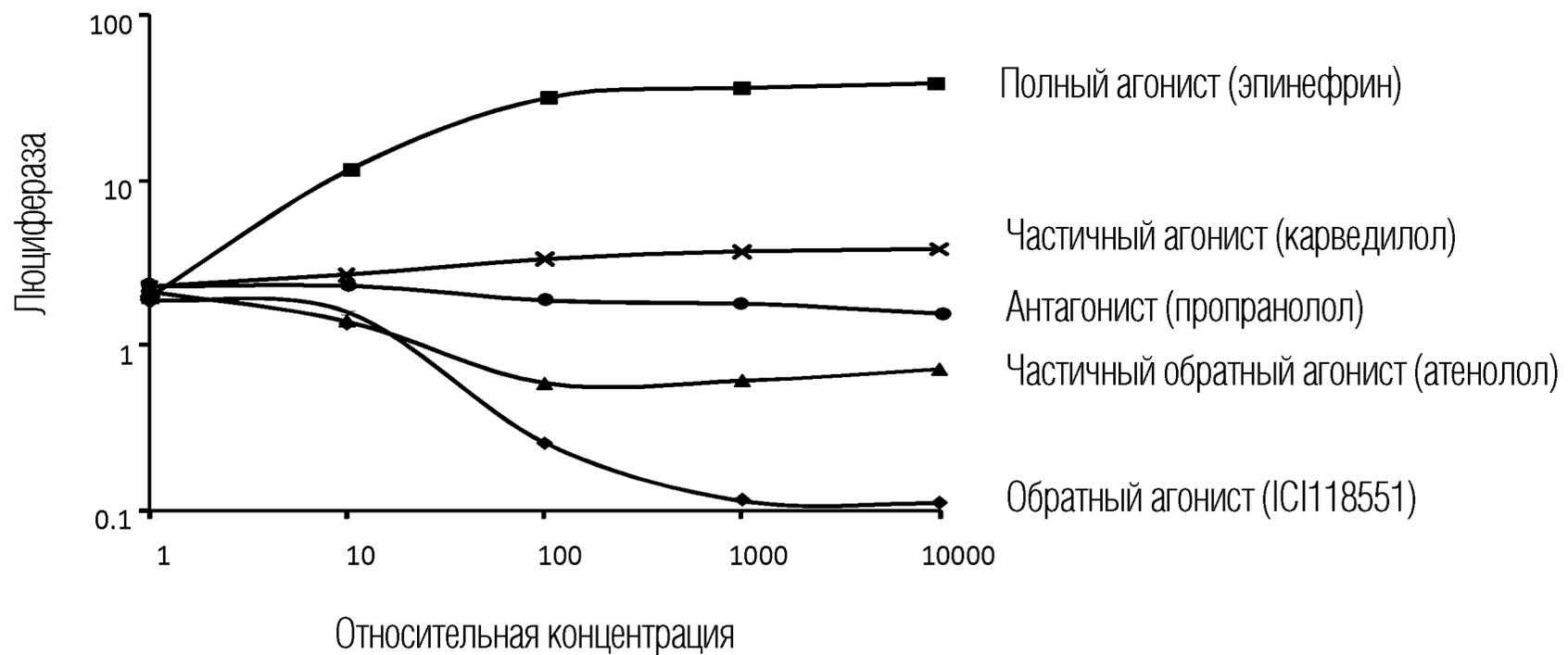
Алгоритм определения профиля передачи сигналов GPCR



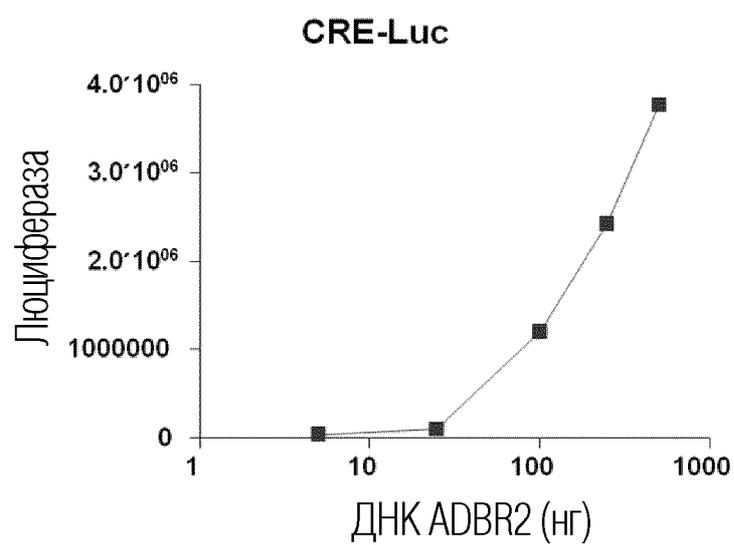
6/106

ФИГ. 3

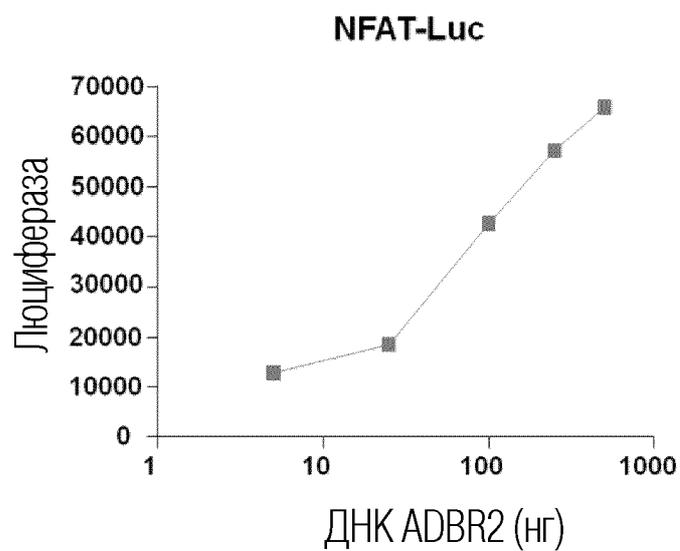
ADBR2 /CRE-Luc



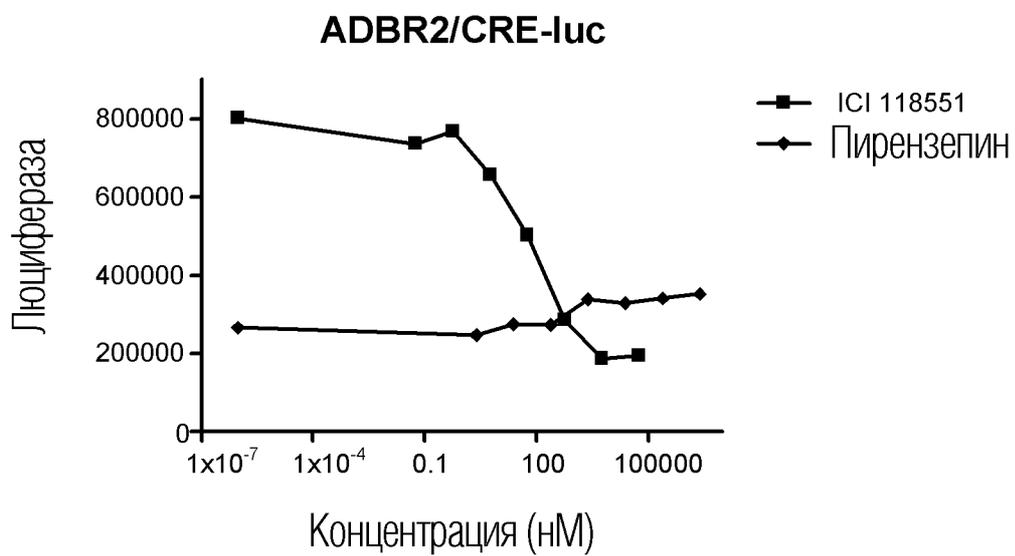
ФИГ. 4А



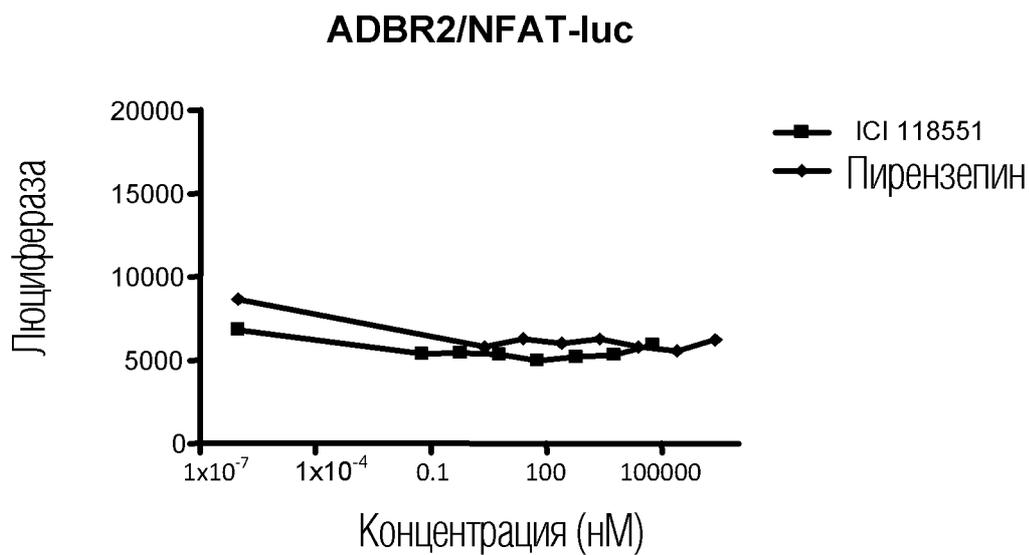
ФИГ. 4В



ФИГ. 4С



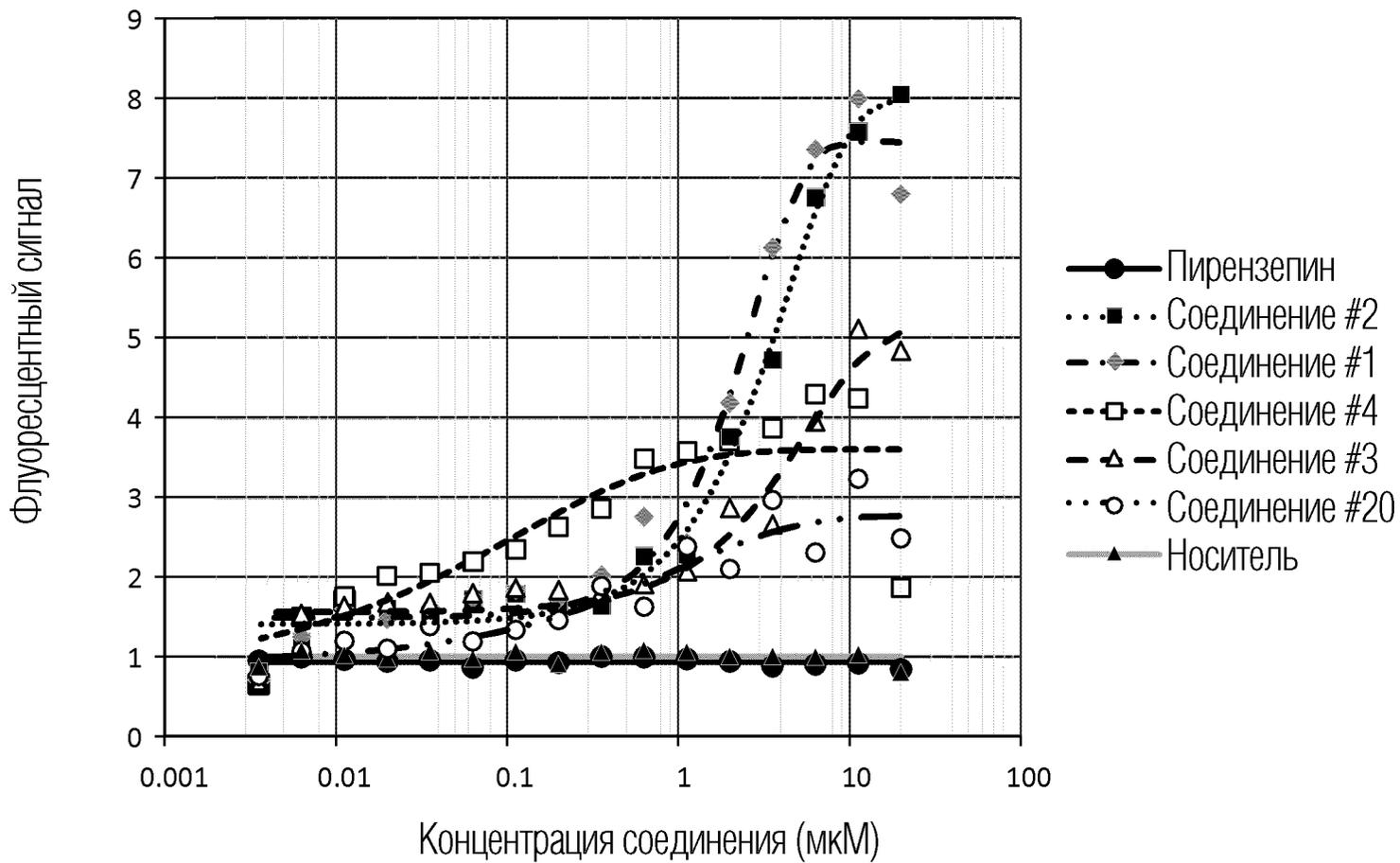
ФИГ. 4D



ФИГ. 4E

Результаты анализа CRA репрезентативных взаимодействующих с GPR174 соединений

Соединения против GPR174

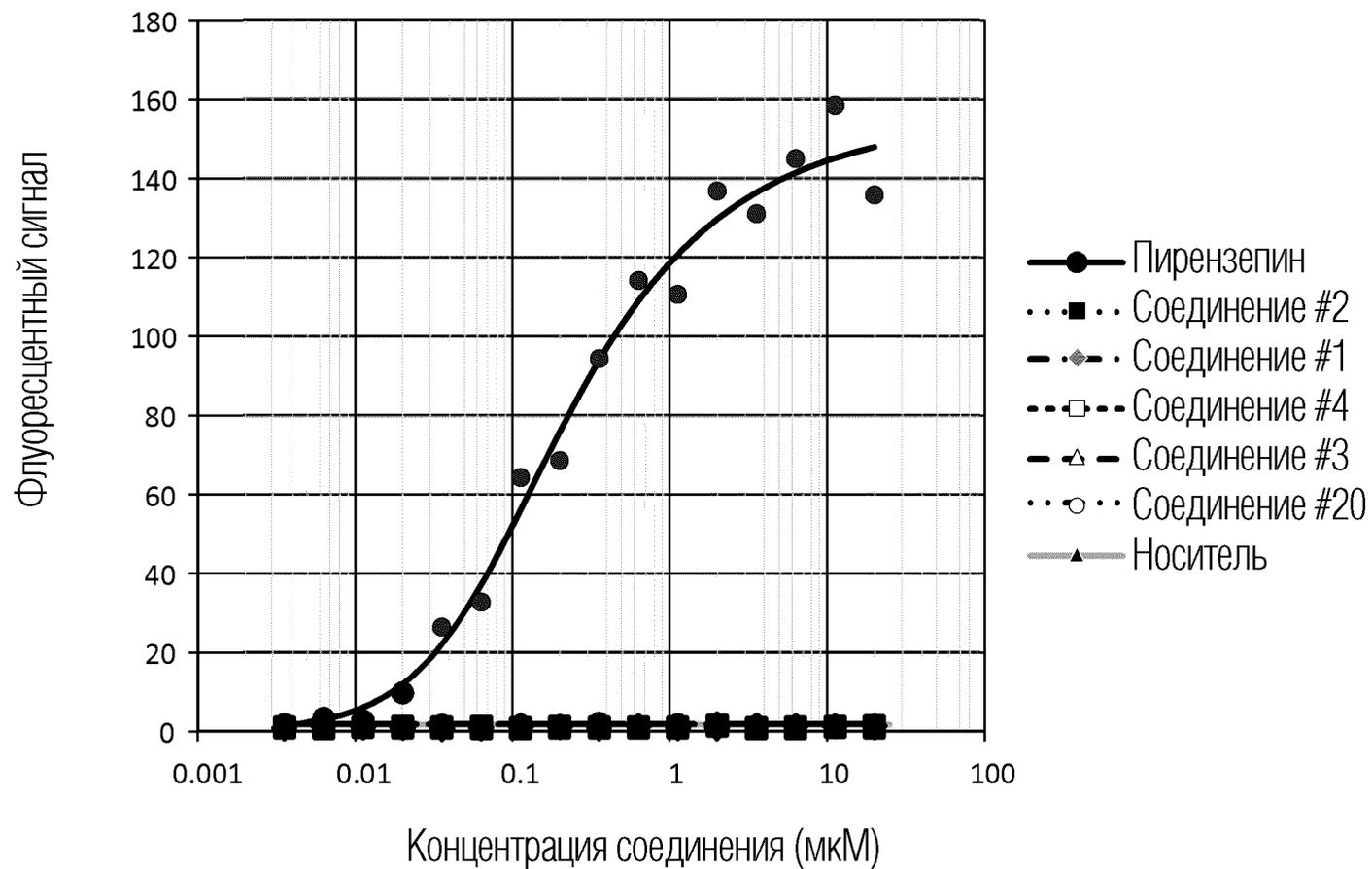


10/106

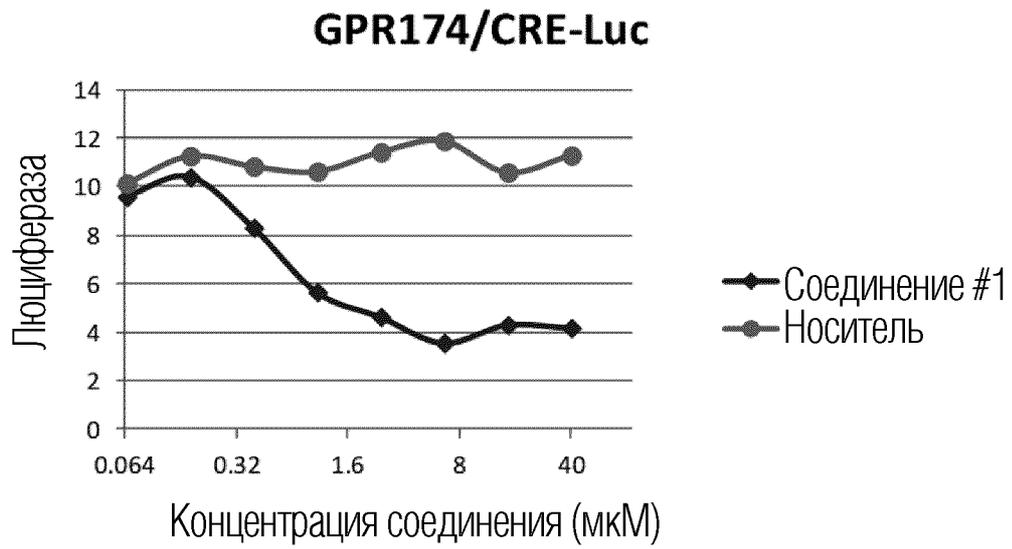
ФИГ. 5А

Результаты анализа CRA репрезентативных взаимодействующих с GPR174 соединений

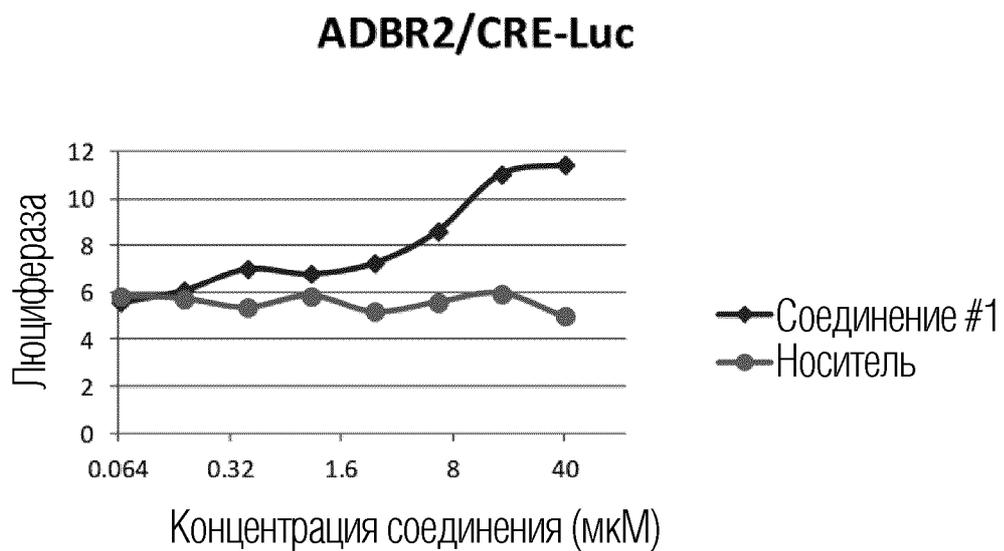
Соединения против CHRМ1



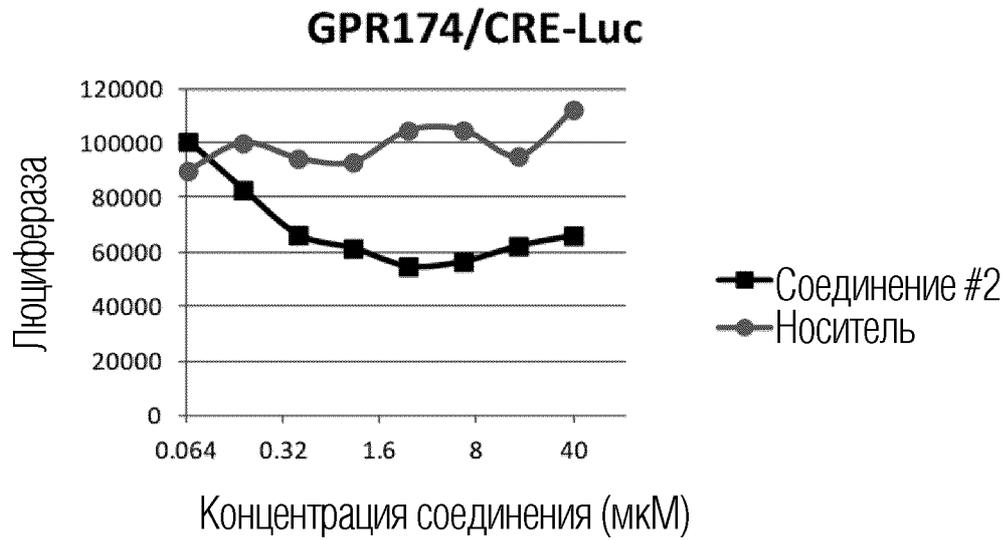
ФИГ. 5В



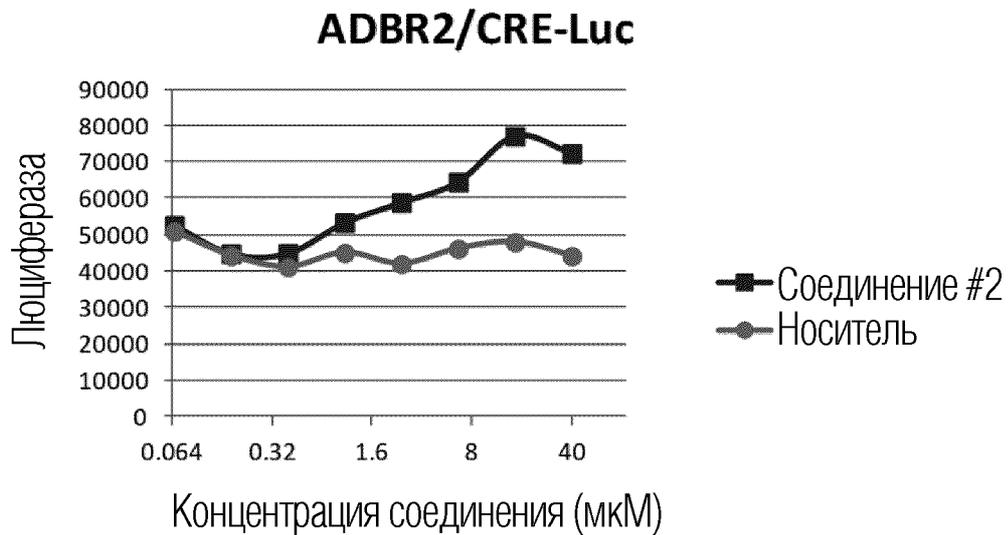
ФИГ. 6А



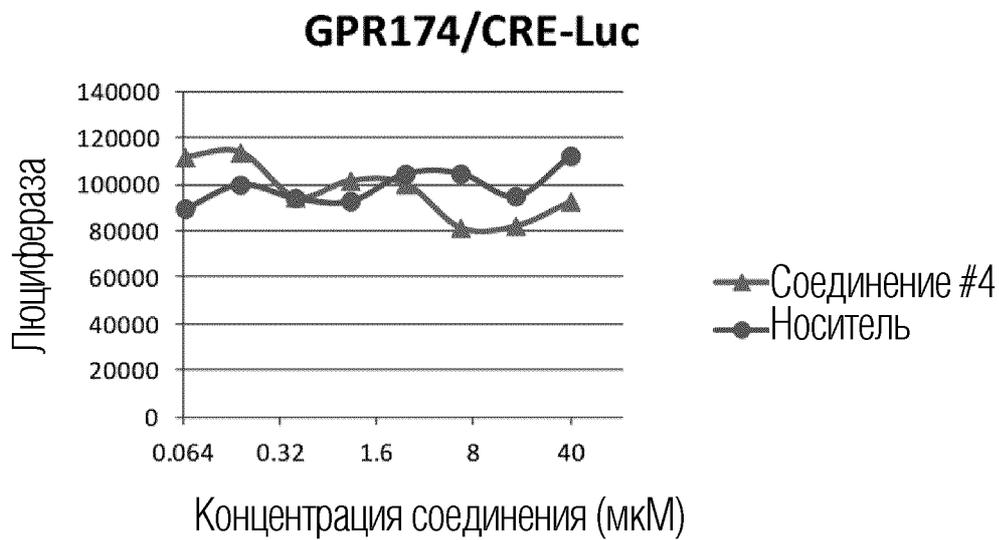
ФИГ. 6В



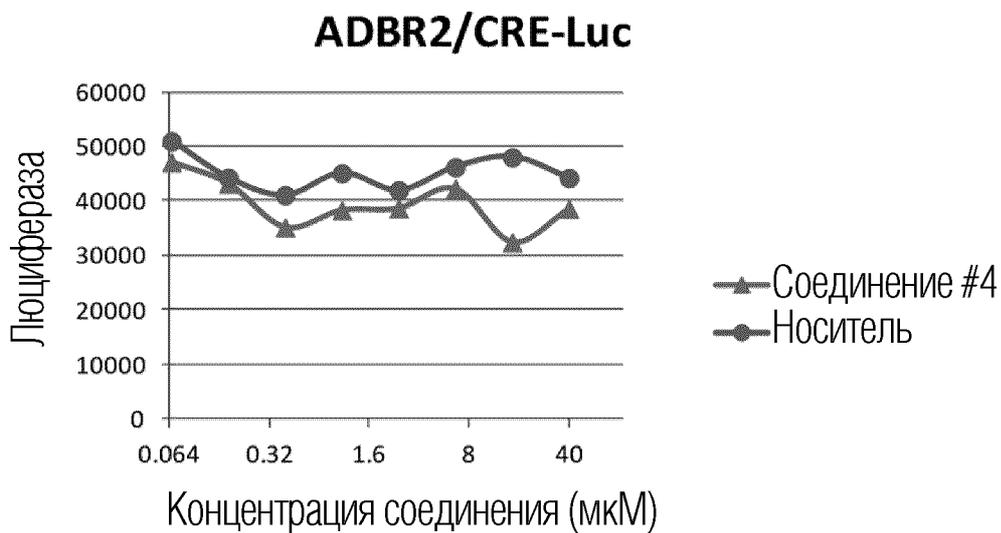
ФИГ. 7А



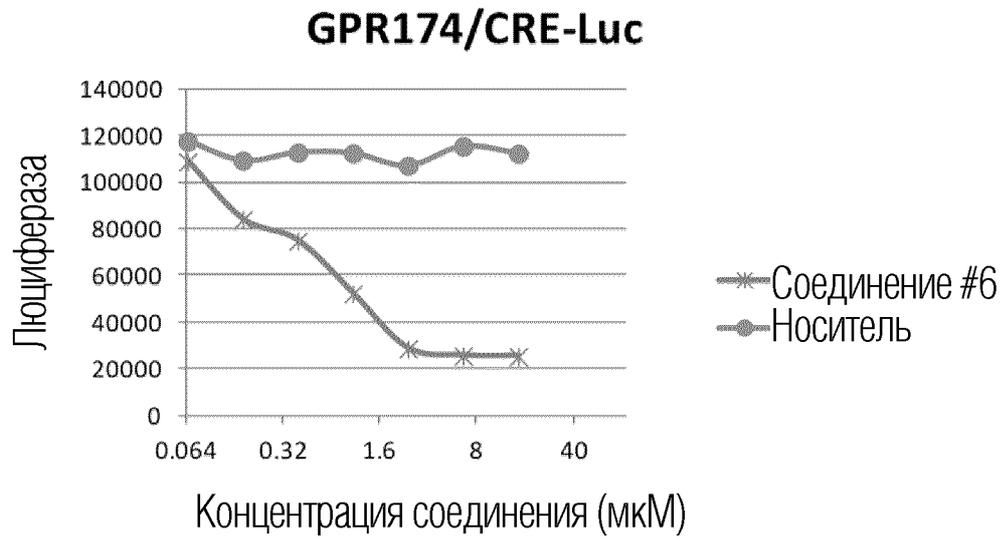
ФИГ. 7В



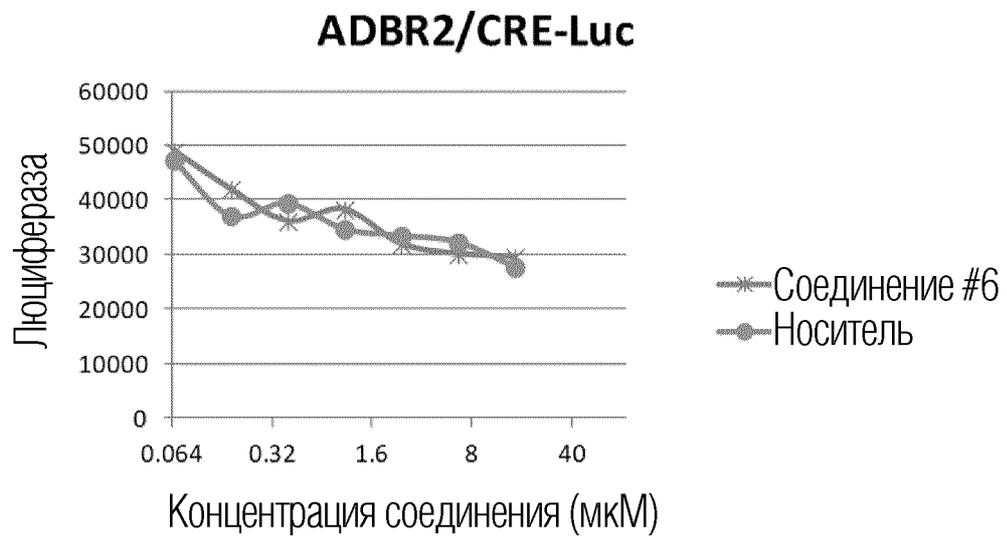
ФИГ. 8А



ФИГ. 8В

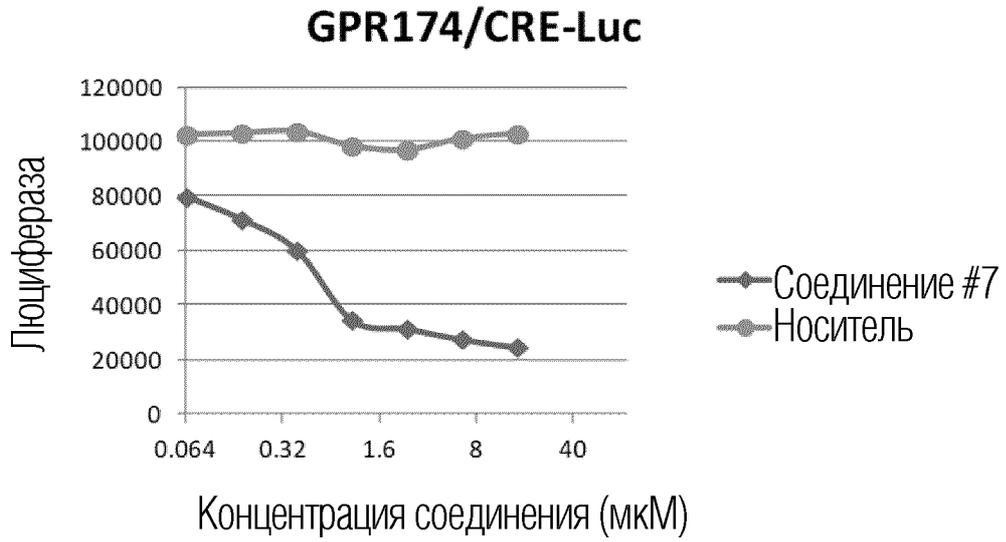


ФИГ. 9А

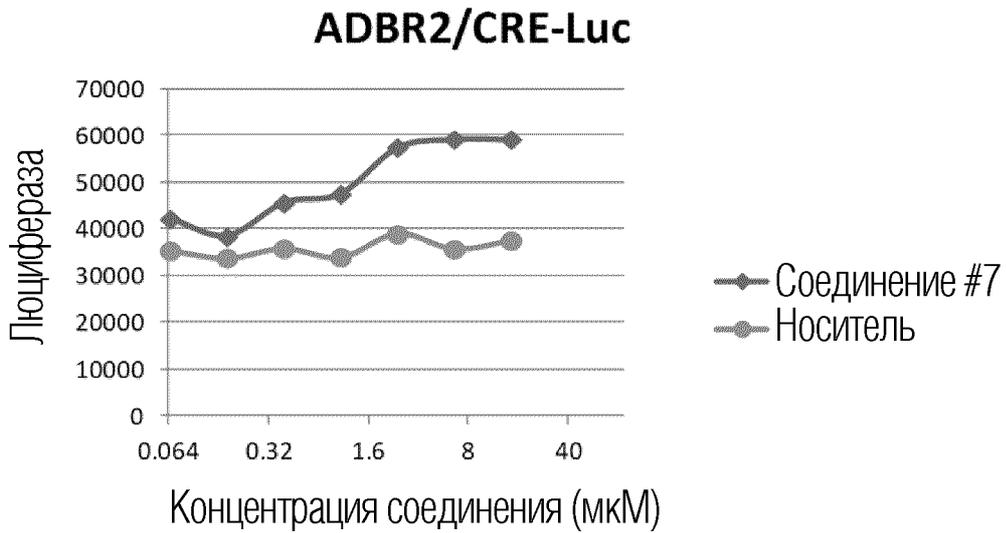


ФИГ. 9В

16/106

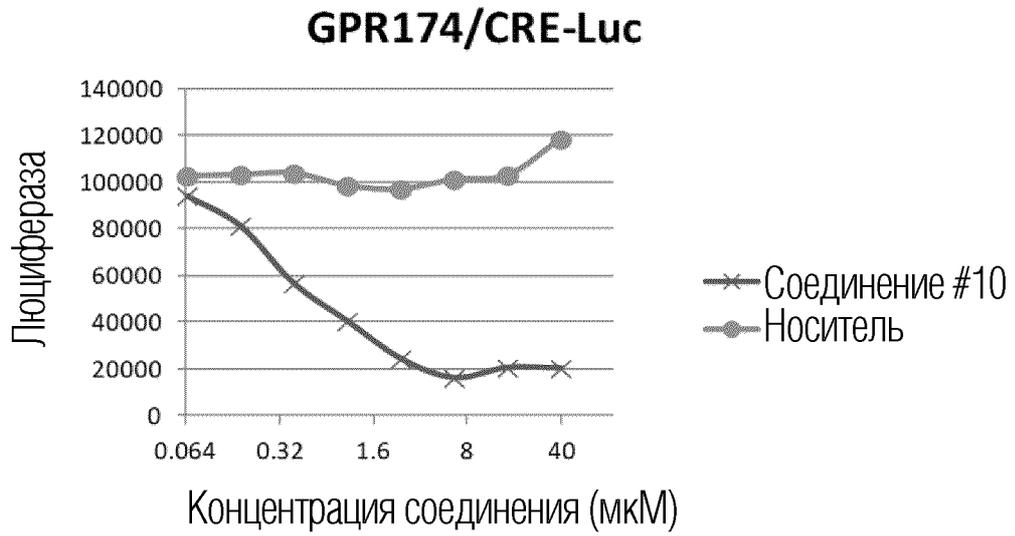


ФИГ. 10А

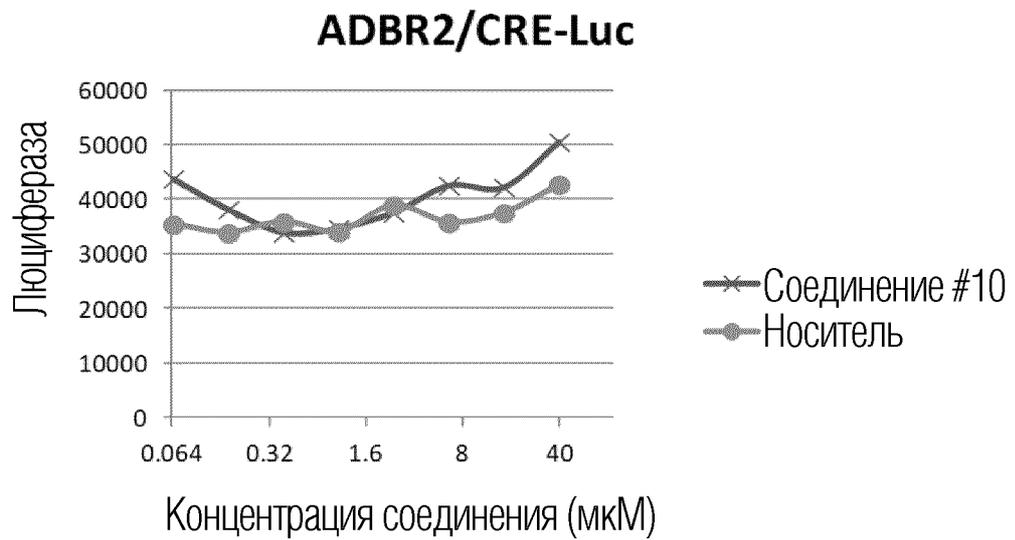


ФИГ. 10В

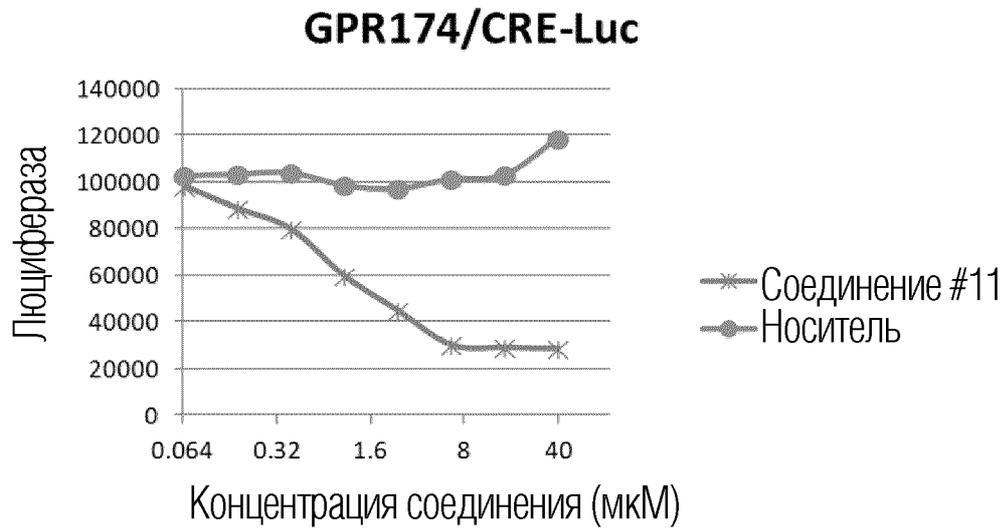
17/106



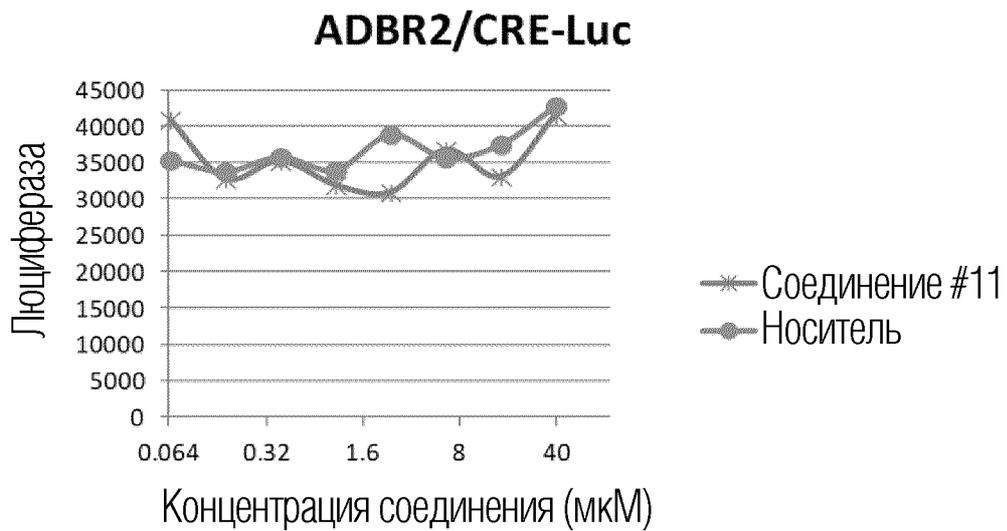
ФИГ. 11А



ФИГ. 11В

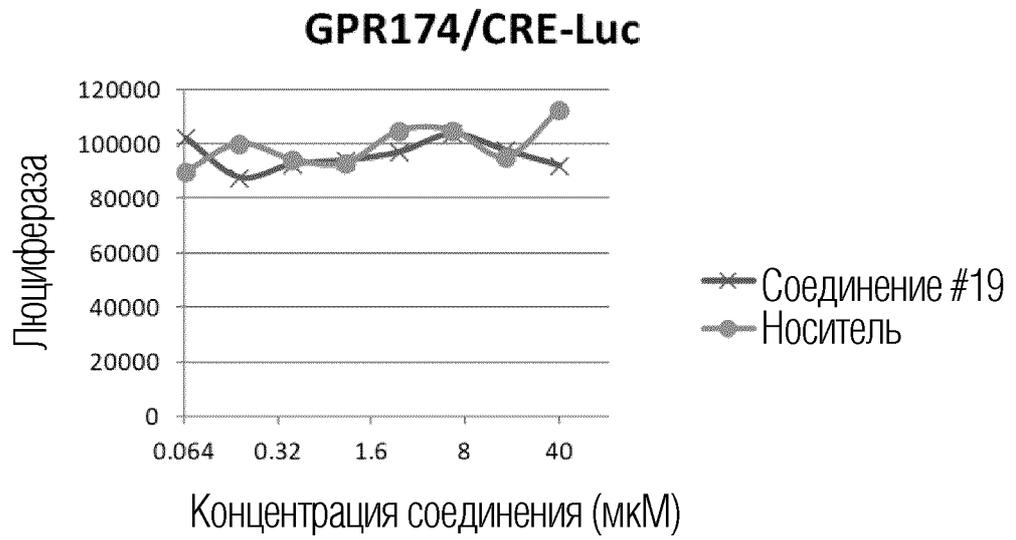


ФИГ. 12А

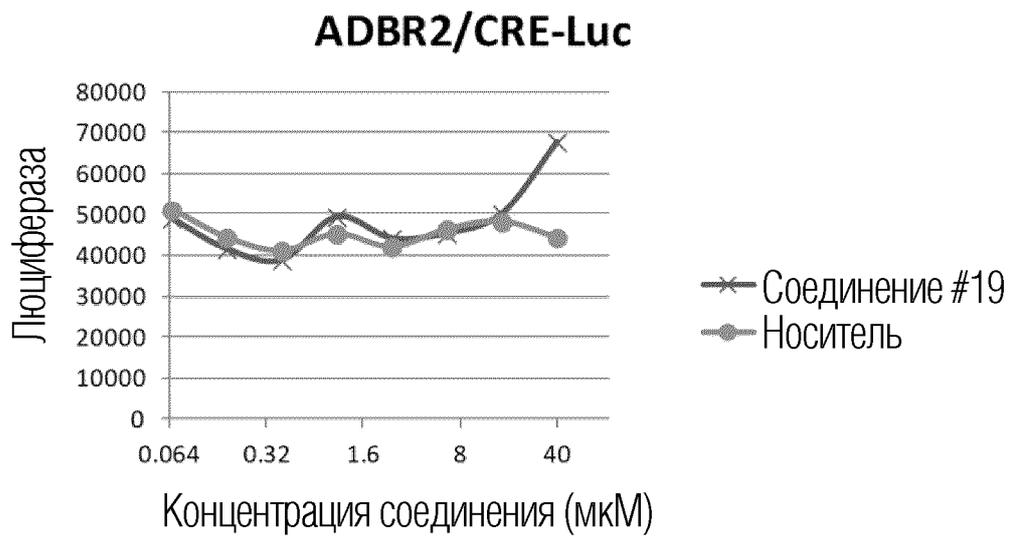


ФИГ. 12В

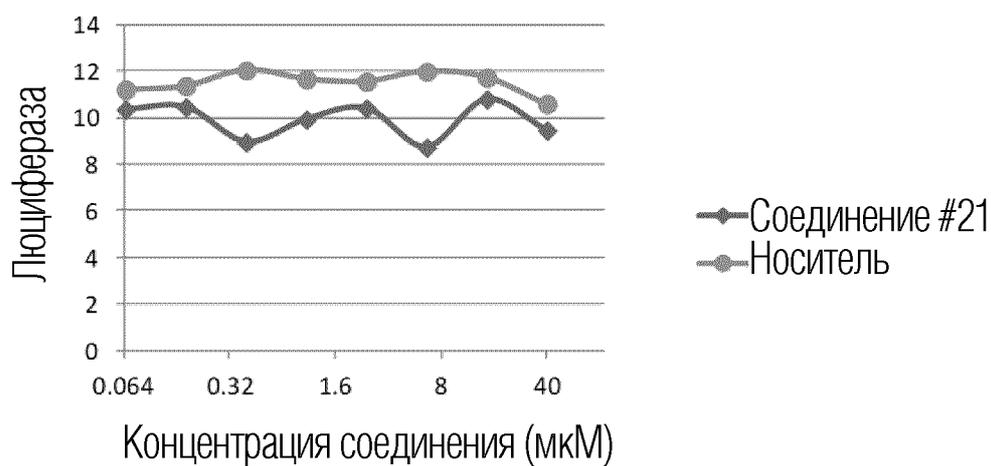
19/106



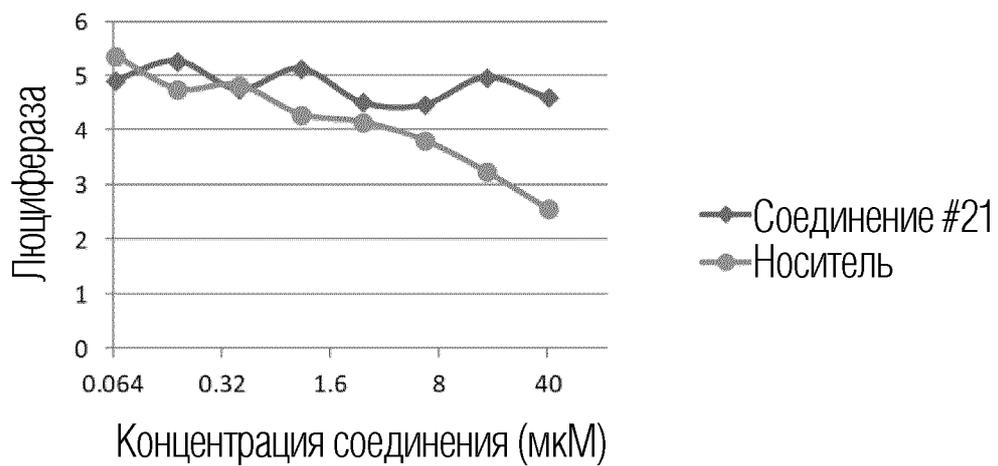
ФИГ. 13А



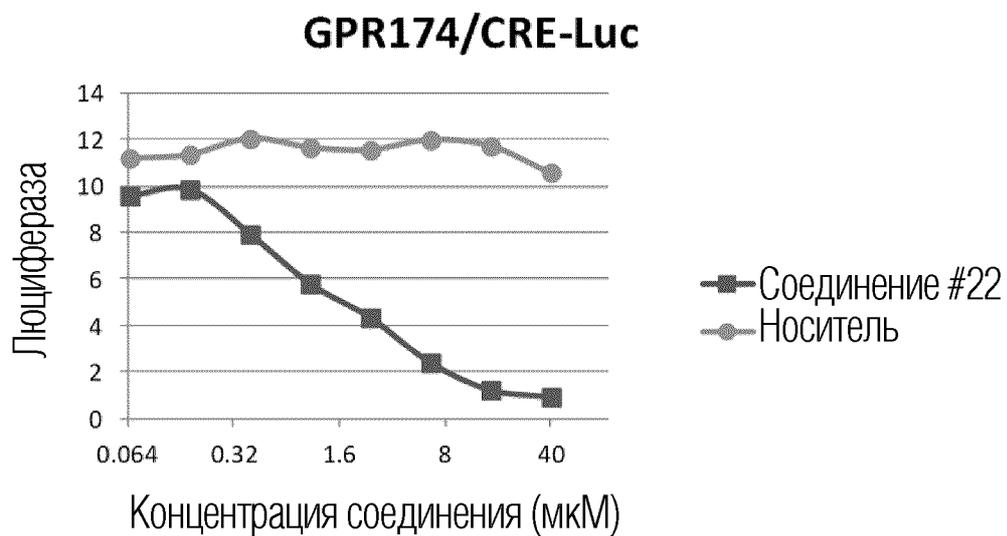
ФИГ. 13В

GPR174/CRE-Luc

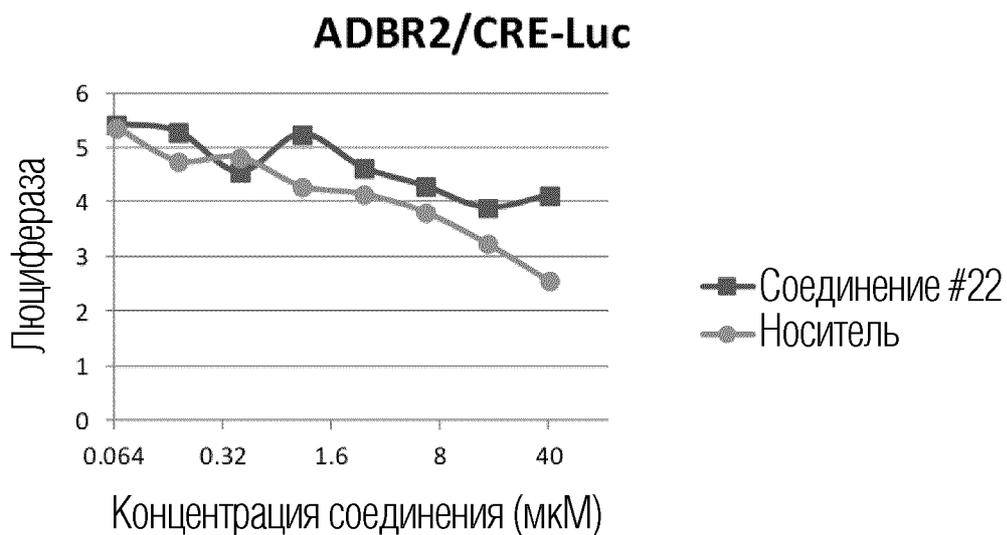
ФИГ. 14А

ADBR2/CRE-Luc

ФИГ. 14В

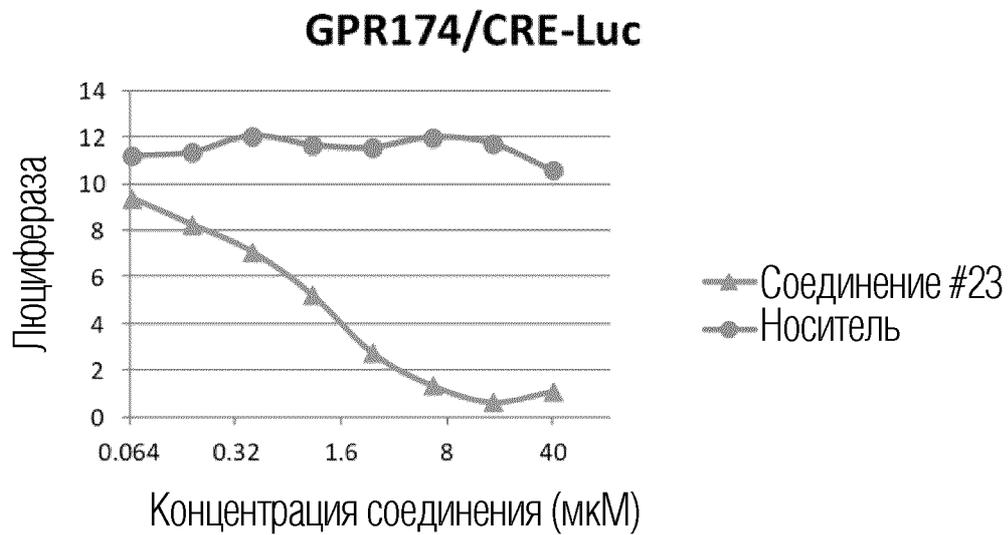


ФИГ. 15А

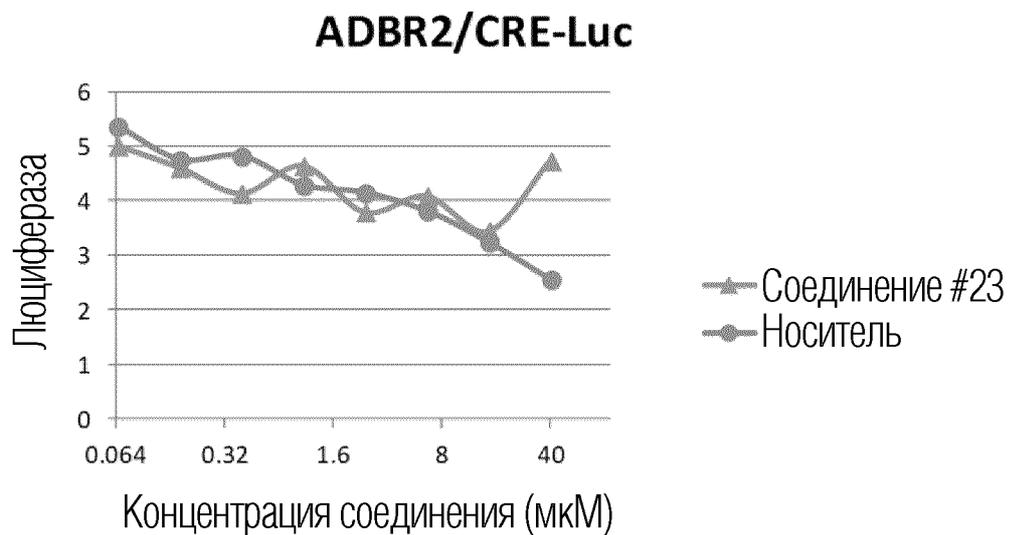


ФИГ. 15В

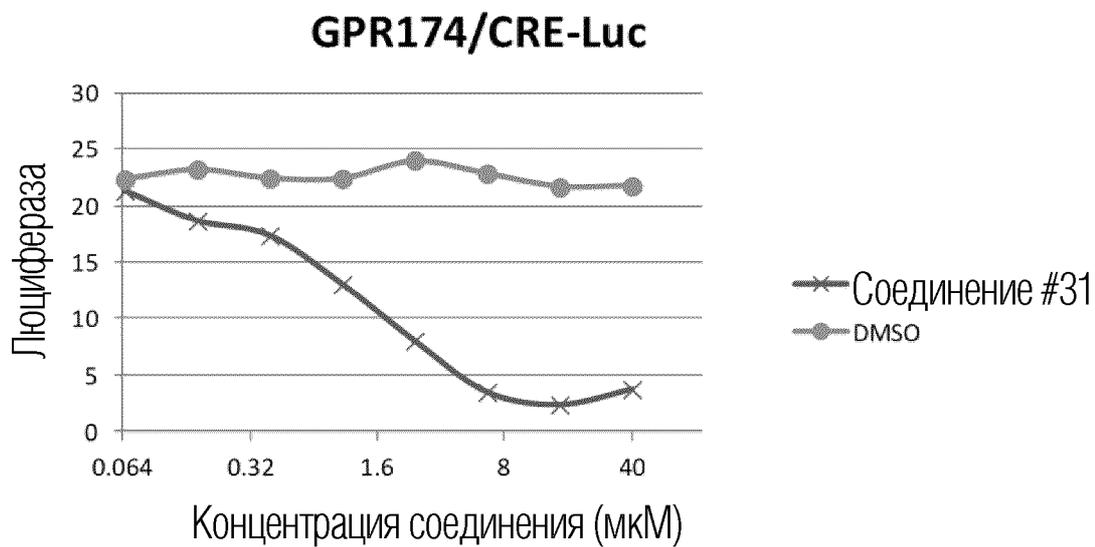
22/106



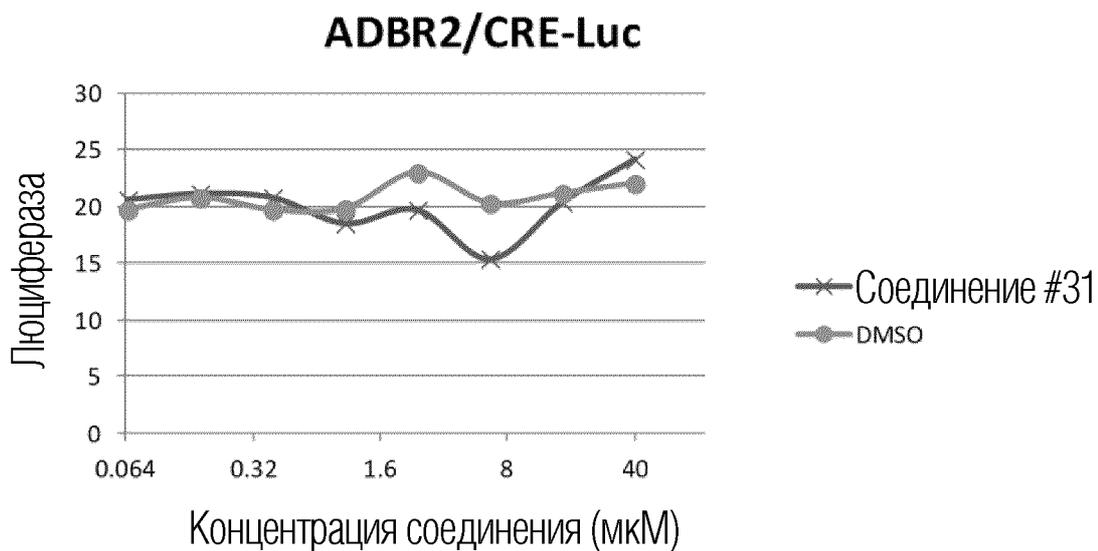
ФИГ. 16А



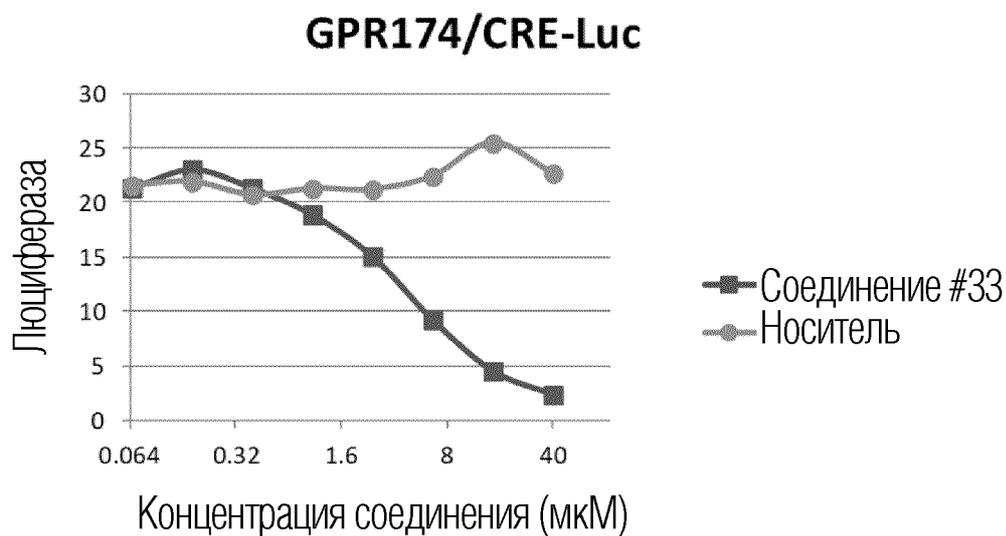
ФИГ. 16В



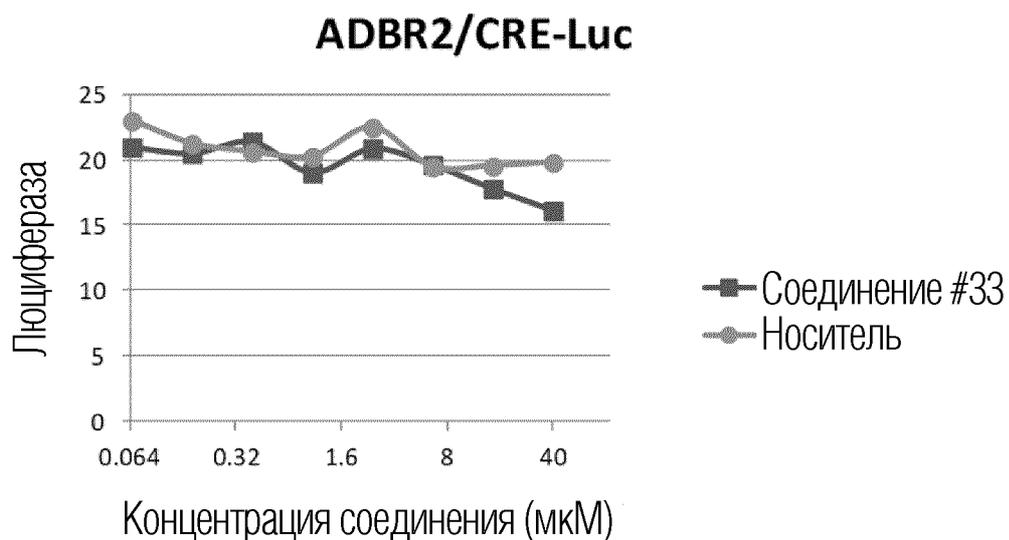
ФИГ. 17А



ФИГ. 17В

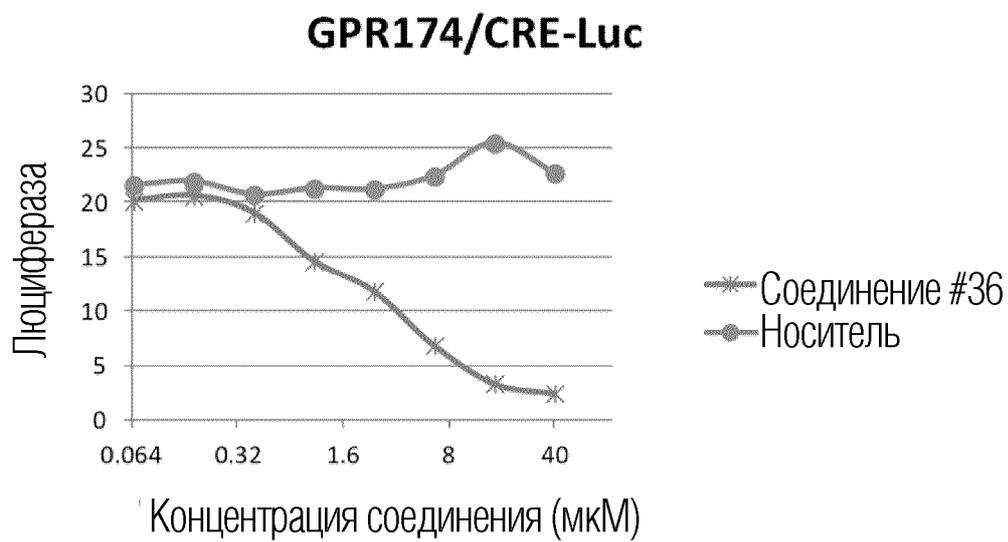


ФИГ. 18А

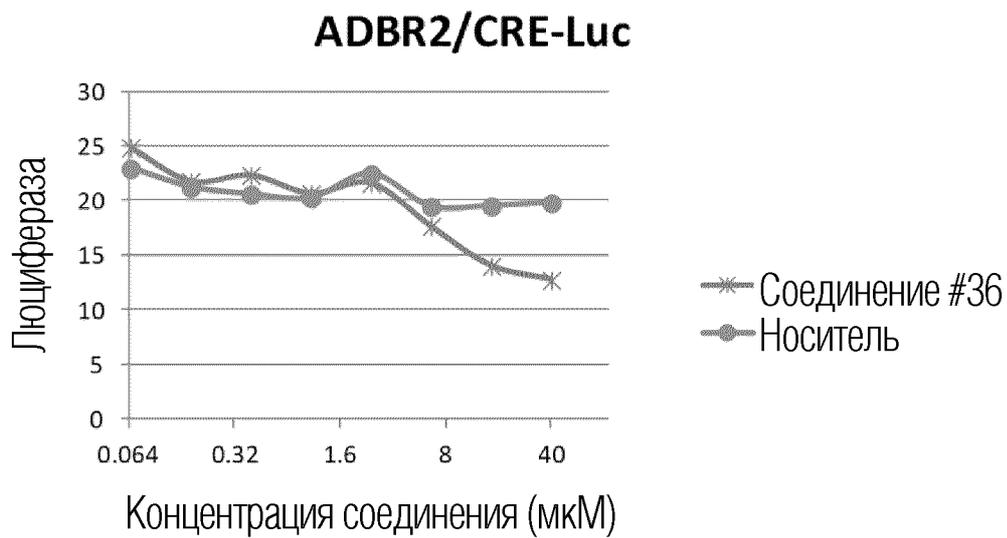


ФИГ. 18В

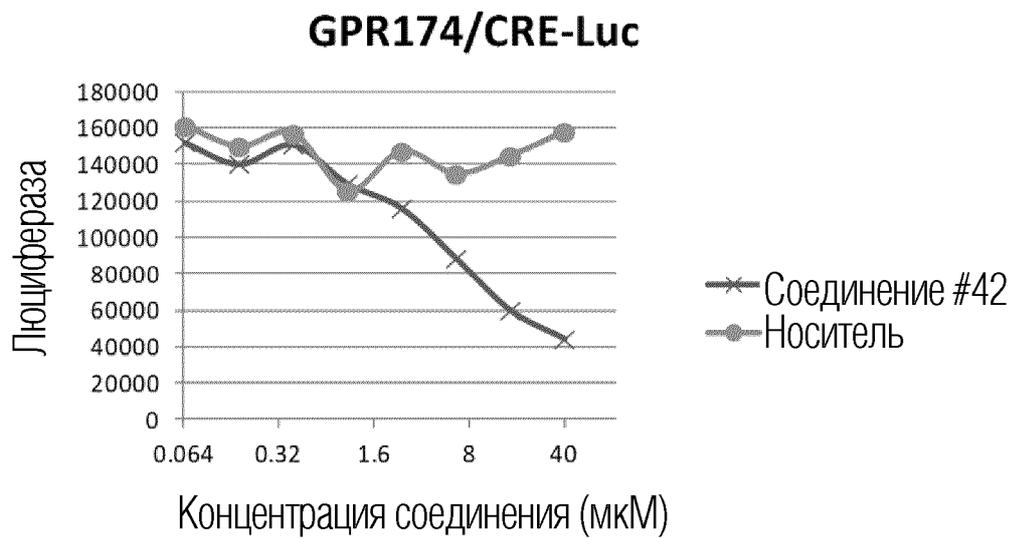
25/106



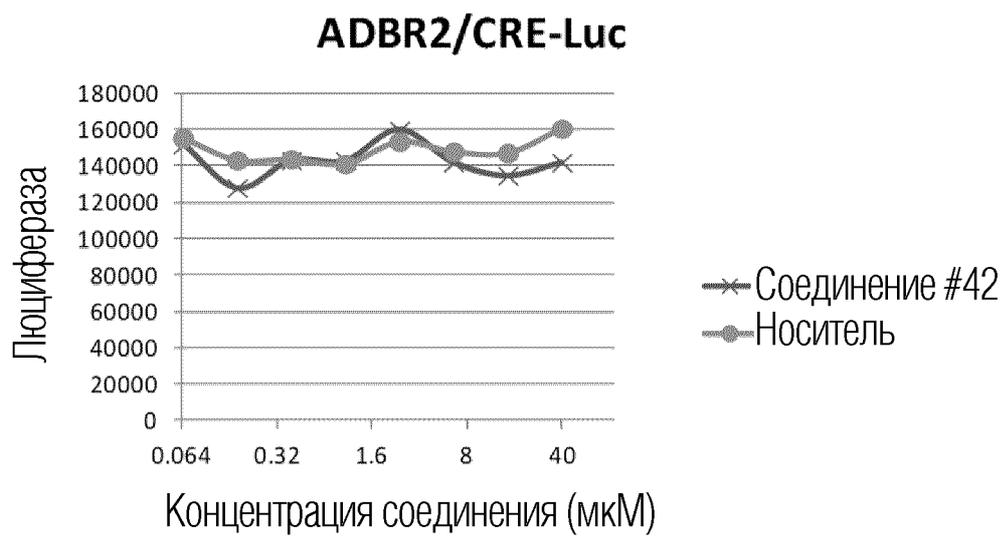
ФИГ. 19А



ФИГ. 19В

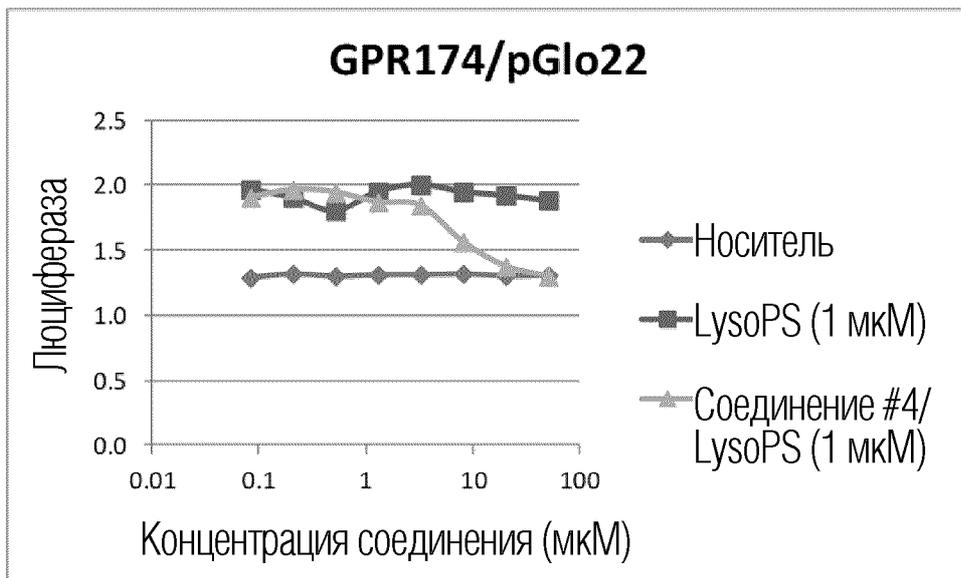


ФИГ. 20А

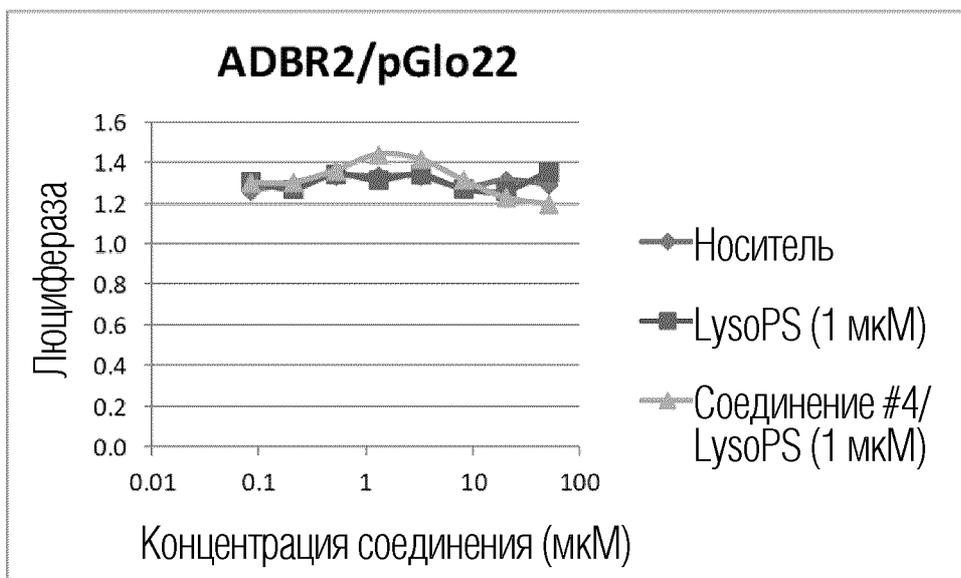


ФИГ. 20В

27/106

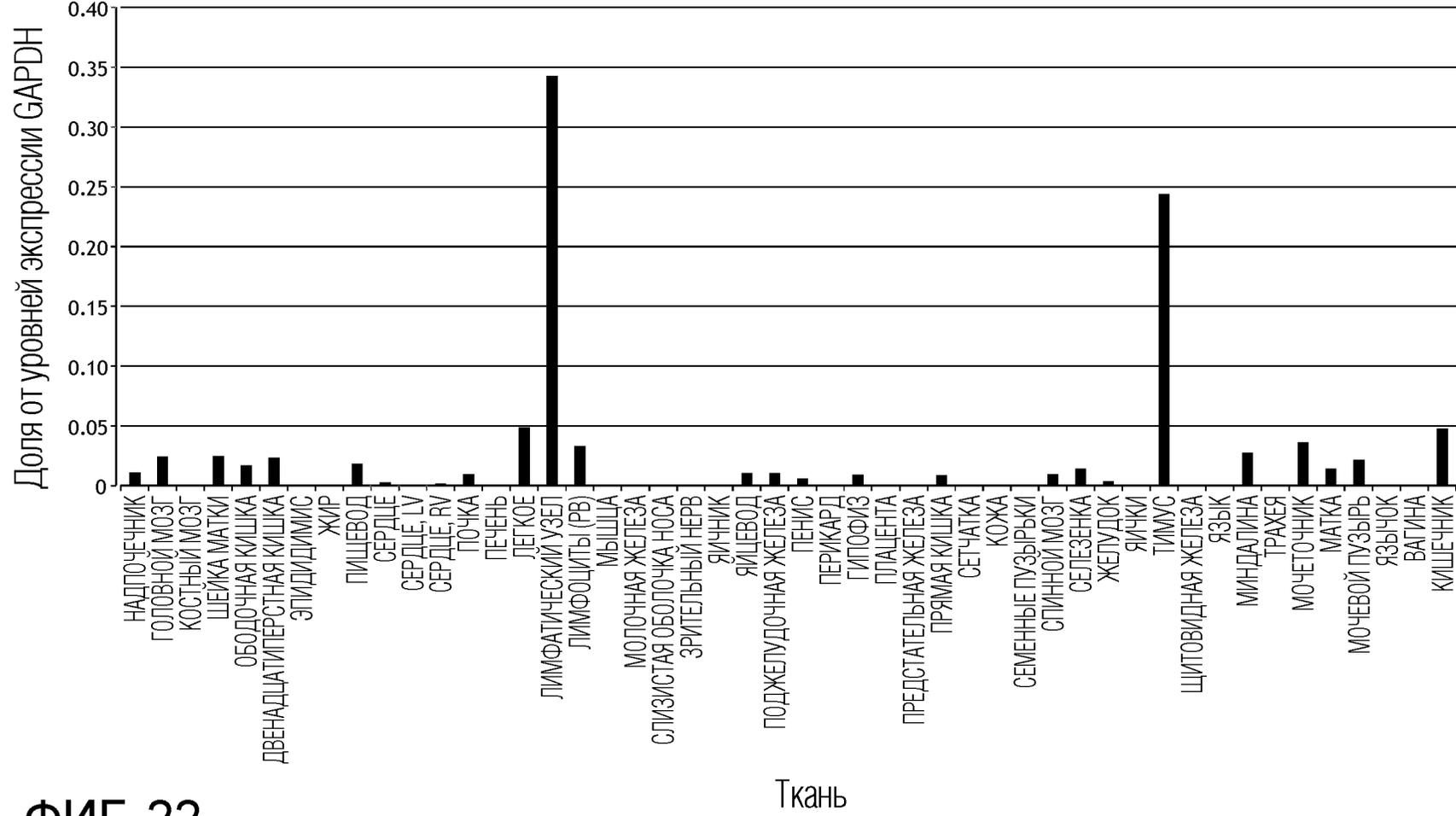


ФИГ. 21А



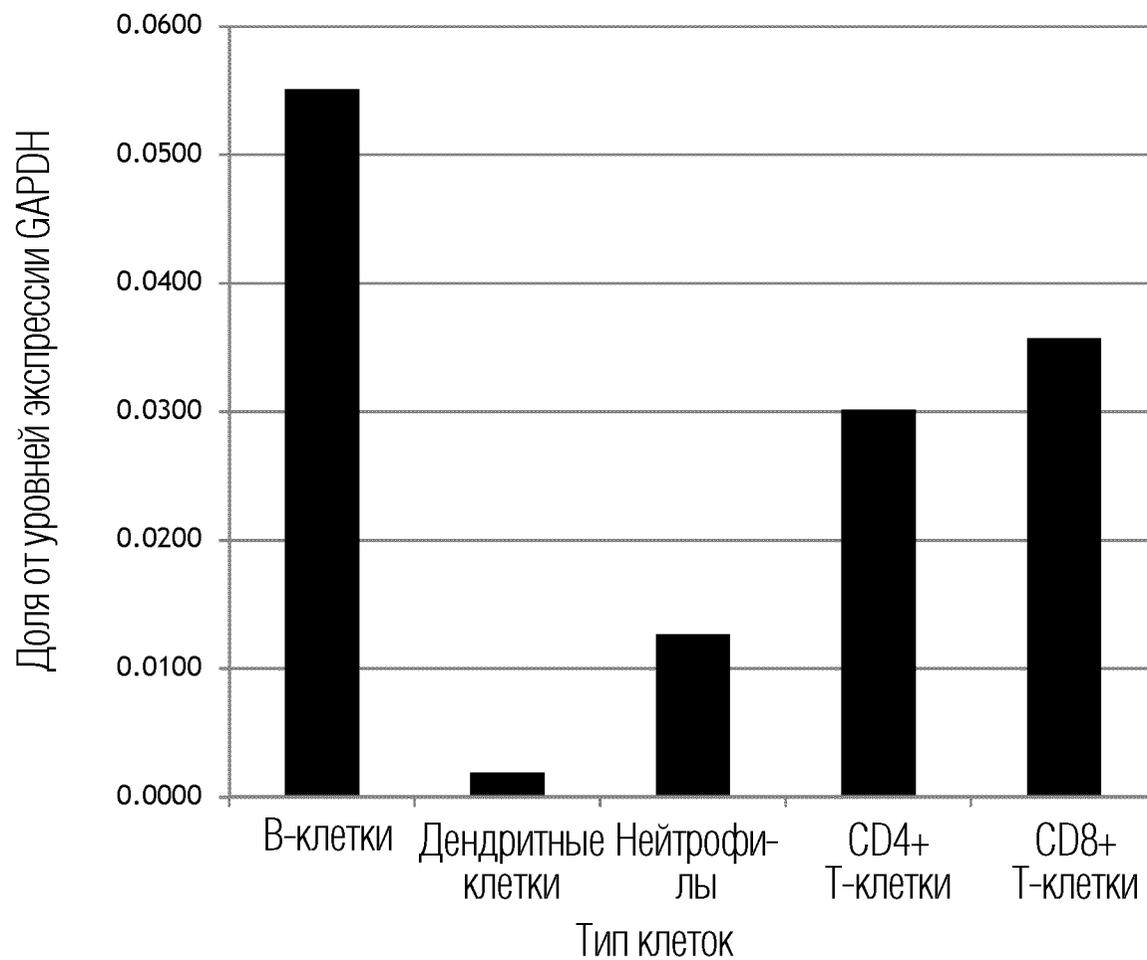
ФИГ. 21В

Относительное содержание транскрипта GPR174 в тканях человека, как измерено посредством qRT-ПЦР



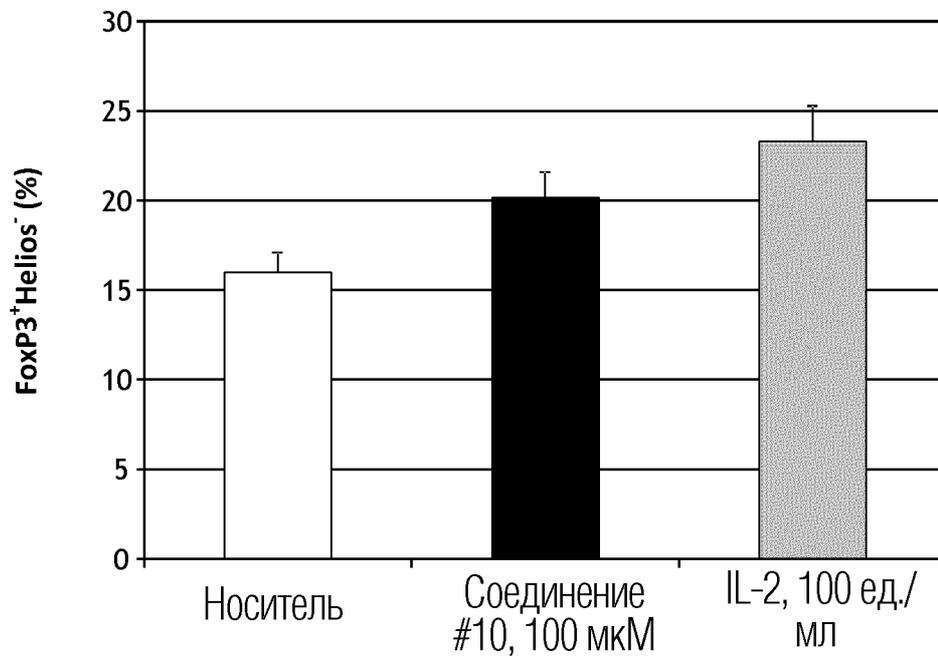
ФИГ. 22

Относительное содержание транскрипта GPR174 в лимфоидных клетках человека, как измерено посредством qRT-ПЦР



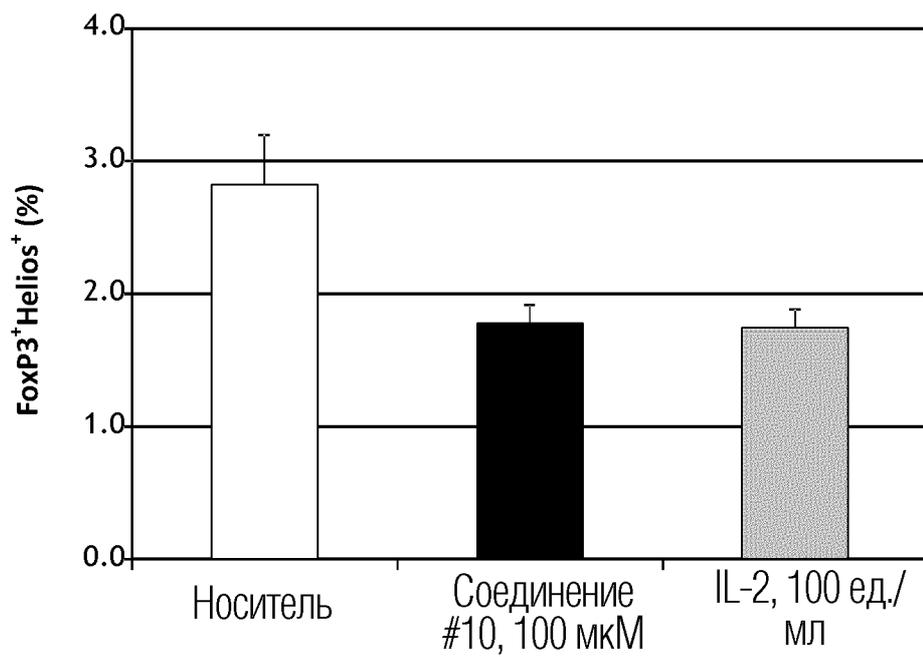
ФИГ. 23

Сутки 3 после стимуляции

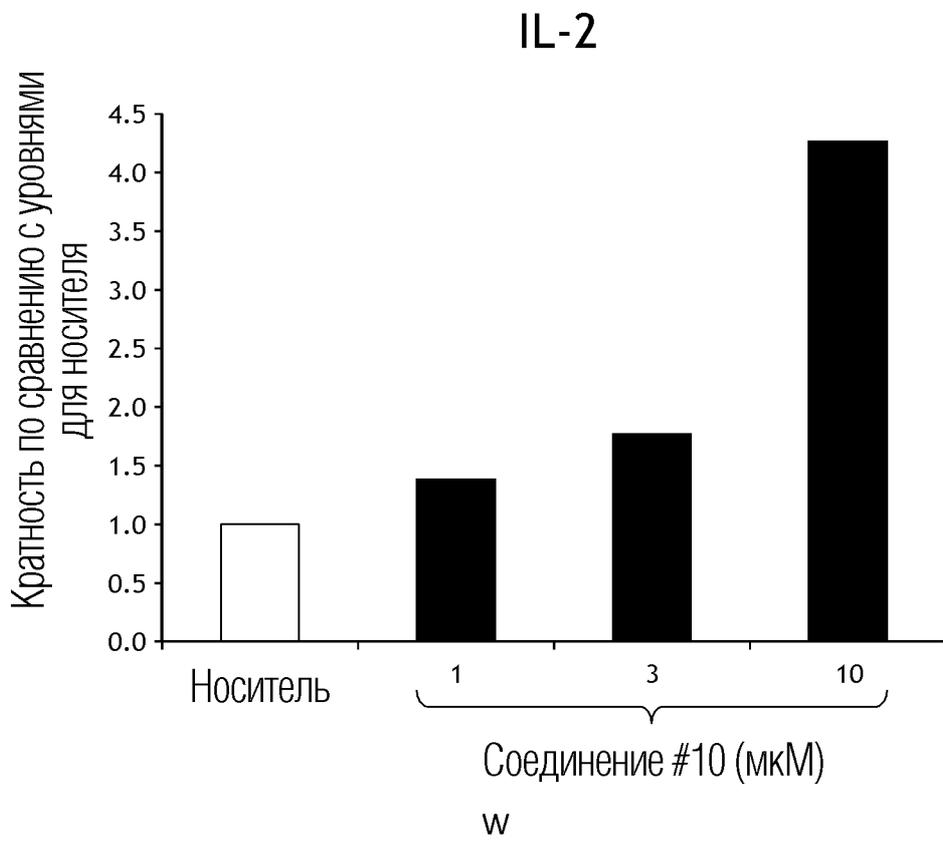


ФИГ. 24А

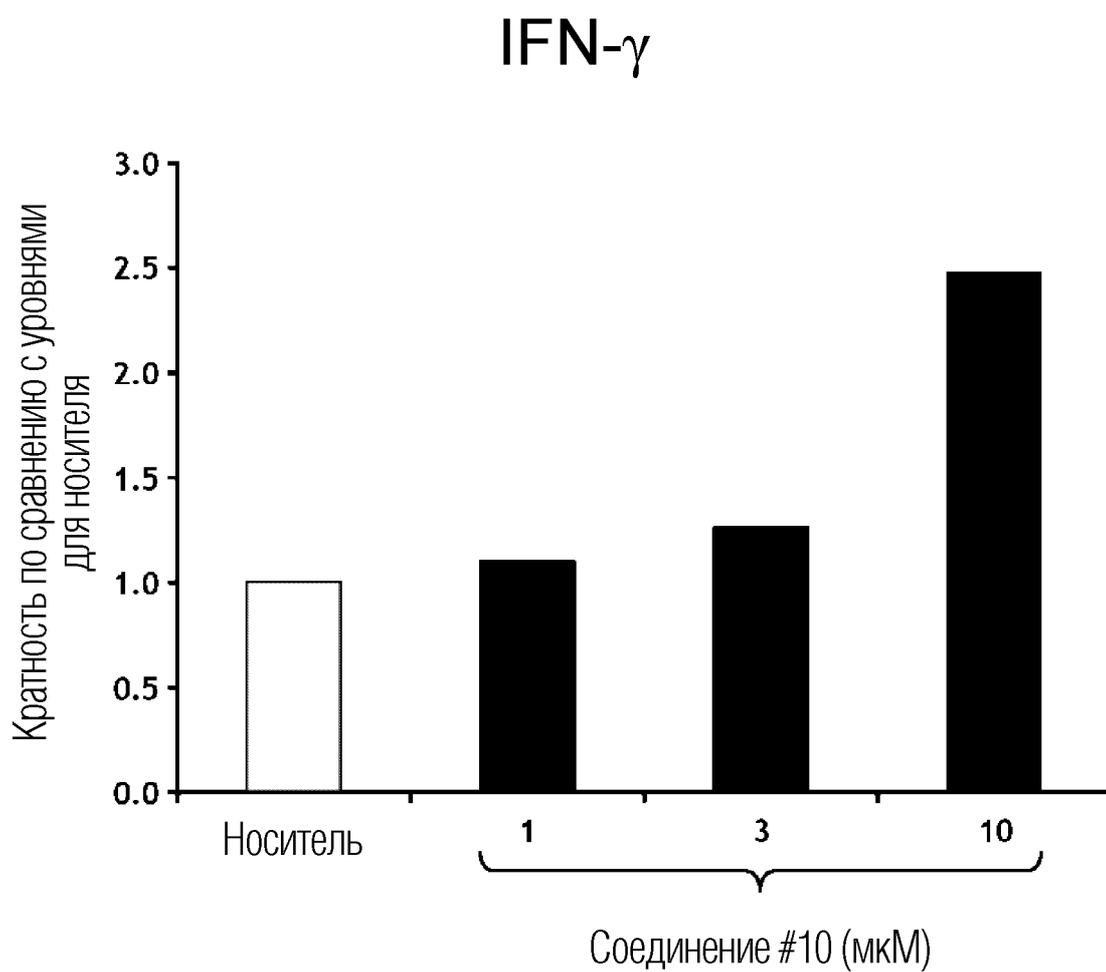
Сутки 7 после стимуляции



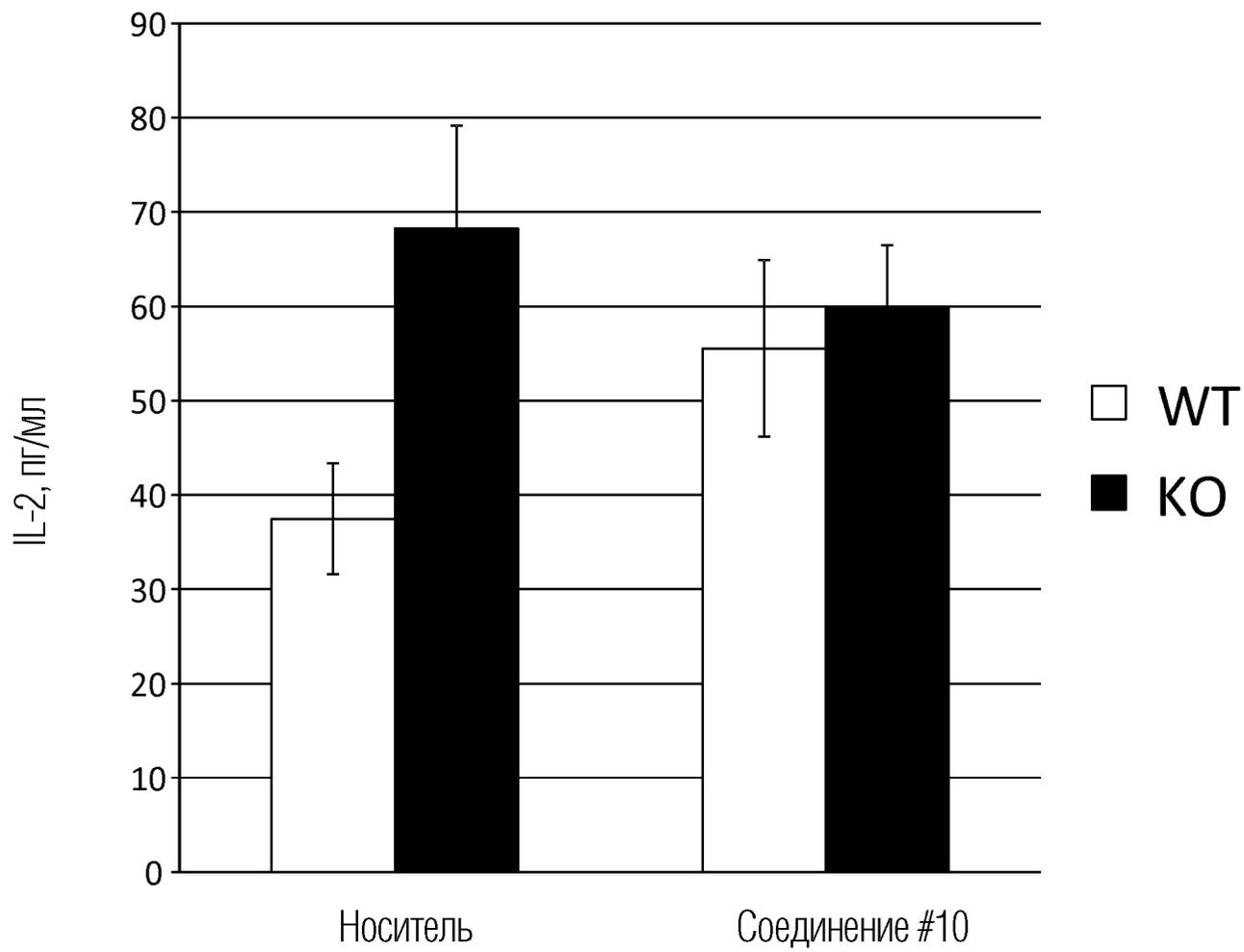
ФИГ. 24В



ФИГ. 25

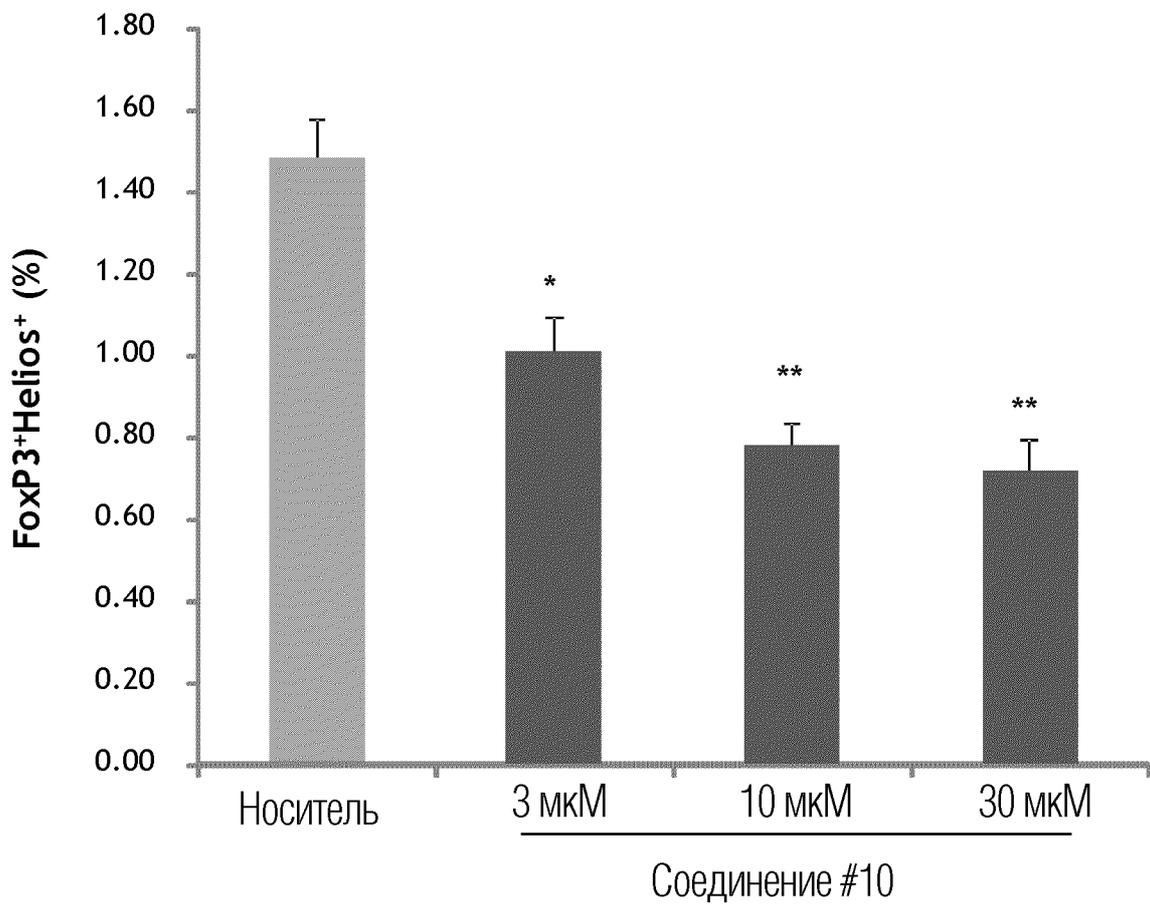


ФИГ. 26



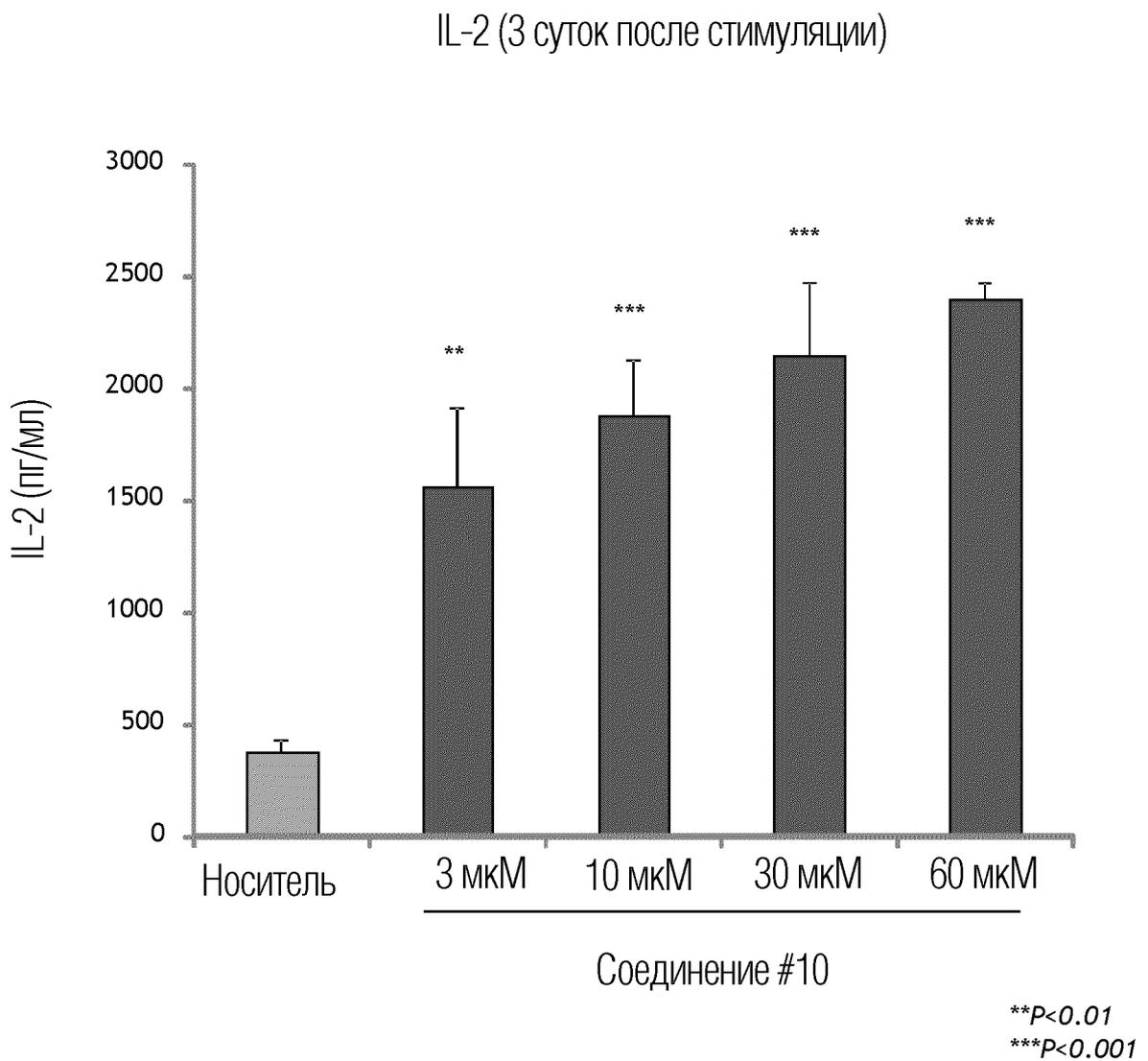
ФИГ. 27

Т-рег-клетки человека (Сутки 7 после стимуляции)



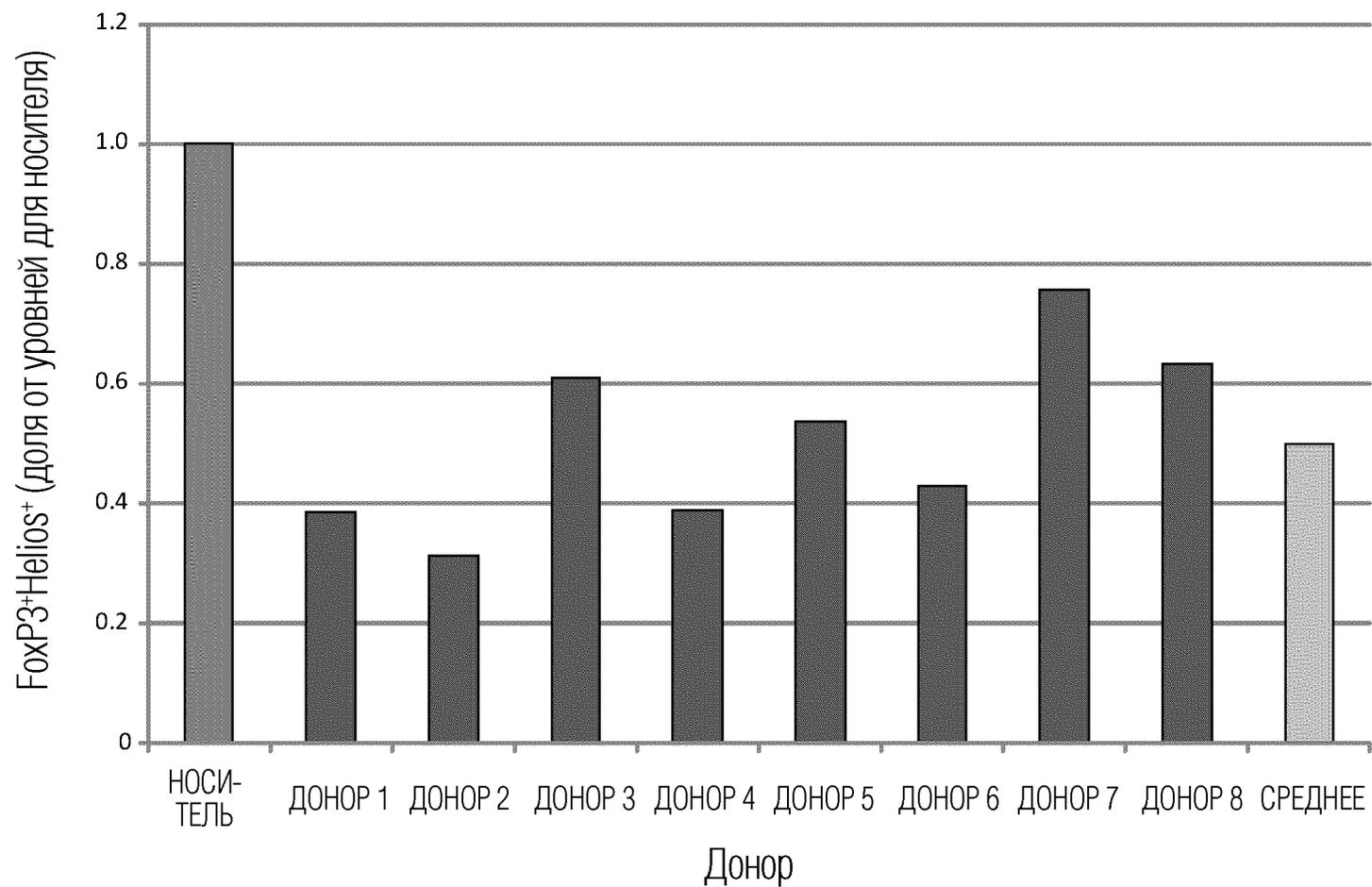
N=3
**P<0.05*
***P<0.01*

ФИГ. 28



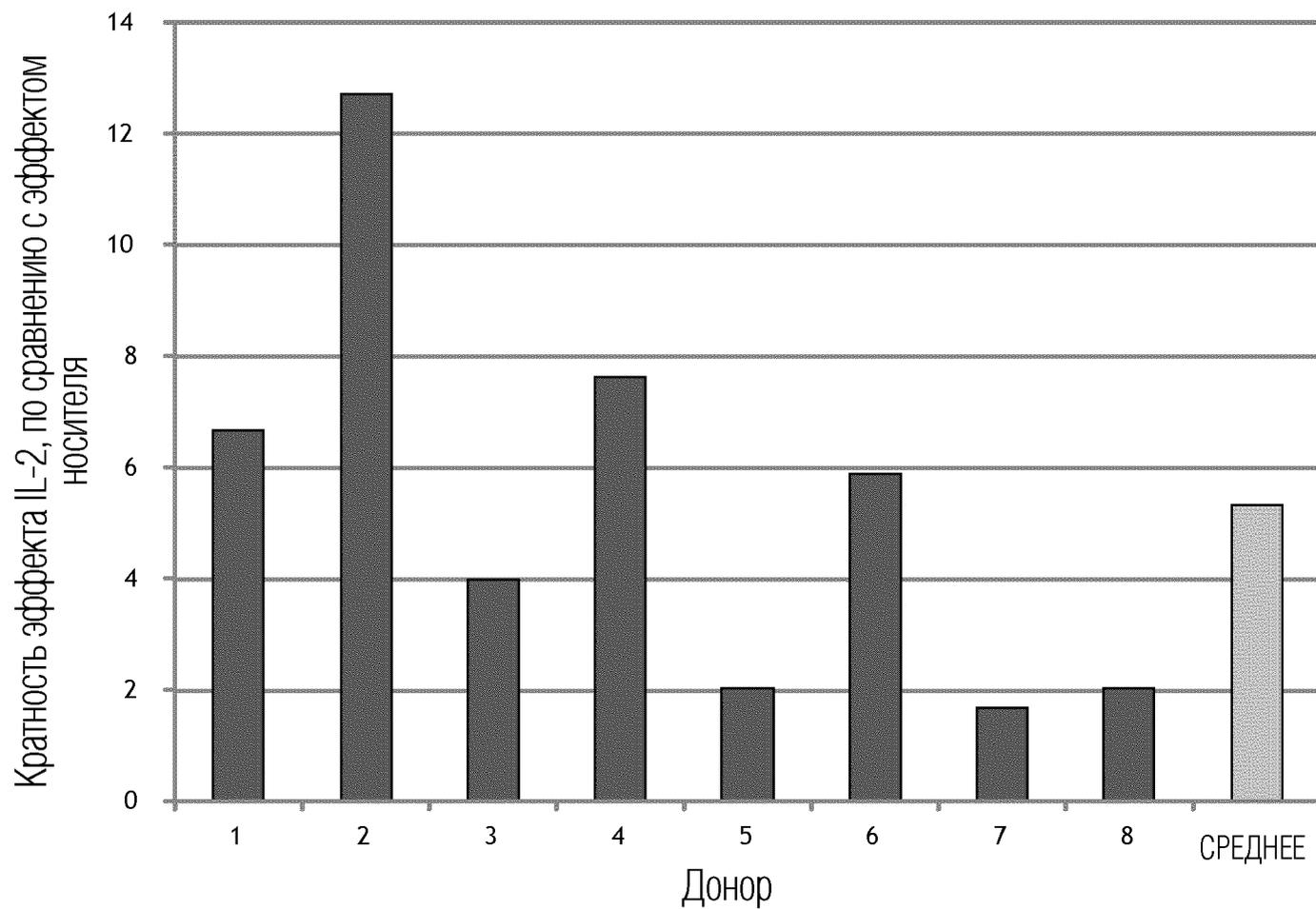
ФИГ. 29

Множество доноров/соединение #10 (30 мкМ), 7 суток после стимуляции



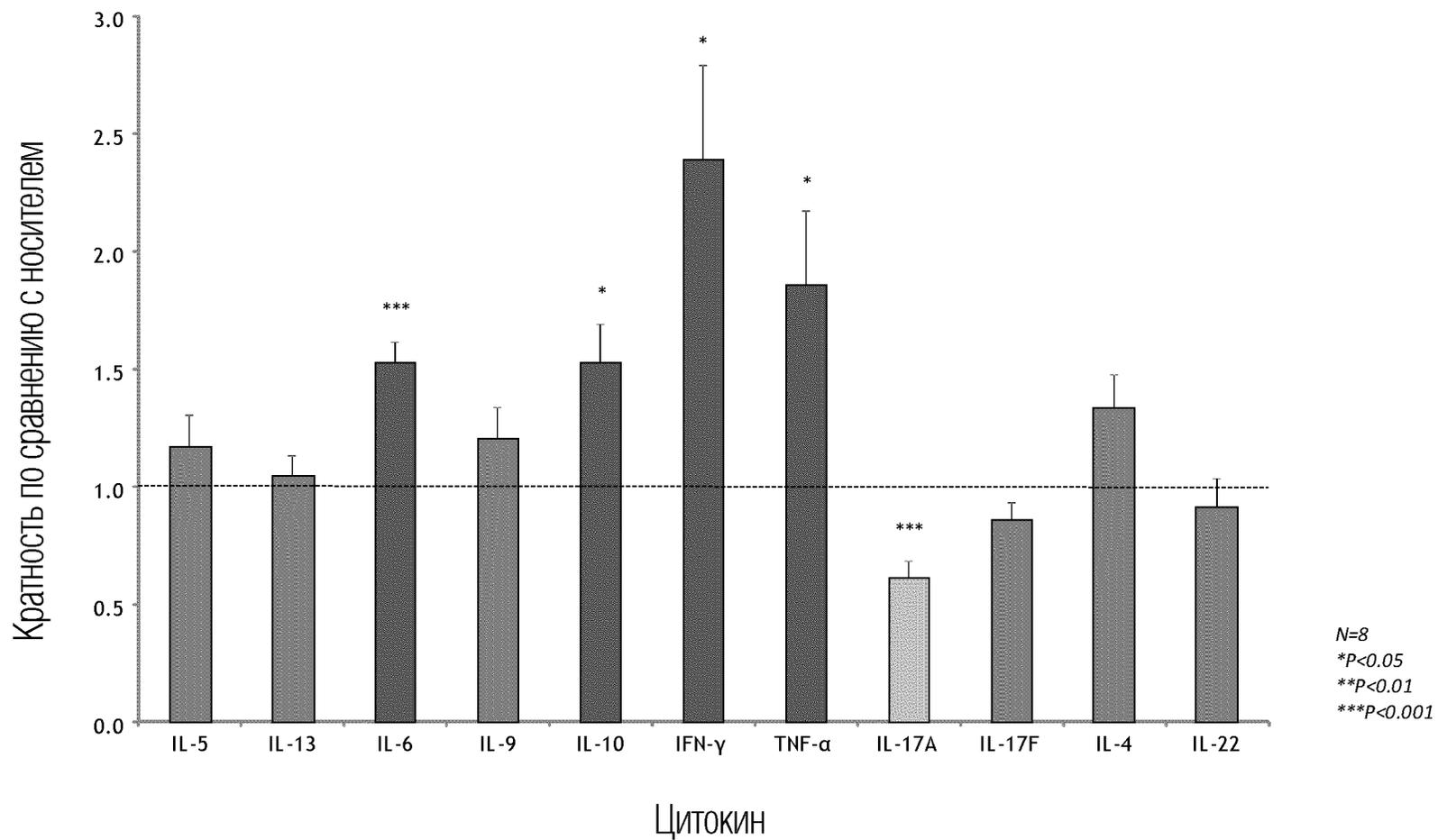
ФИГ. 30

Эффект соединения #10 (30 мкМ) на IL-2, продуцированный РВМС человека (мно-
жество доноров), 2 суток после стимуляции



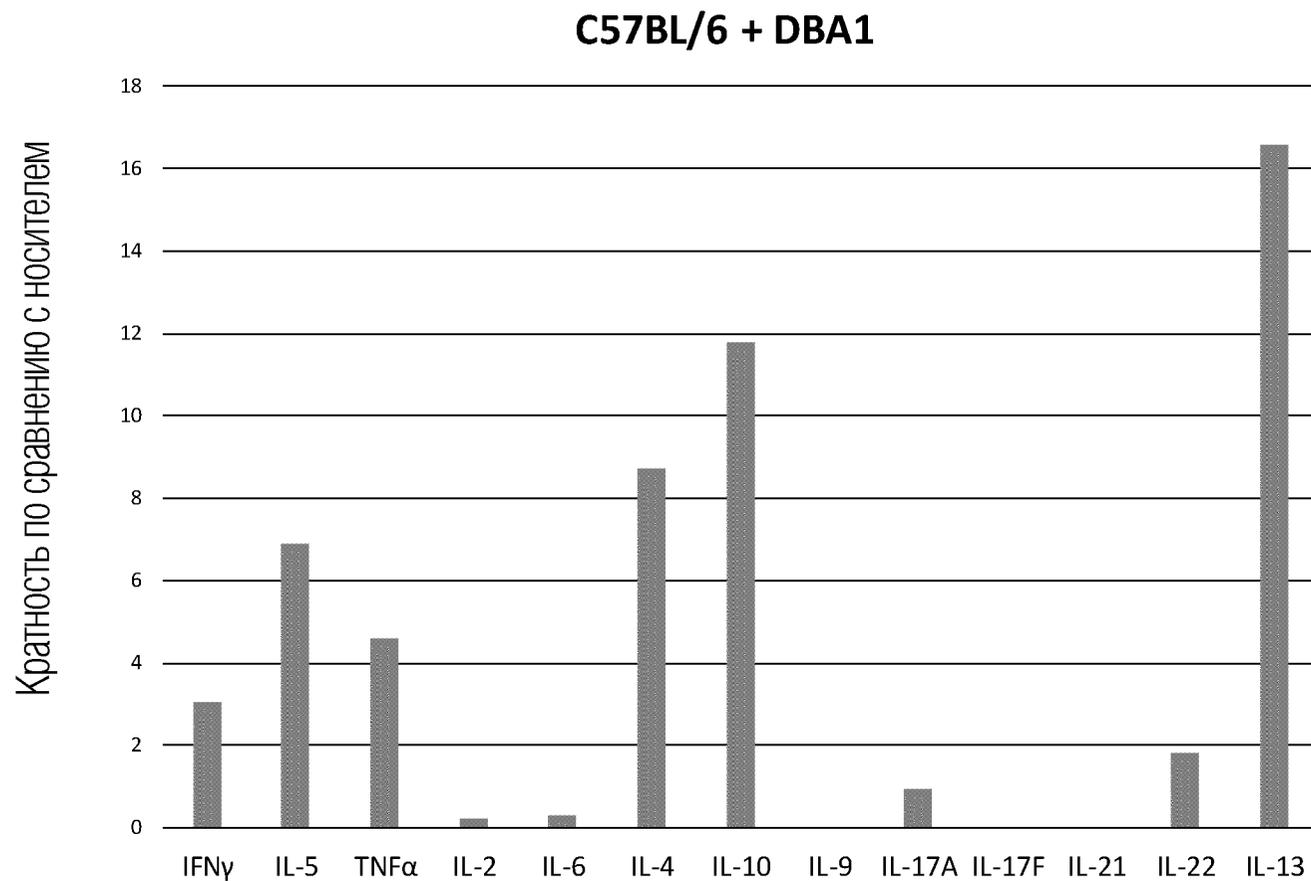
ФИГ. 31

Эффект соединения #10 (30 мкМ) на цитокины, продуцированные пулированными РВМС человека от множества доноров, 2 суток после стимуляции

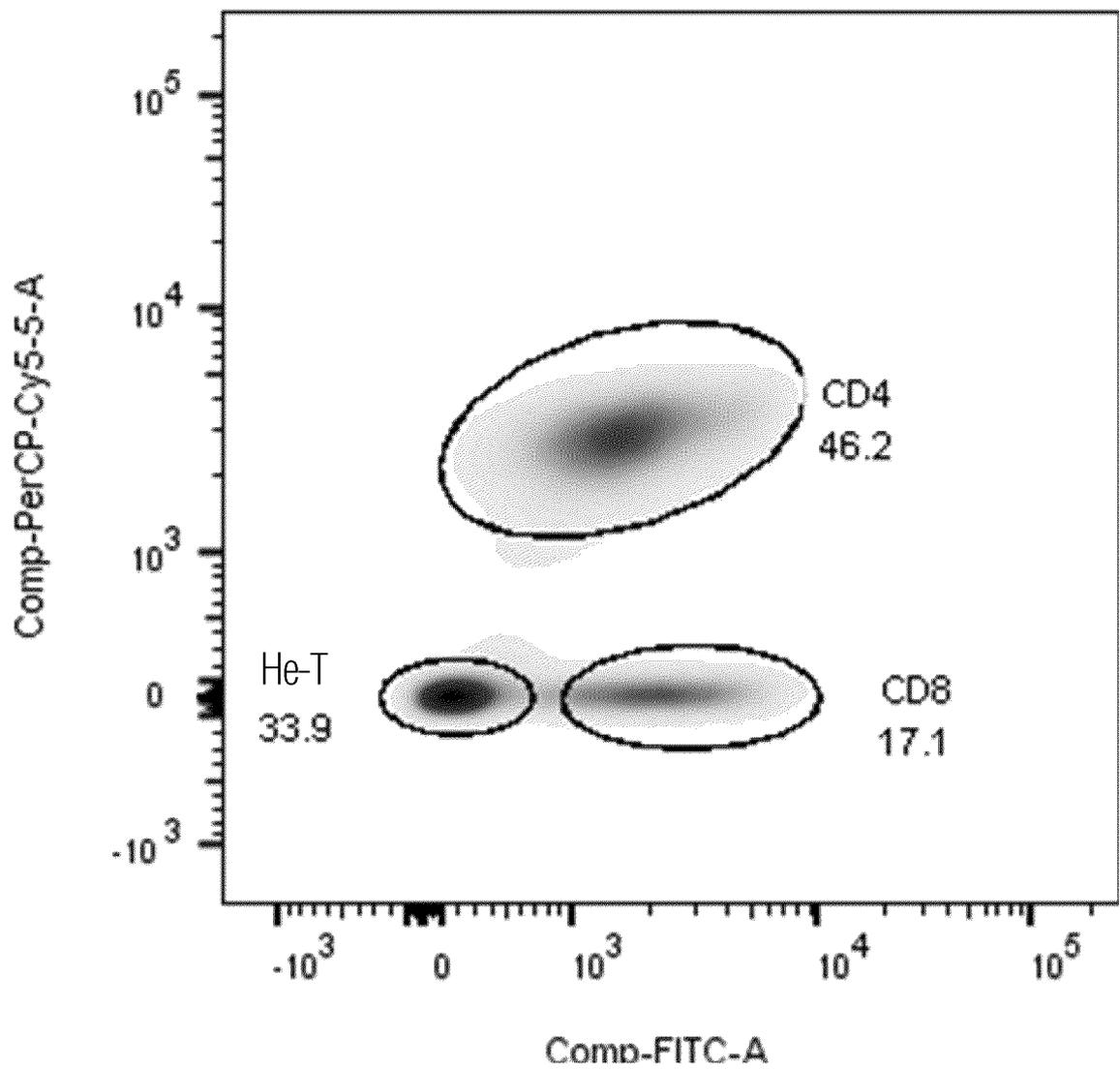


ФИГ. 32

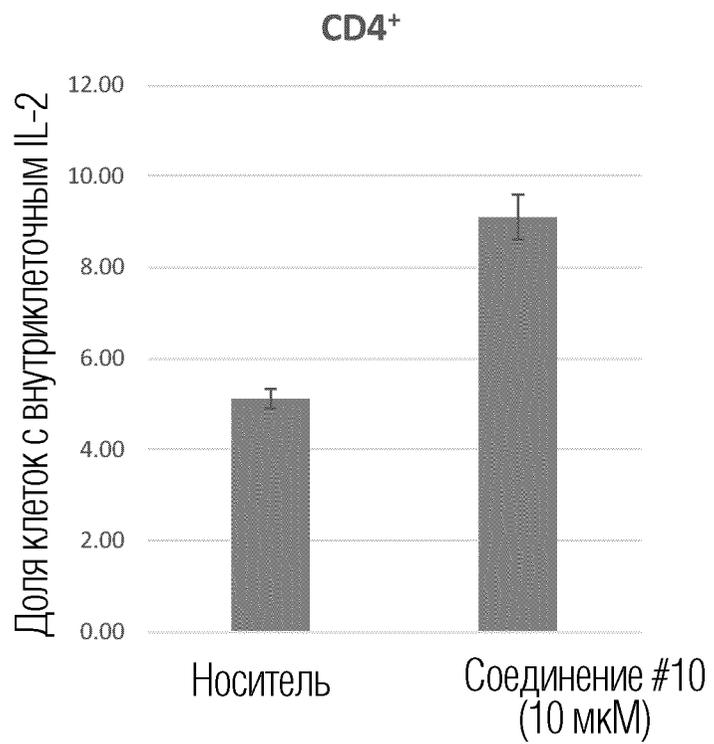
Эффект соединения #10 (30 мкМ) на уровни цитокинов, продуцированных в смешанных культурах спленоцитов из различных линий мышей (совместно культивированных в течение 6 суток)



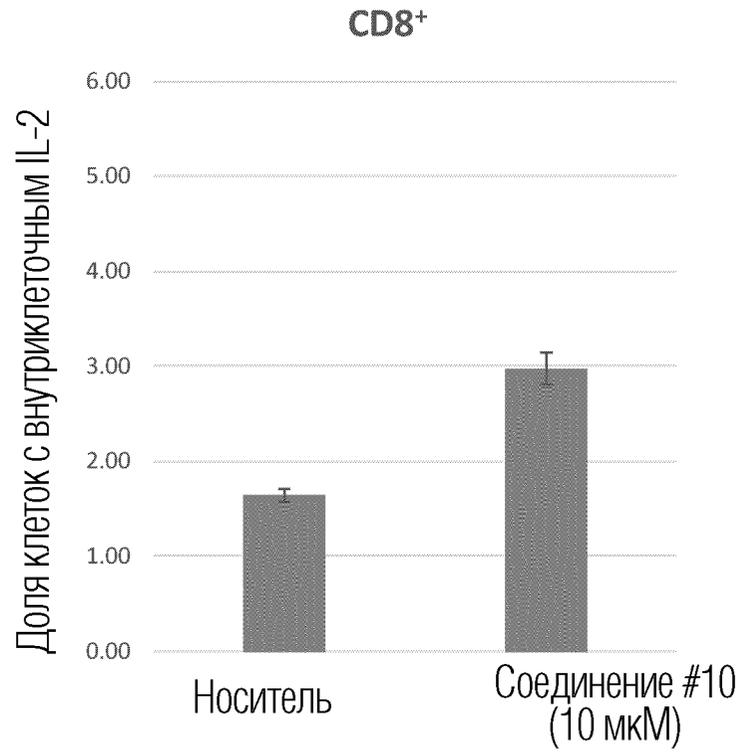
ФИГ. 33



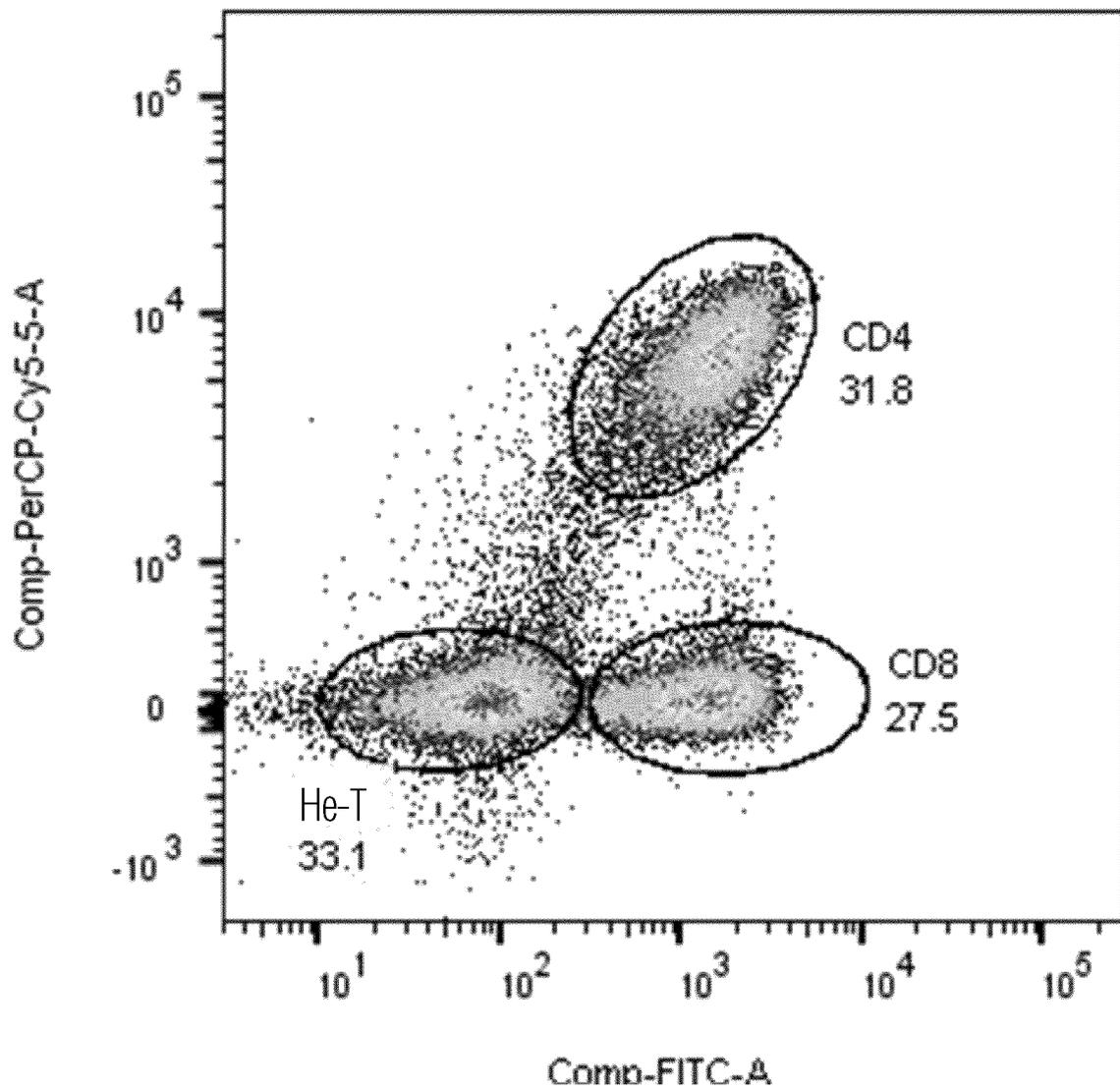
ФИГ. 34А



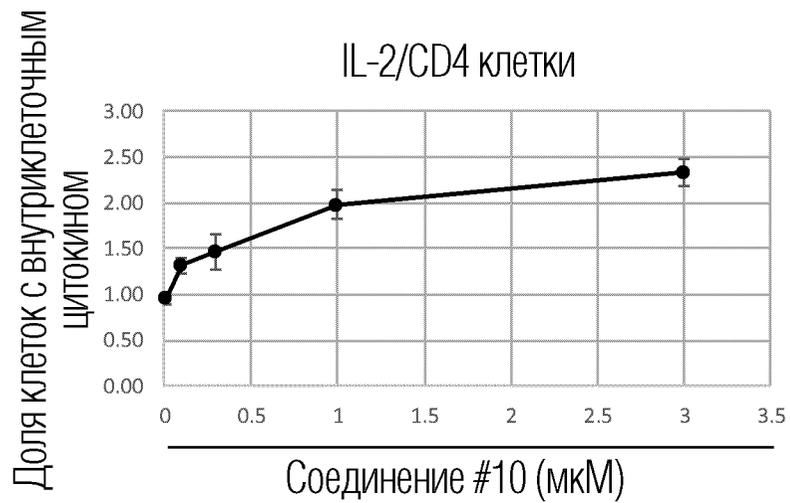
ФИГ. 34В



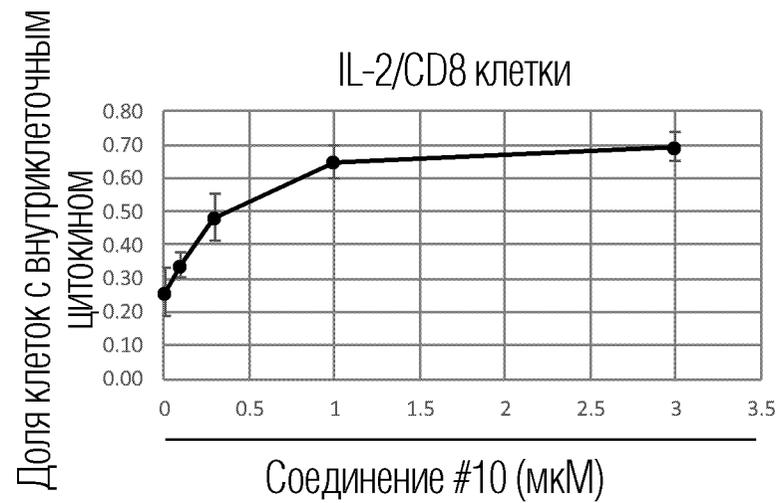
ФИГ. 34С



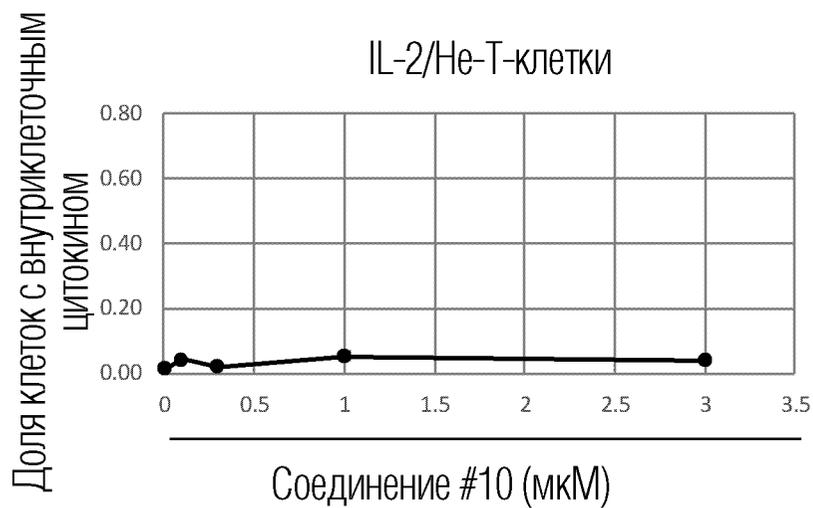
ФИГ. 35А



ФИГ. 35В



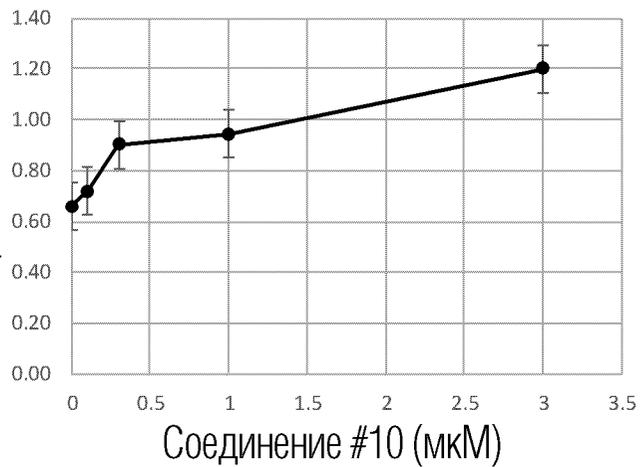
ФИГ. 35С



ФИГ. 35D

Доля клеток с внутриклеточным
ЦИТОКИНОМ

IL-10/CD4 клетки

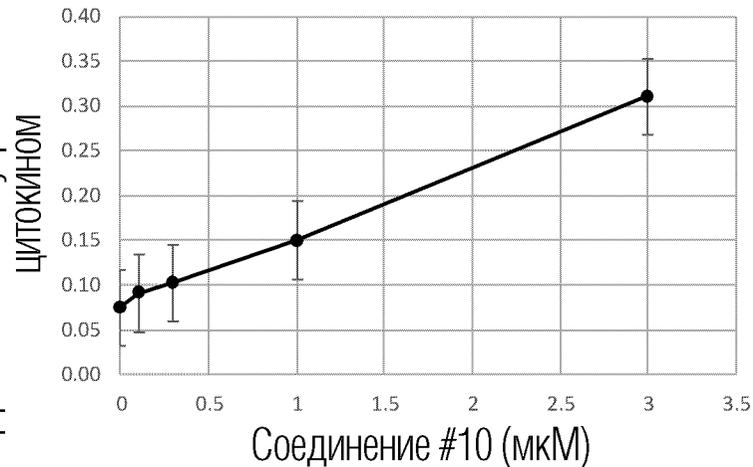


Соединение #10 (мкМ)

ФИГ. 35E

Доля клеток с внутриклеточным
ЦИТОКИНОМ

IL-10/CD8 клетки

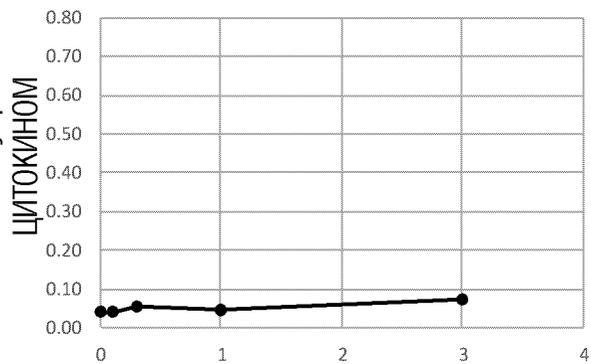


Соединение #10 (мкМ)

ФИГ. 35F

Доля клеток с внутриклеточным
ЦИТОКИНОМ

IL-10/He-T-клетки

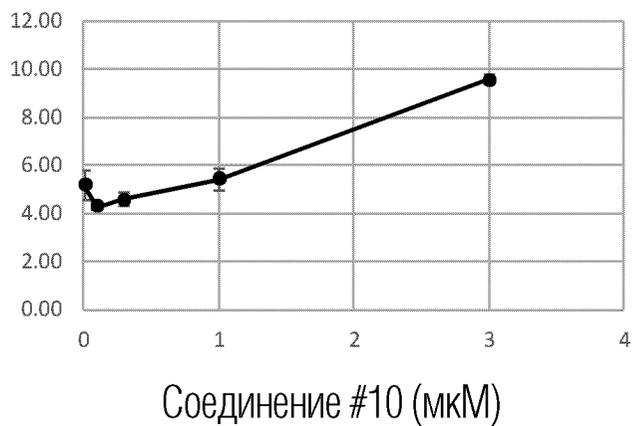


Соединение #10 (мкМ)

ФИГ. 35G

Доля клеток с внутриклеточным
ЦИТОКИНОМ

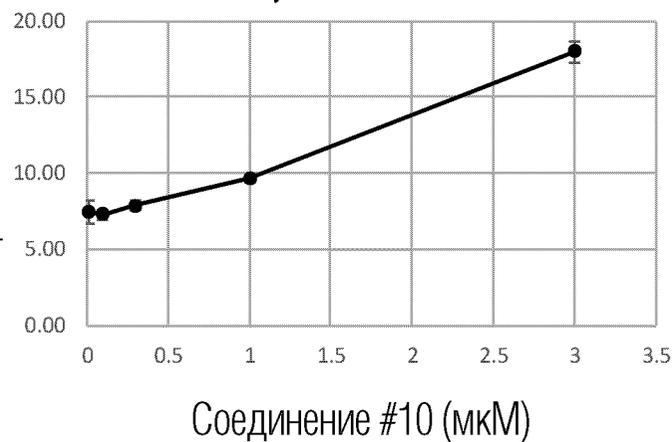
IFN γ /CD4 клетки



ФИГ. 35H

Доля клеток с внутриклеточным
ЦИТОКИНОМ

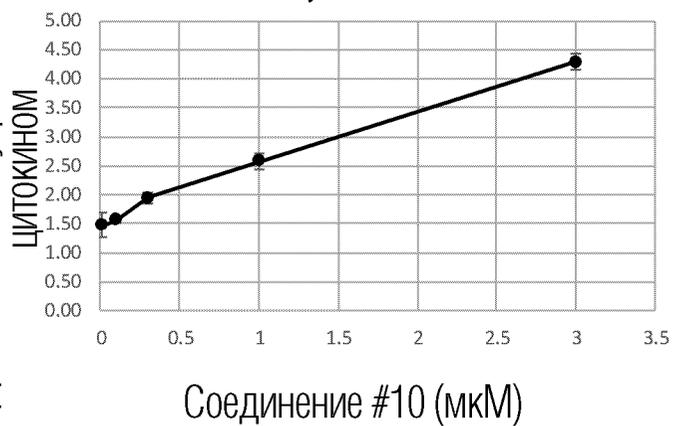
IFN γ /CD8 клетки



ФИГ. 35I

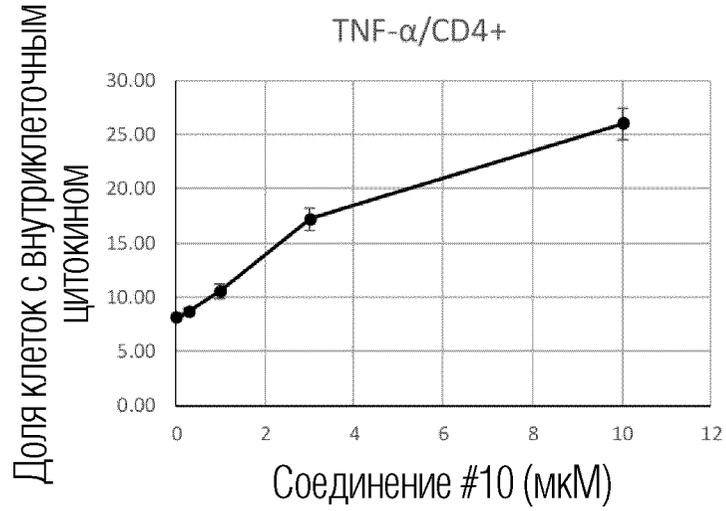
Доля клеток с внутриклеточным
ЦИТОКИНОМ

IFN γ /He-T-клетки

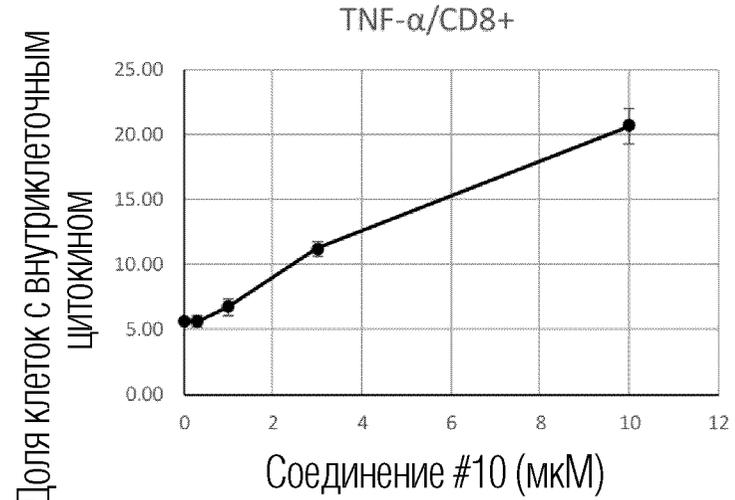


ФИГ. 35J

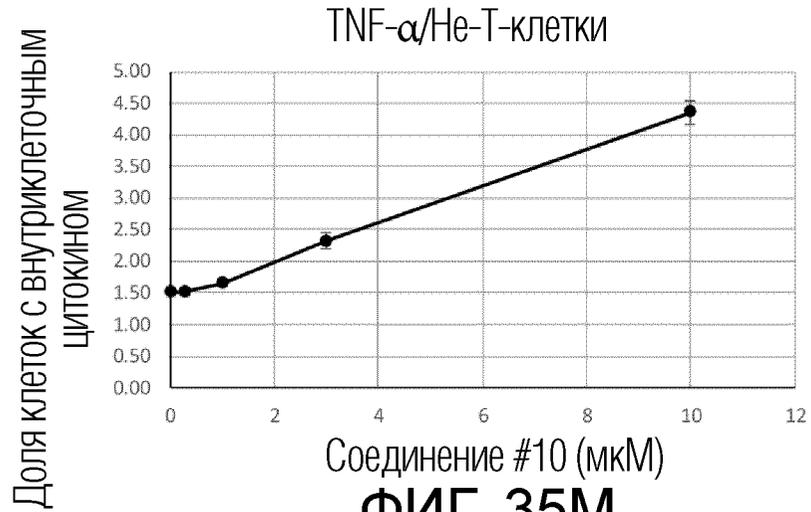
Индукция TNF- α посредством соединения #10



ФИГ. 35К



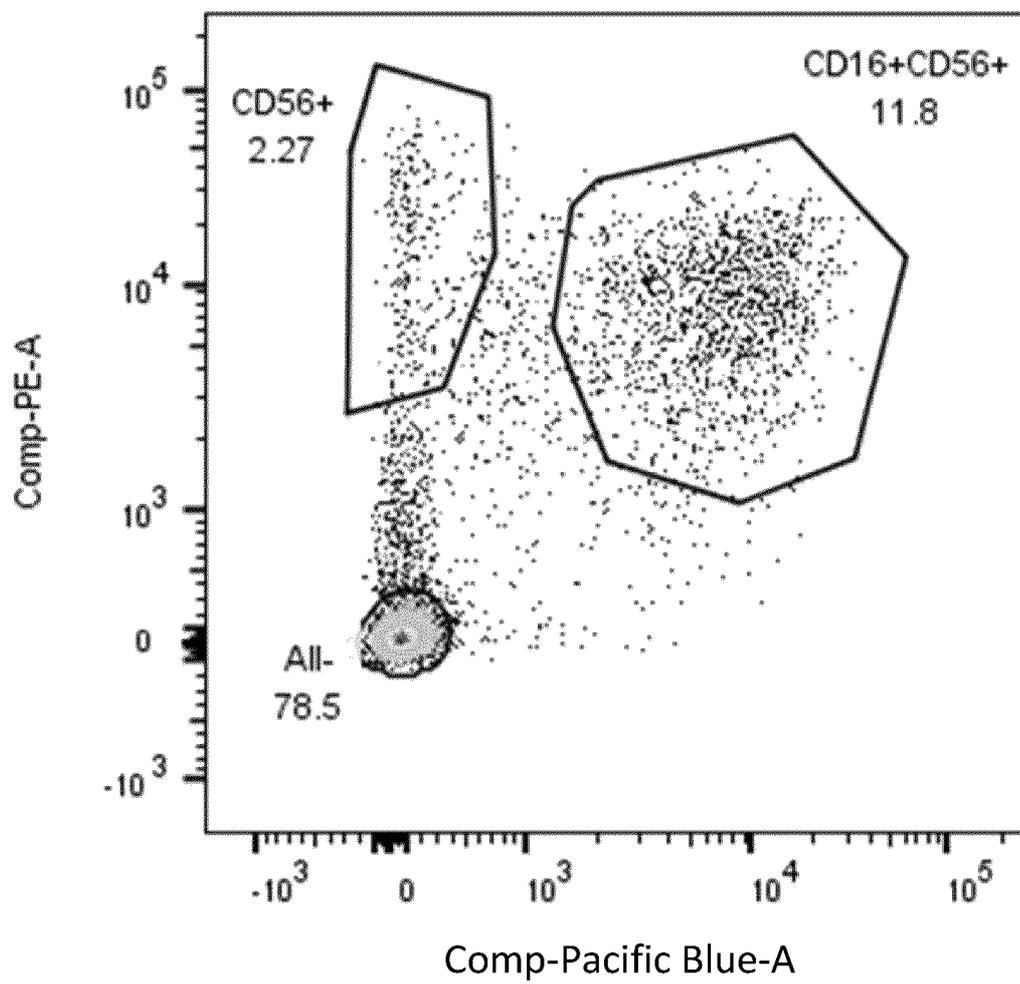
ФИГ. 35L



ФИГ. 35М

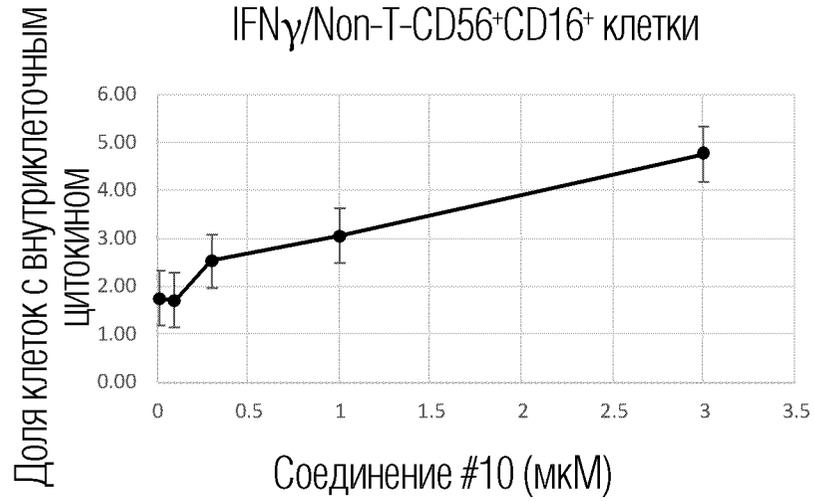
47/106

Дополнительный анализ популяции не-Т-клеток из ФИГ. 35А

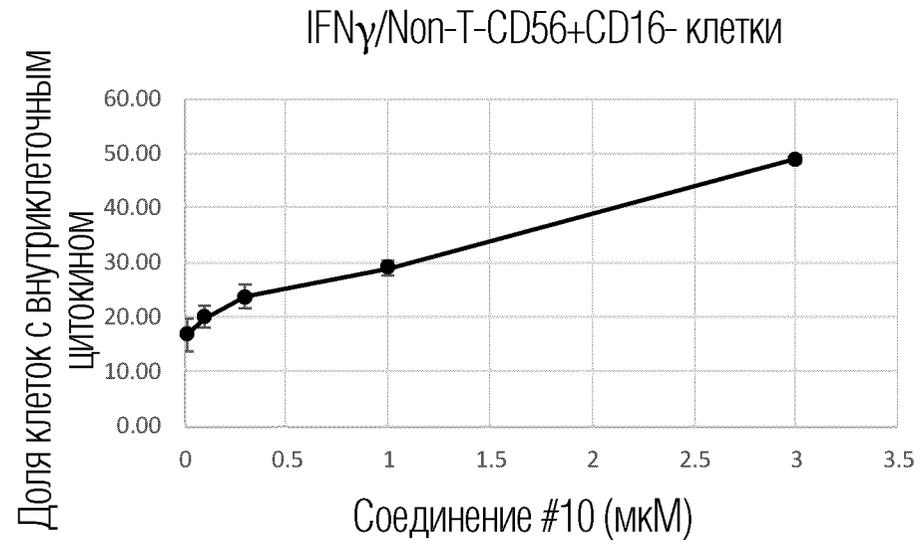


ФИГ. 36А

Индукция IFN γ посредством соединения #10 в клетках NK



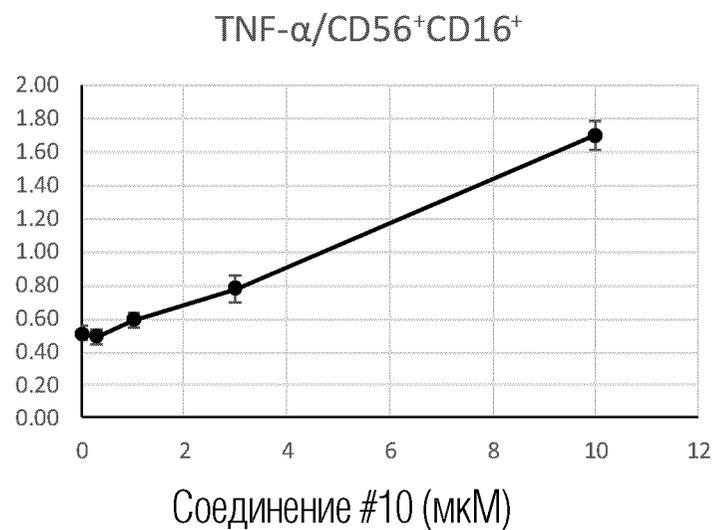
ФИГ. 36В



ФИГ. 36С

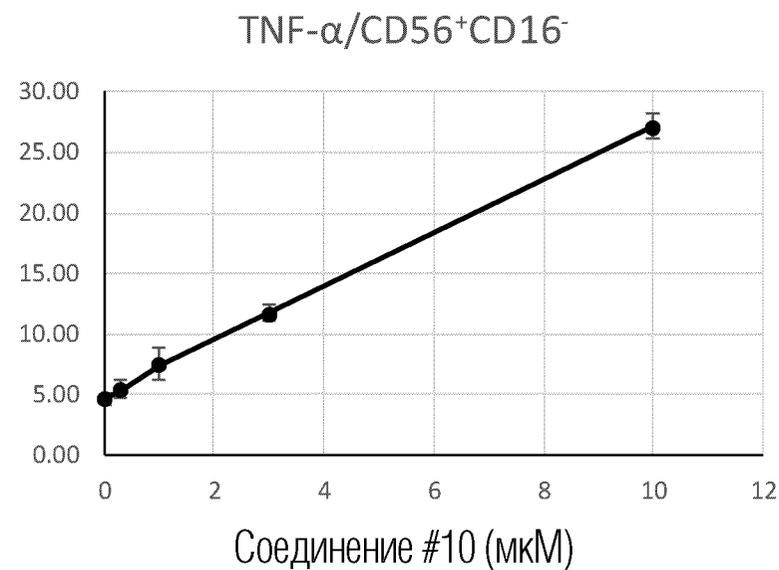
Индукция TNF- α посредством соединения #10 в клетках NK

Доля клеток с внутриклеточным цитокином



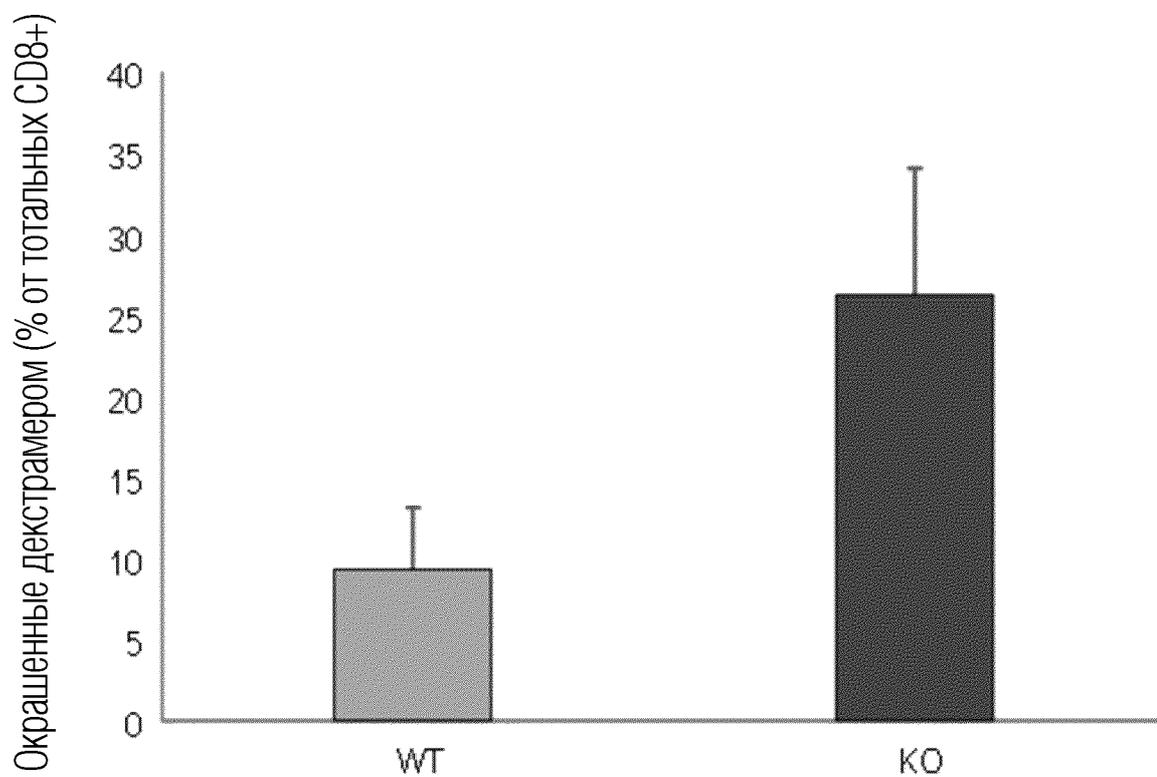
ФИГ. 36D

Доля клеток с внутриклеточным цитокином



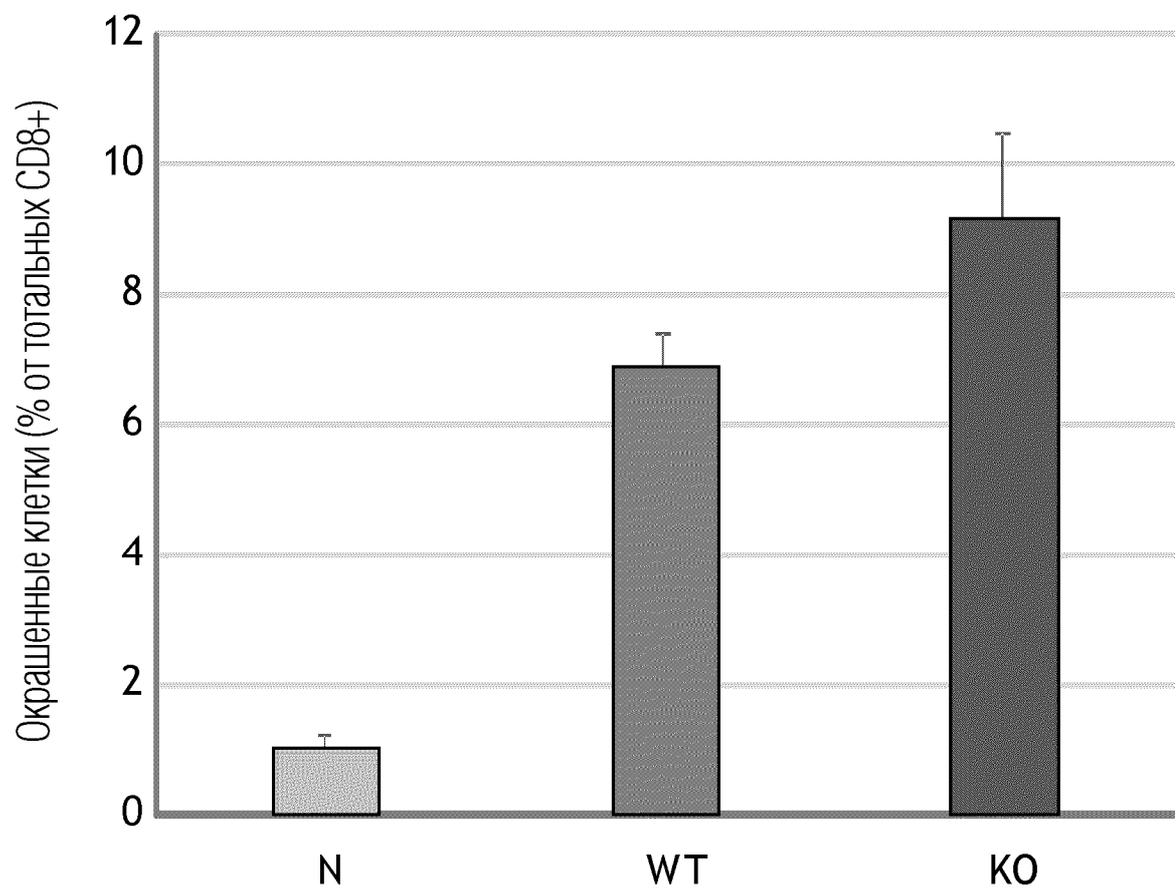
ФИГ. 36E

Эффект GPR174 на размноженные *in vivo* специфические для вируса гриппа CD8+ клетки после инфекции мышей вирусом гриппа PR8



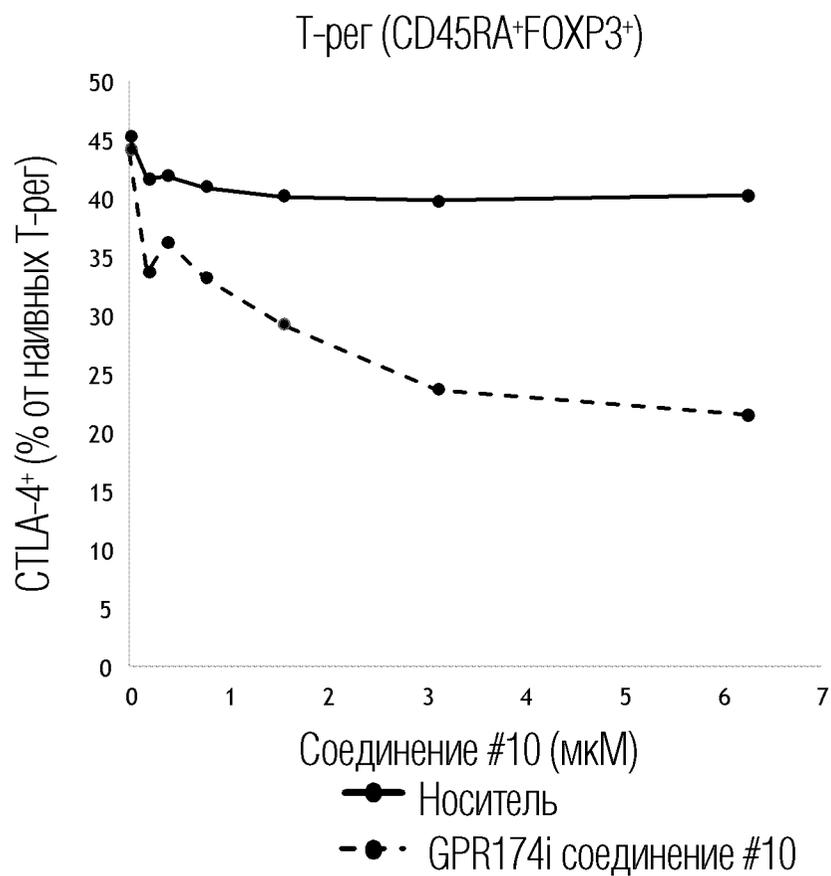
ФИГ. 37

Окрашивание декстрамером

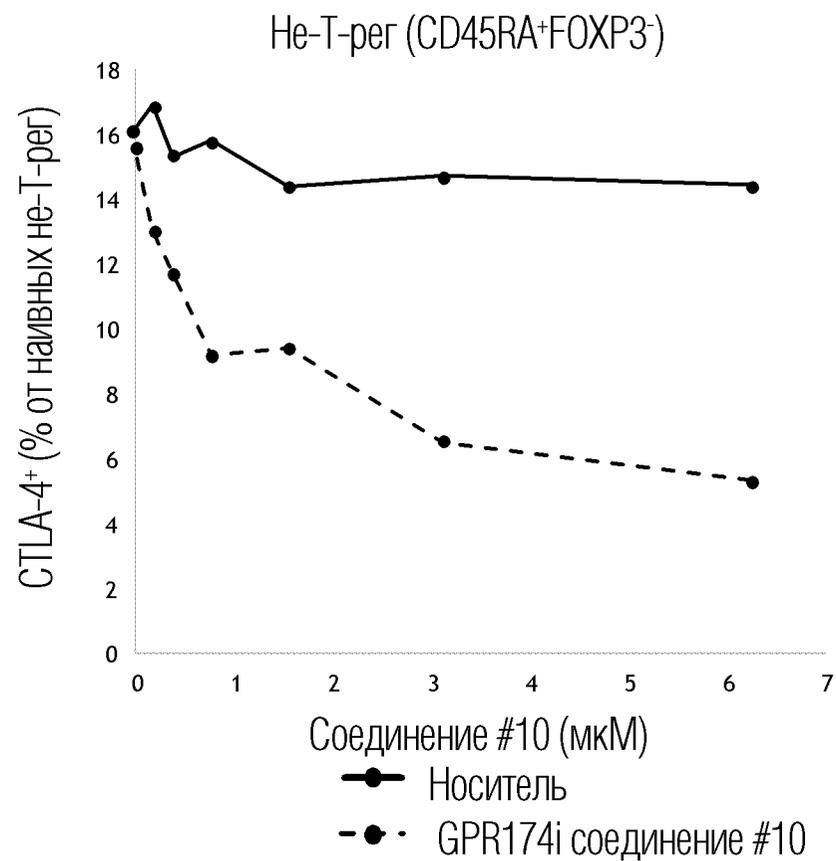


ФИГ. 38

Эффект GPR174i на экспрессию CTLA-4 на наивных Т-клетках человека (одни сутки после стимуляции)

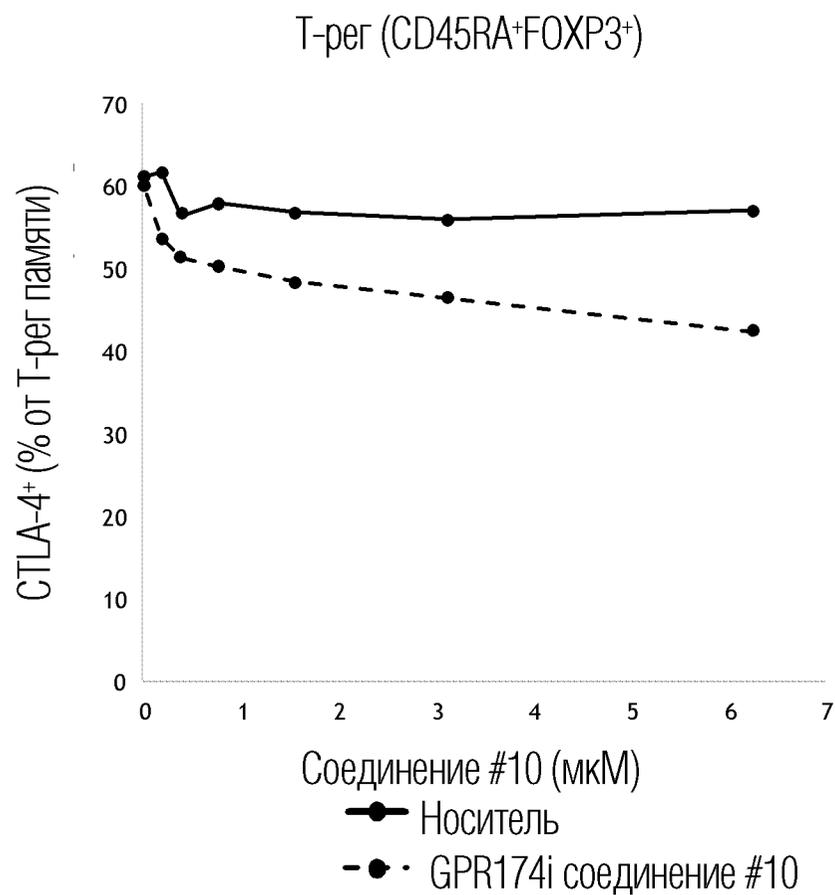


ФИГ. 39А

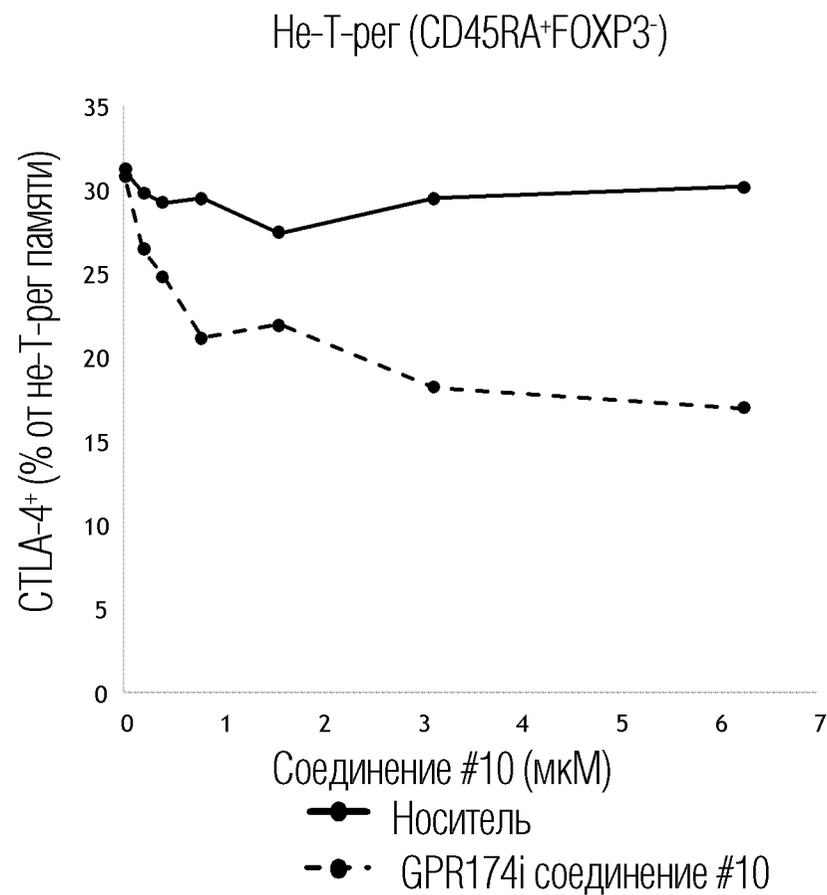


ФИГ. 39В

Эффект GPR174i на экспрессию CTLA-4 на Т-клетках памяти человека (одни сутки после стимуляции)

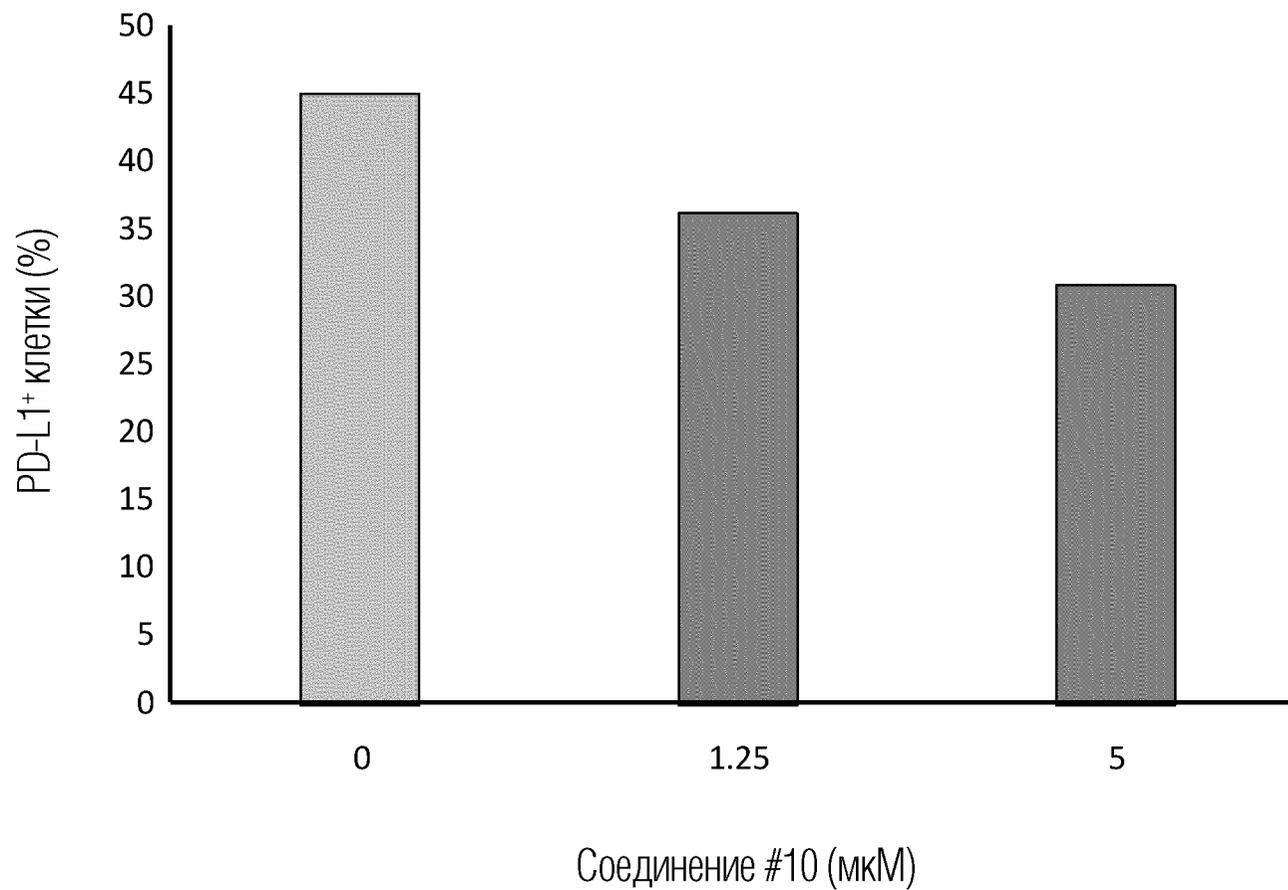


ФИГ. 40А



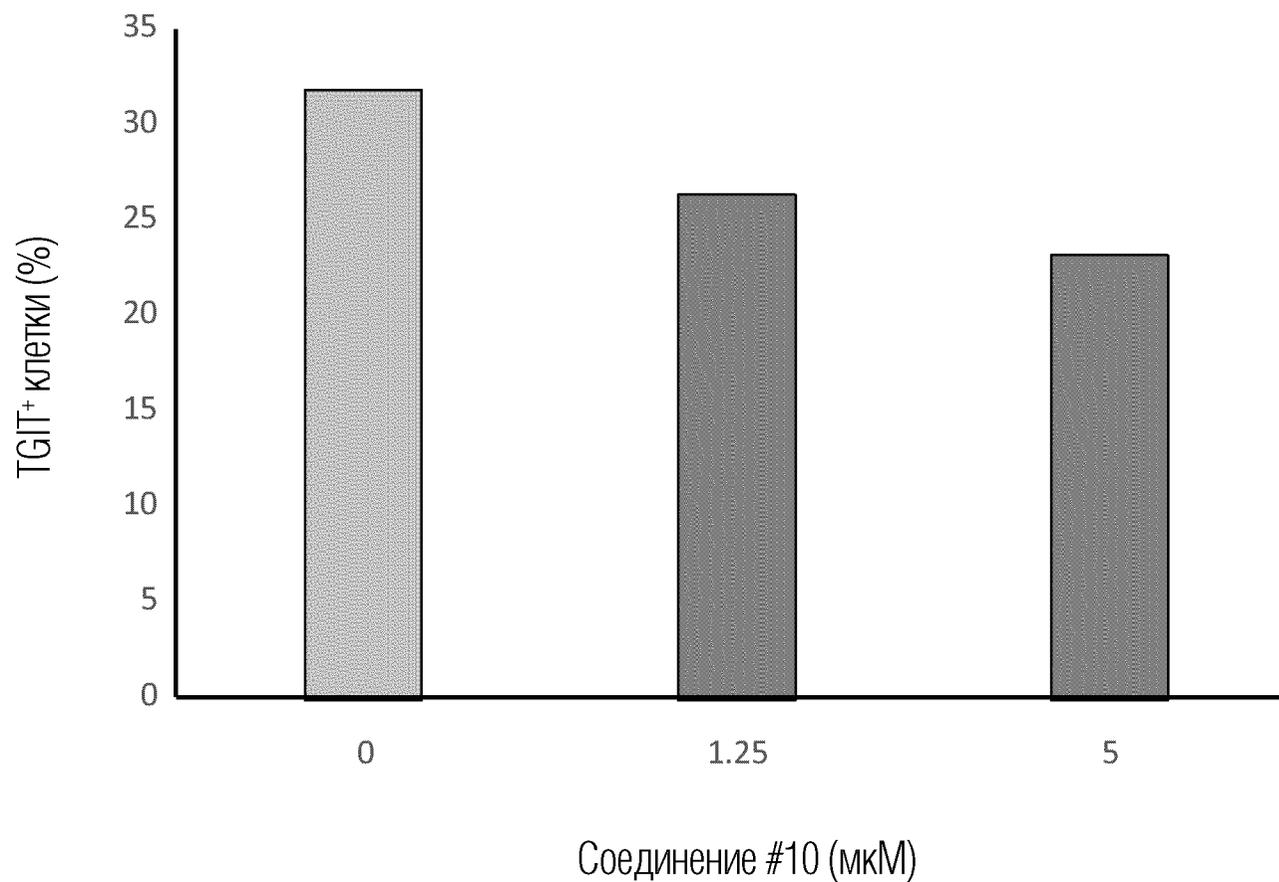
ФИГ. 40В

Эффект GPR174i на экспрессию PD-L1 на CD4 T-клетках человека (одни сутки после стимуляции)



ФИГ. 41

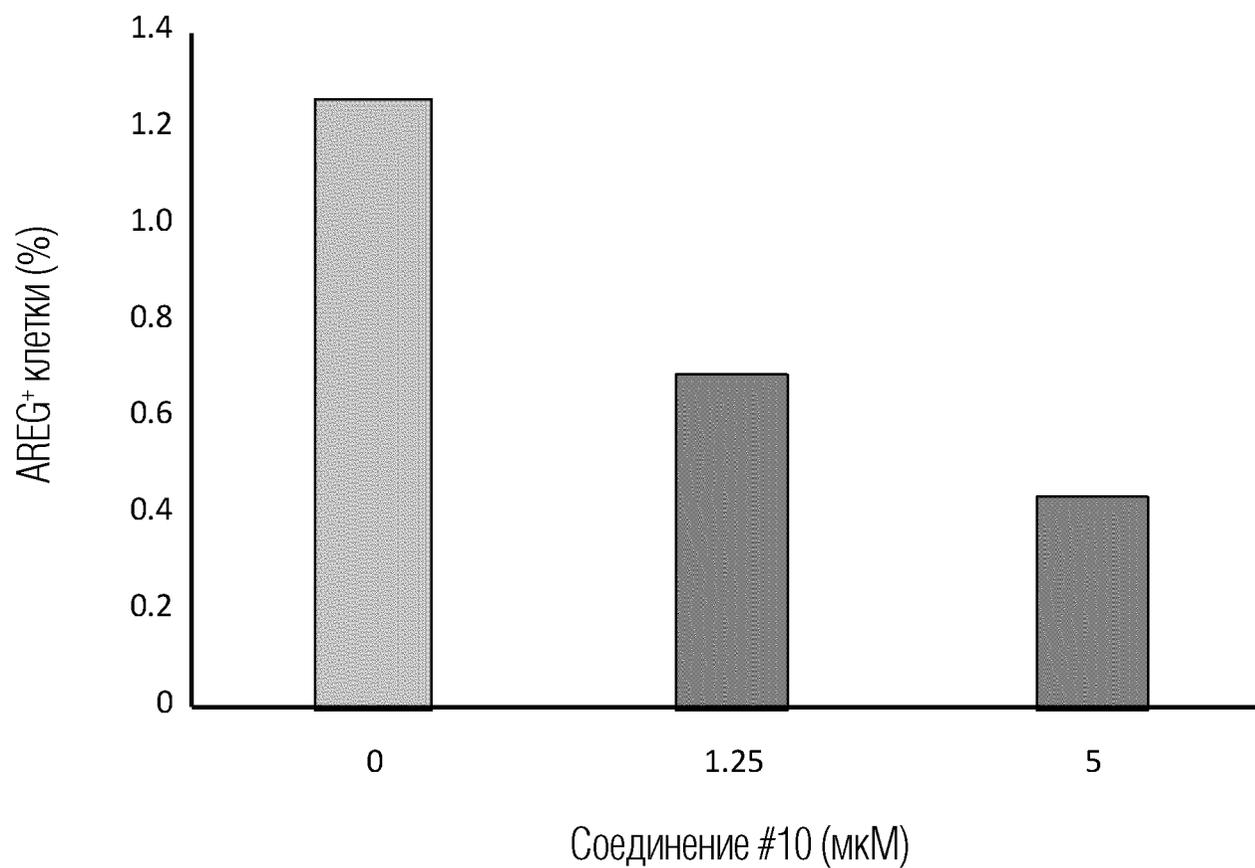
Эффект GPR174i на экспрессию TGIT на CD8 T-клетках человека (одни сутки после стимуляции)



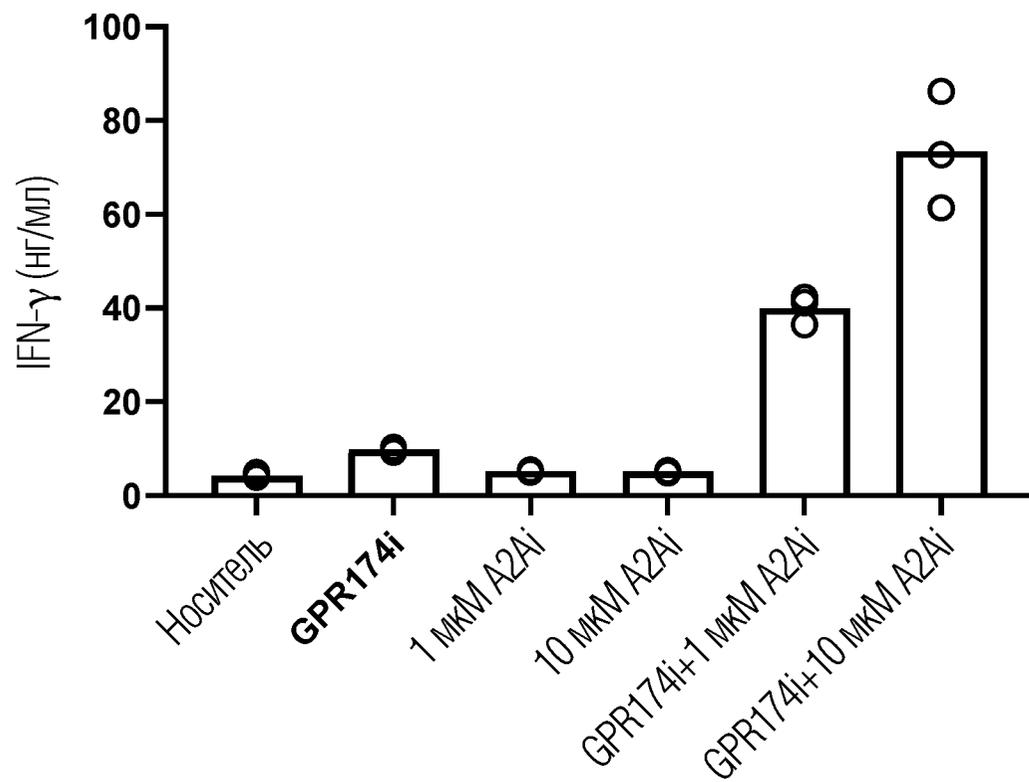
ФИГ. 42

55/106

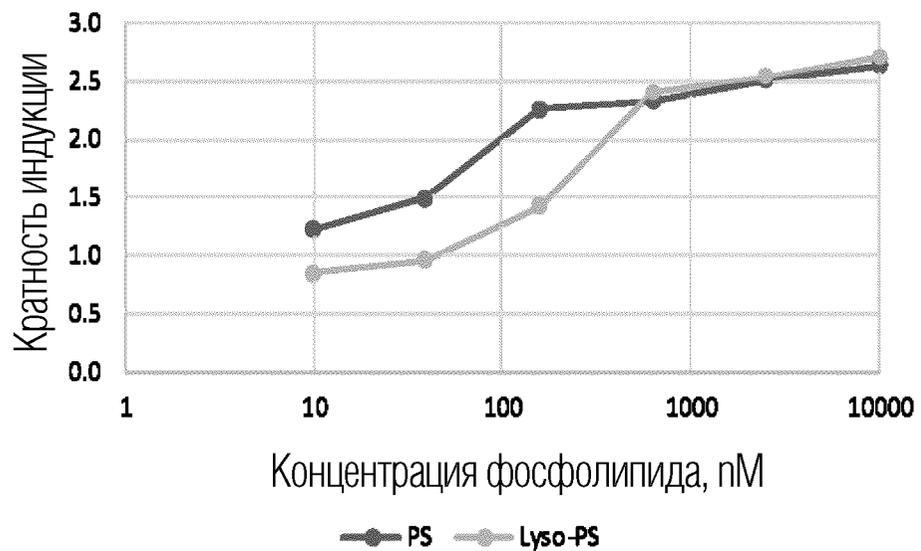
Эффект GPR174i на экспрессию AREG на CD4 T-клетках человека (одни сутки после стимуляции)



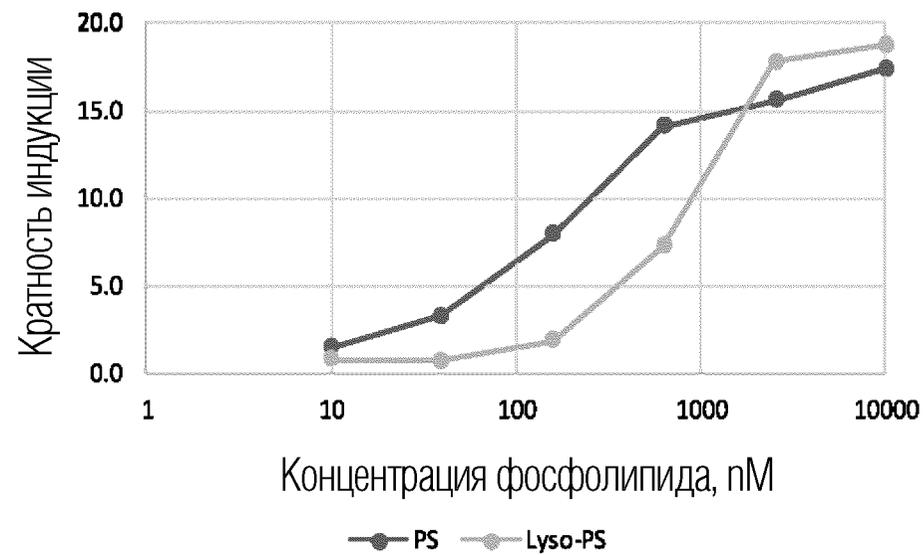
ФИГ. 43



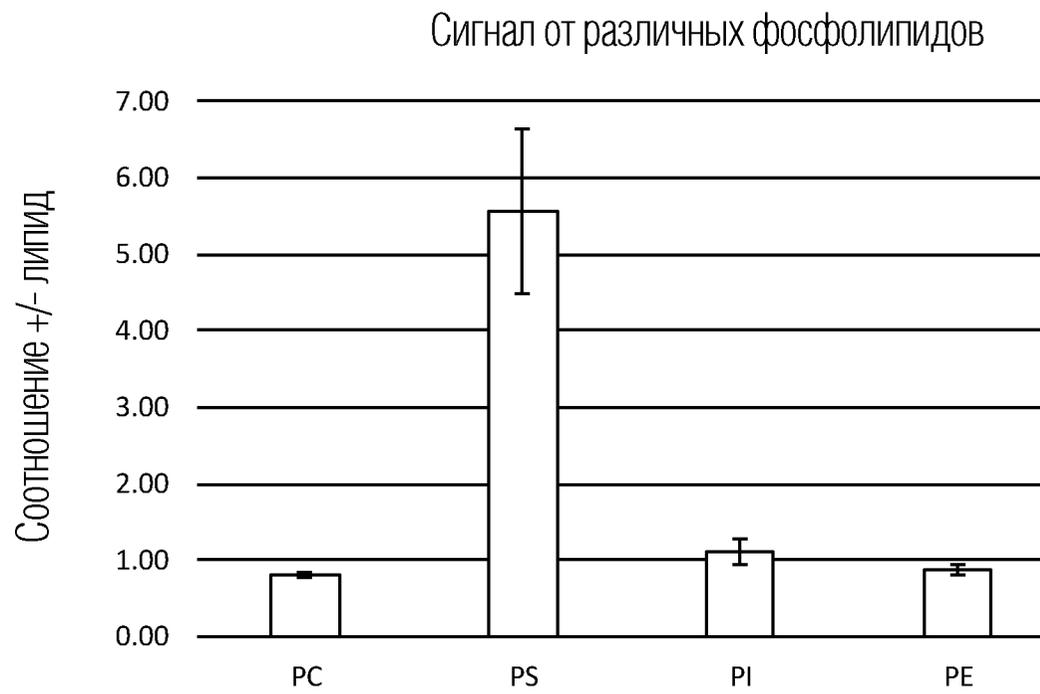
ФИГ. 44



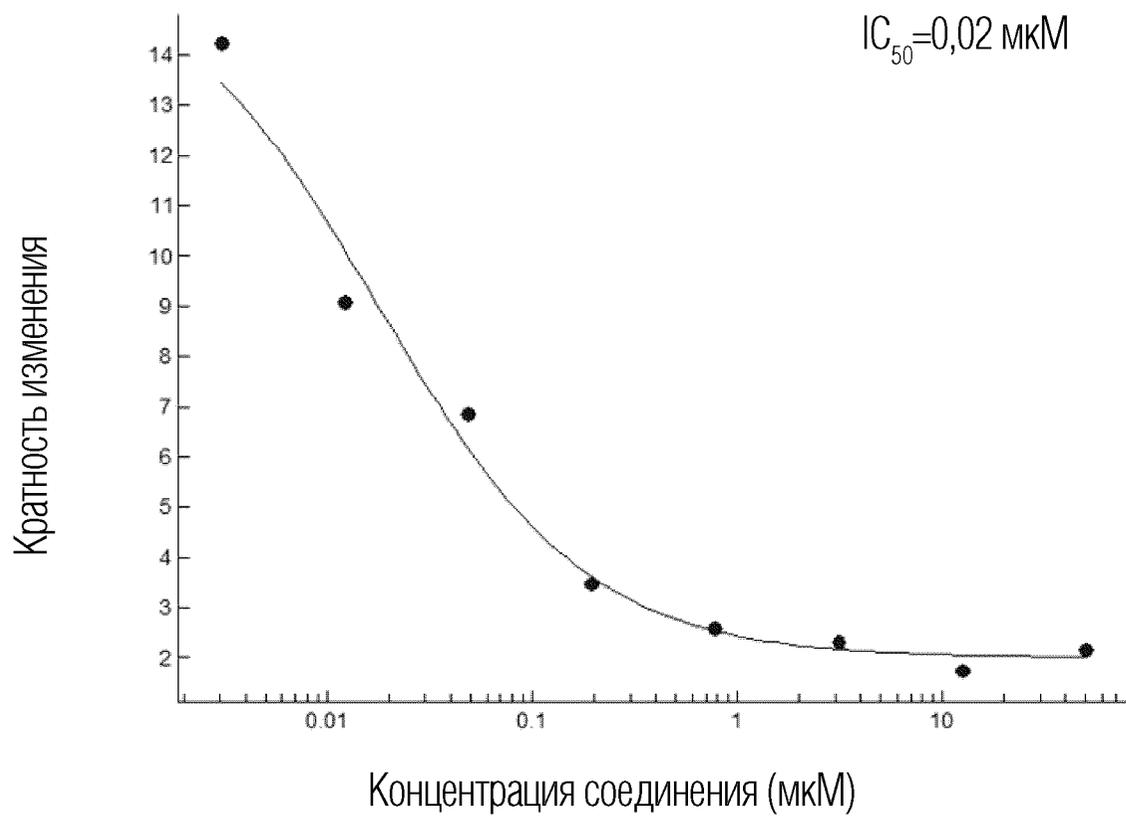
ФИГ. 45А



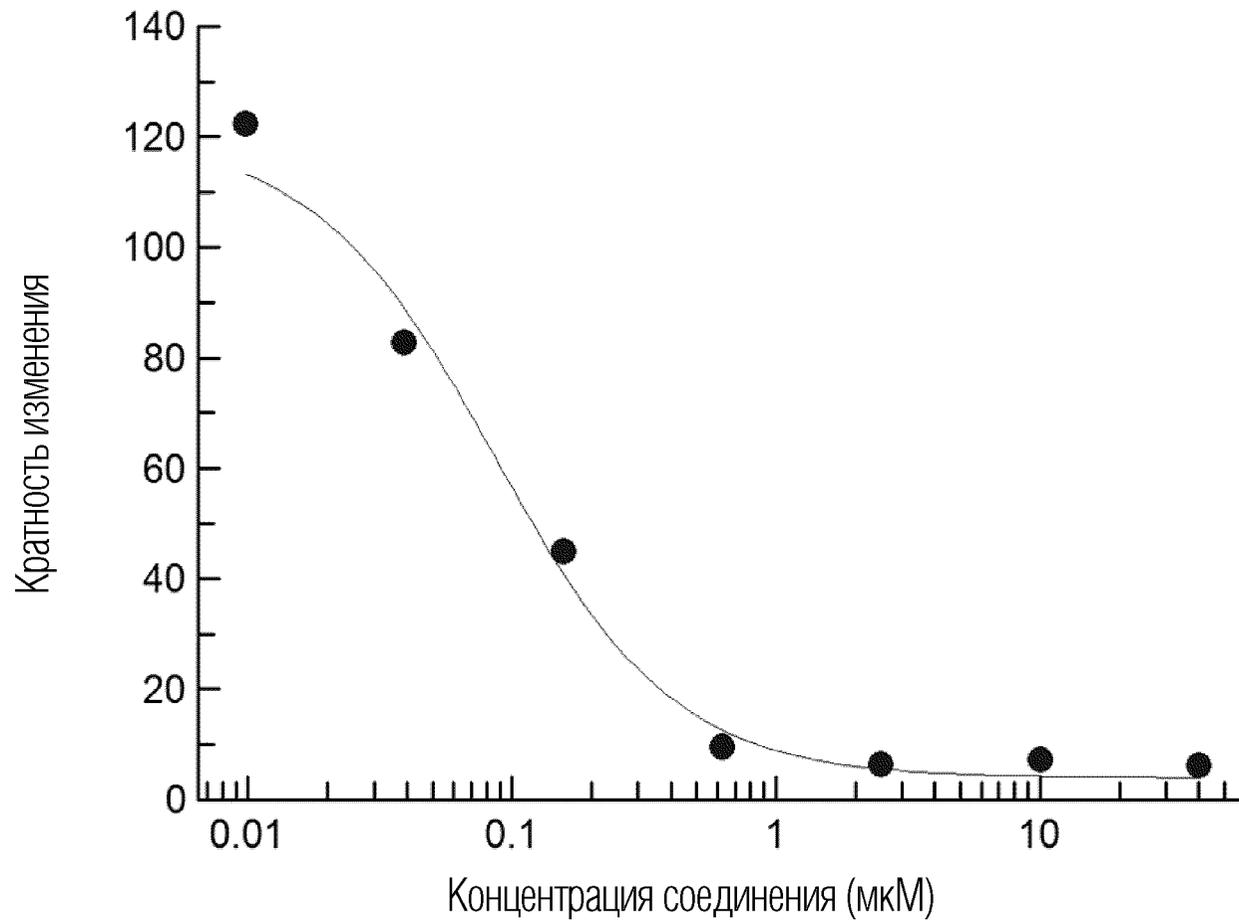
ФИГ. 45В



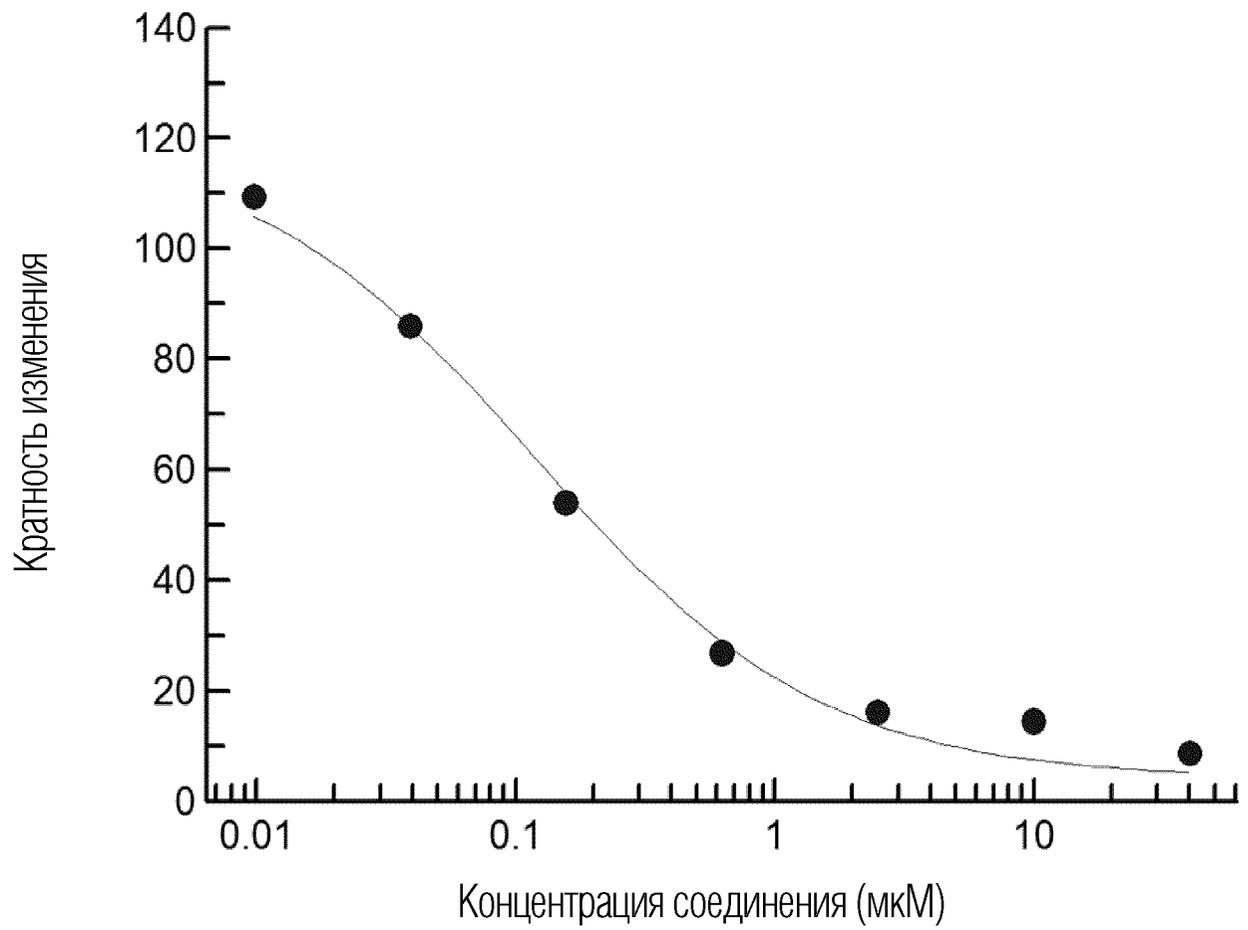
ФИГ. 46



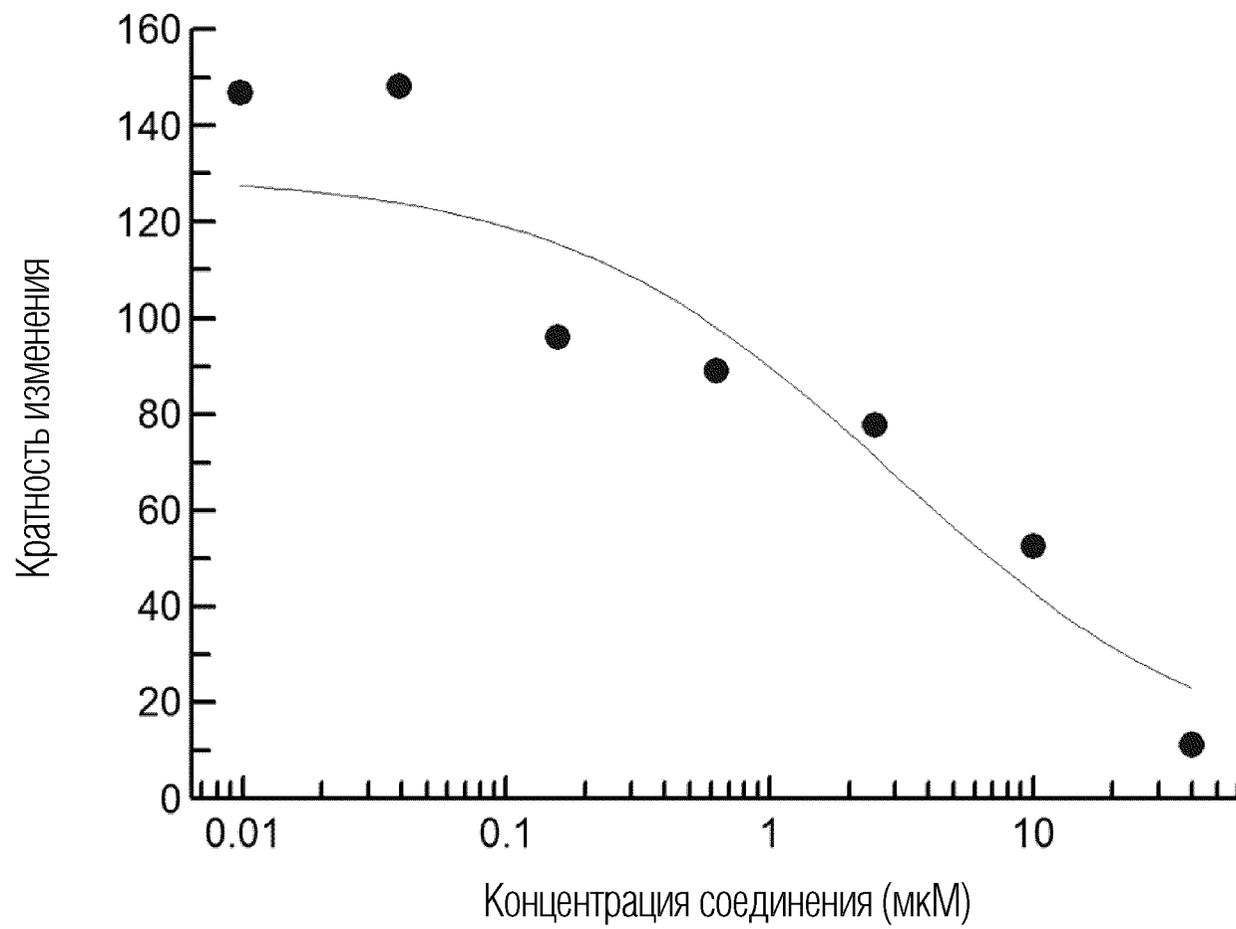
ФИГ. 47А



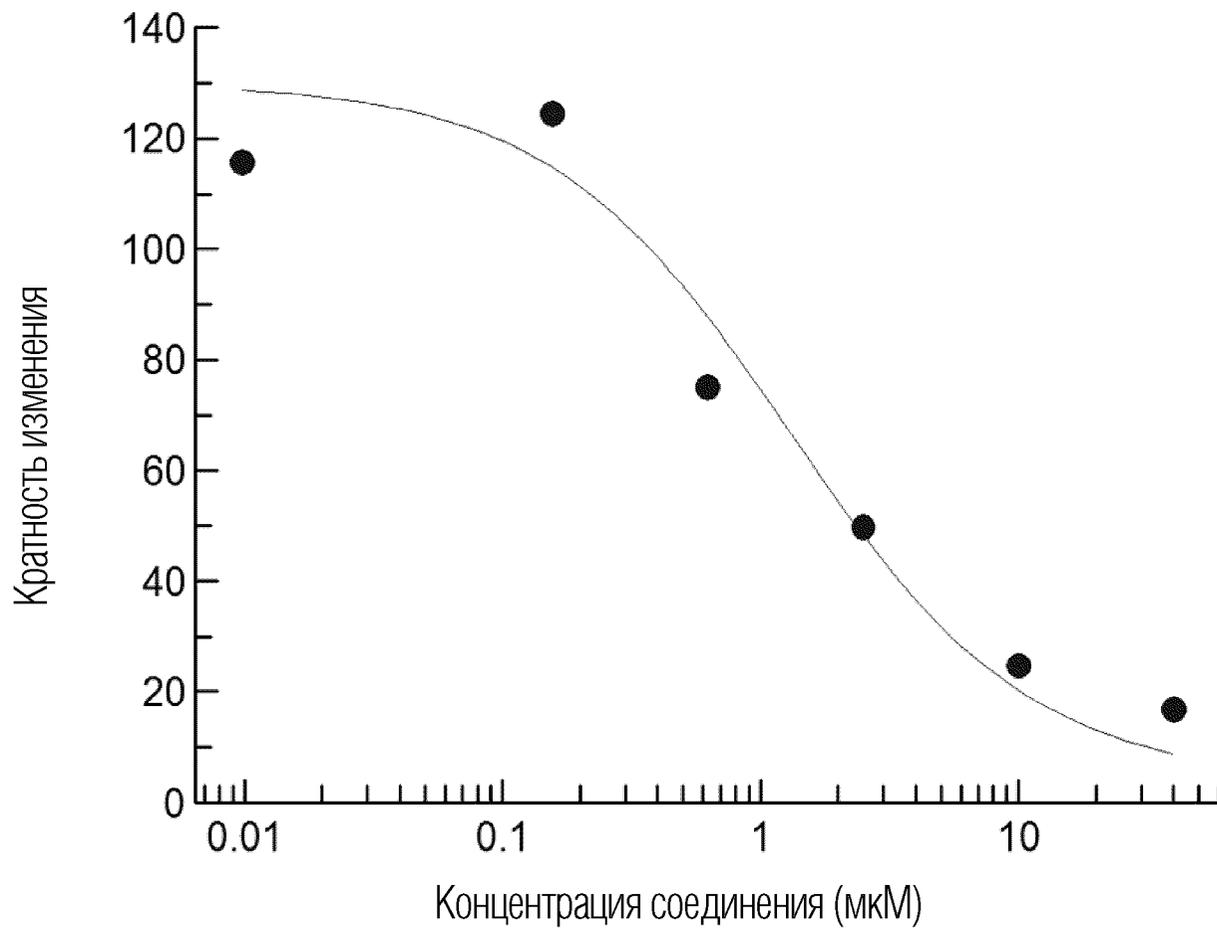
ФИГ. 47В



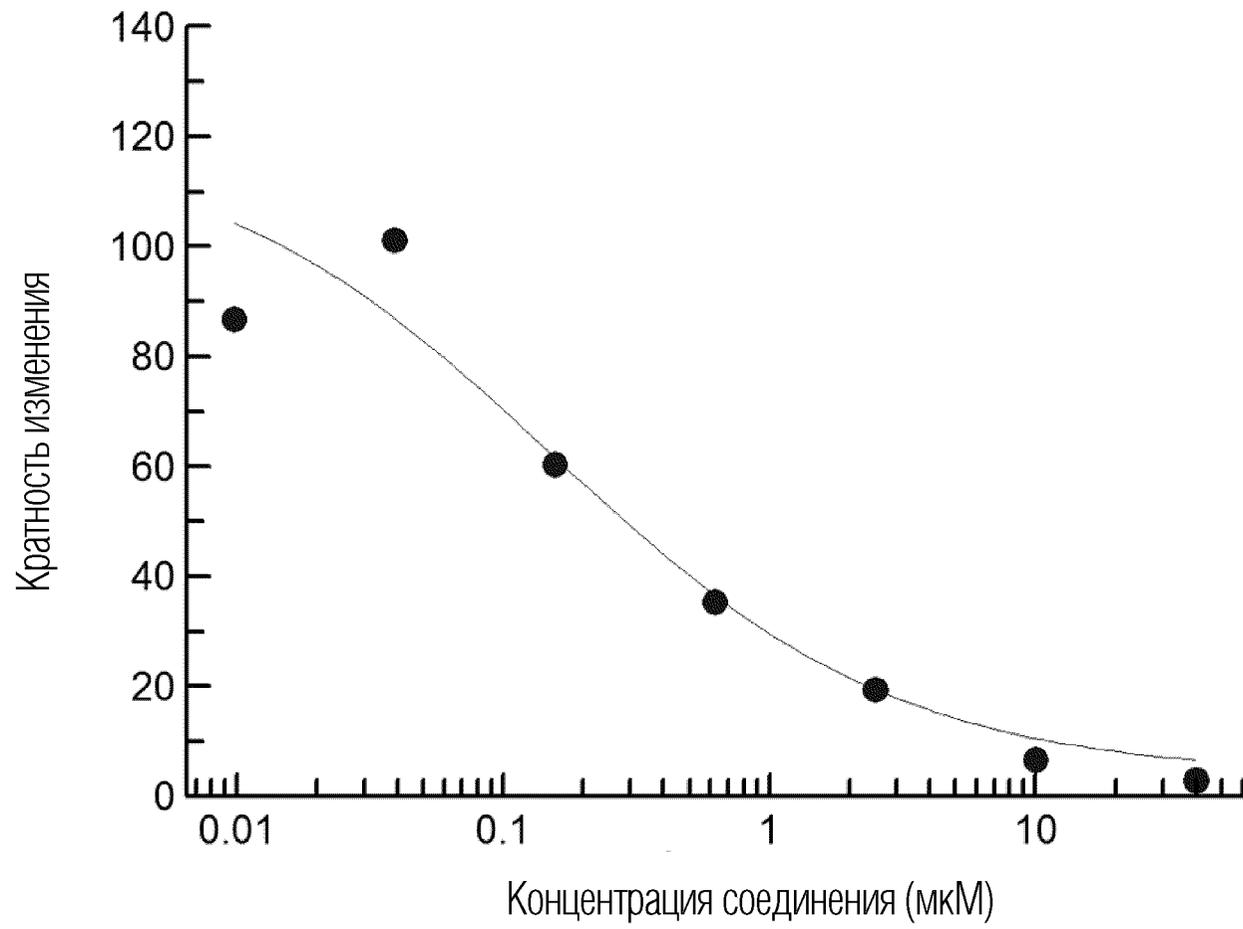
ФИГ. 47С



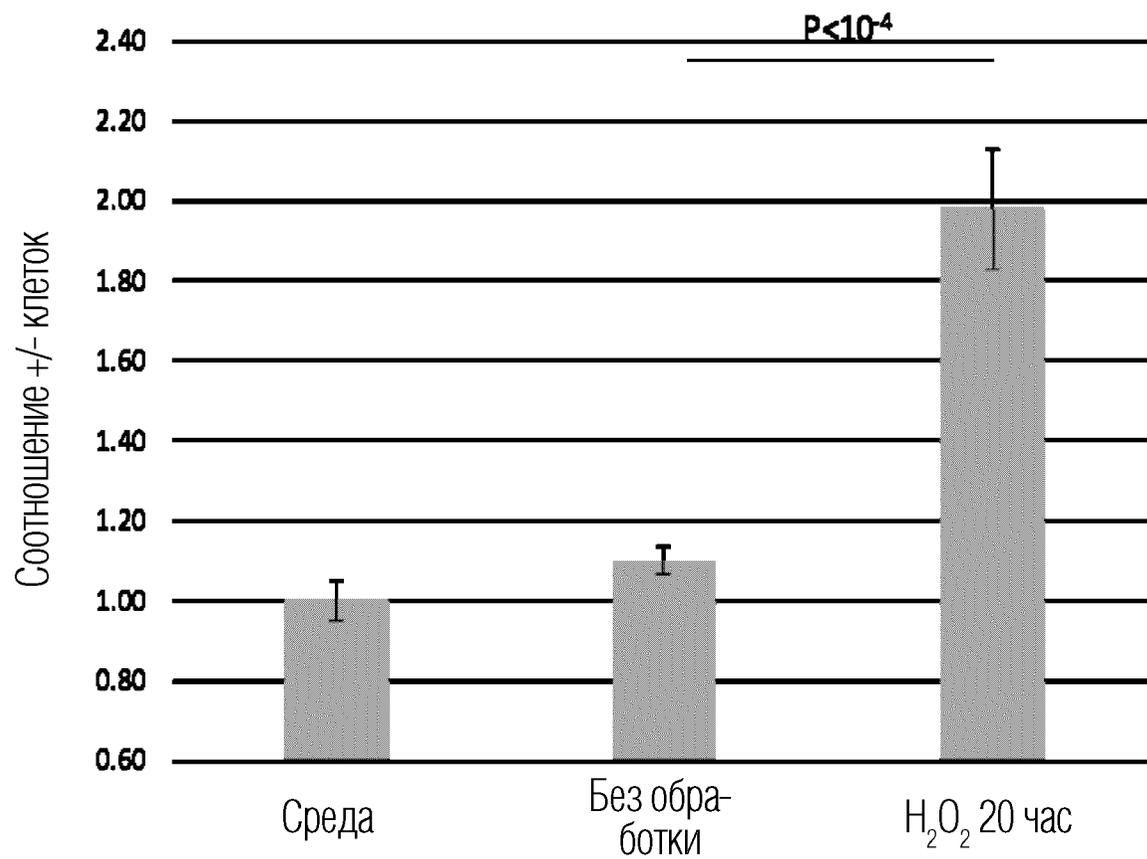
ФИГ. 47D



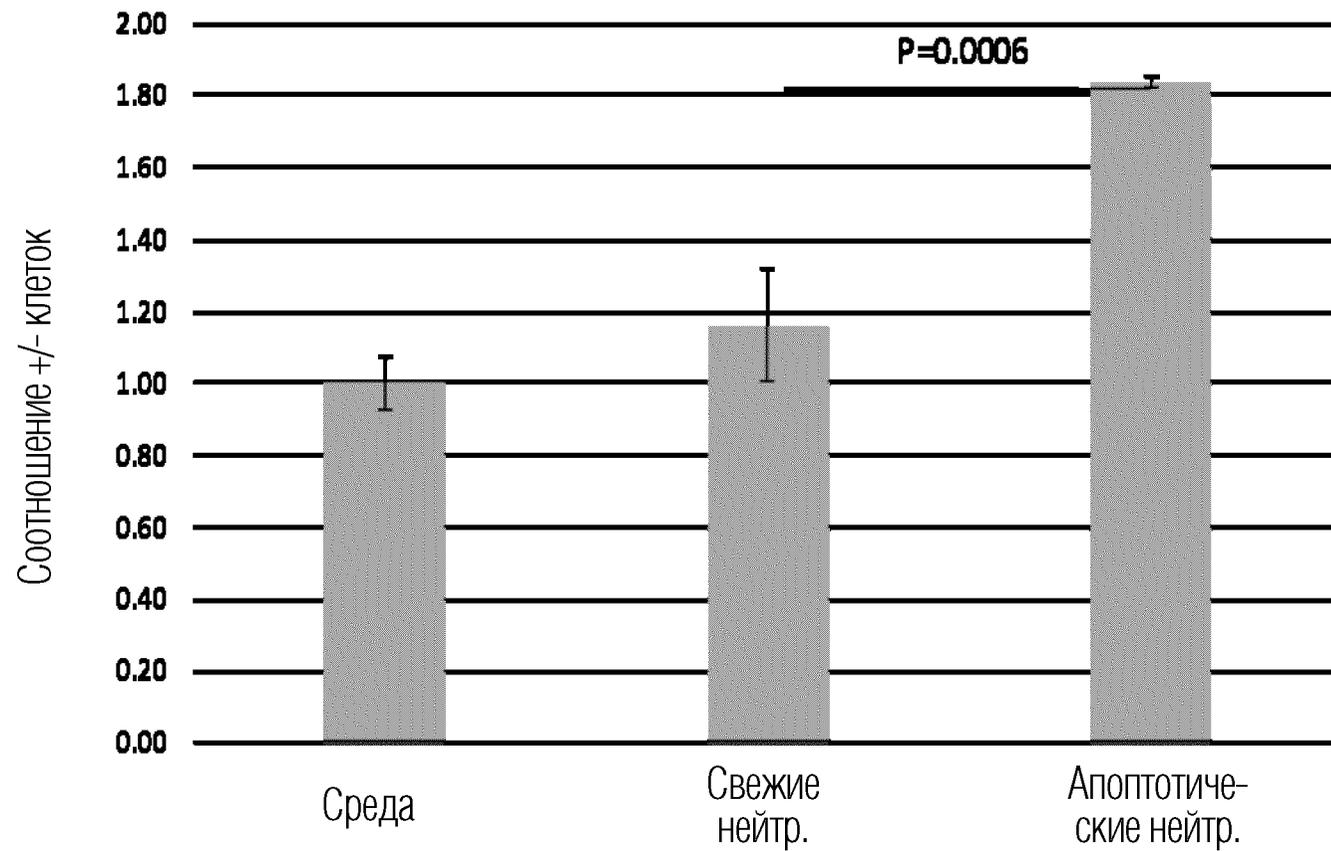
ФИГ. 47Е



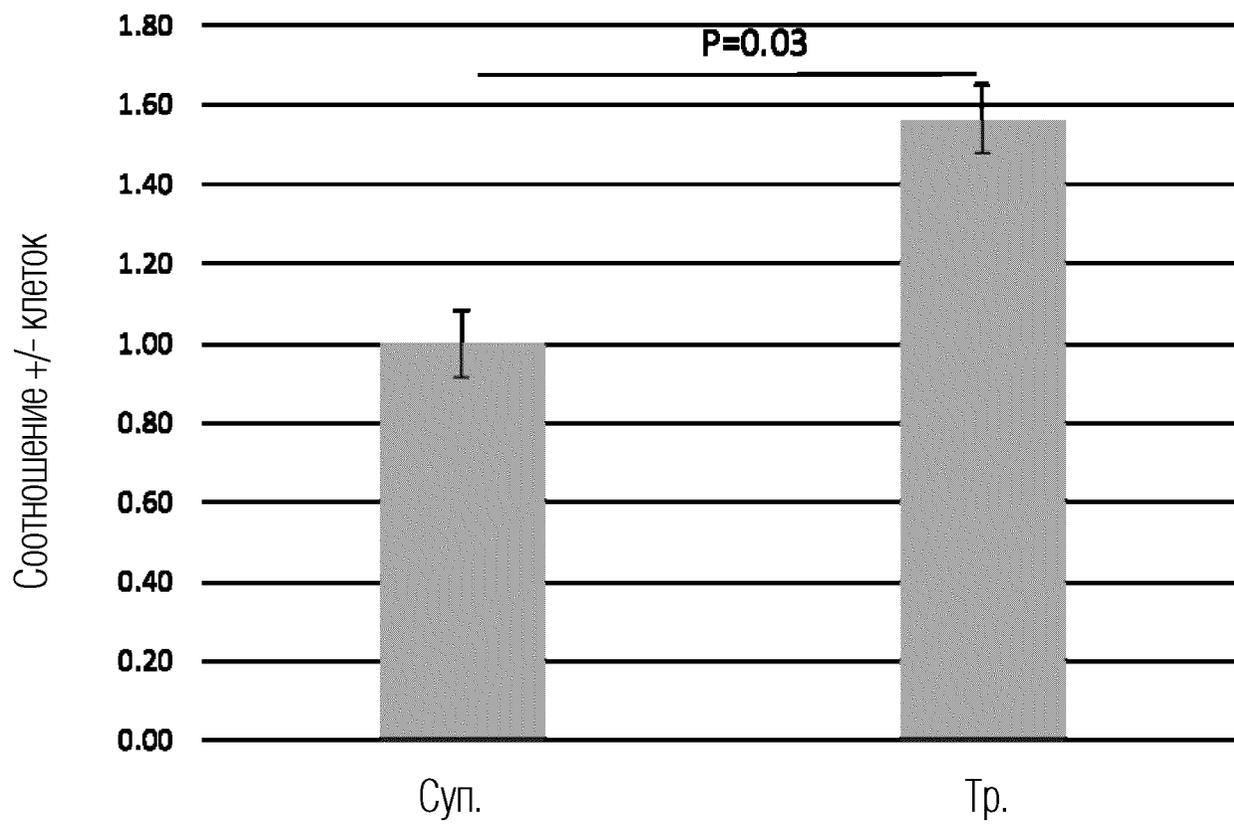
ФИГ. 47F



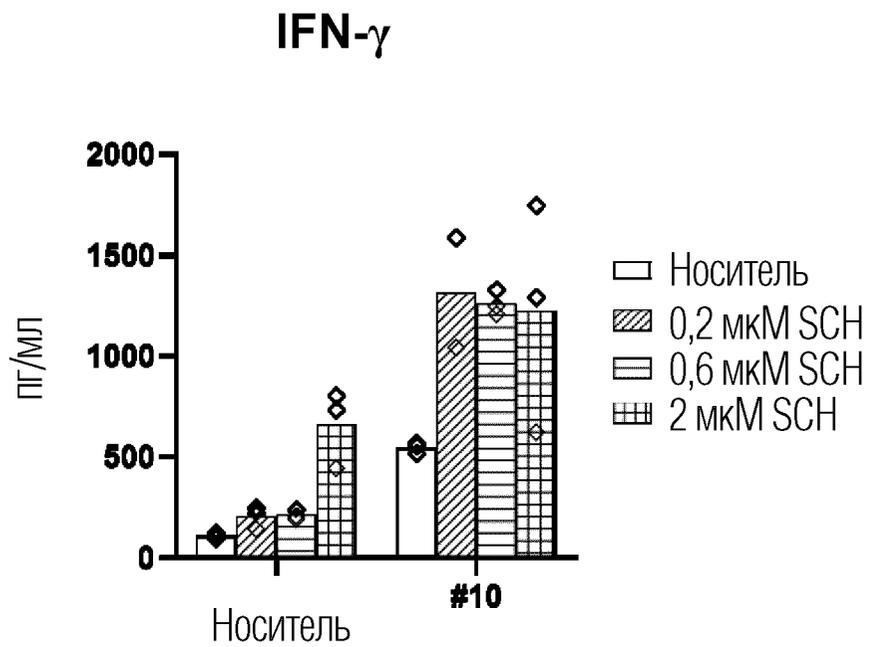
ФИГ. 48А



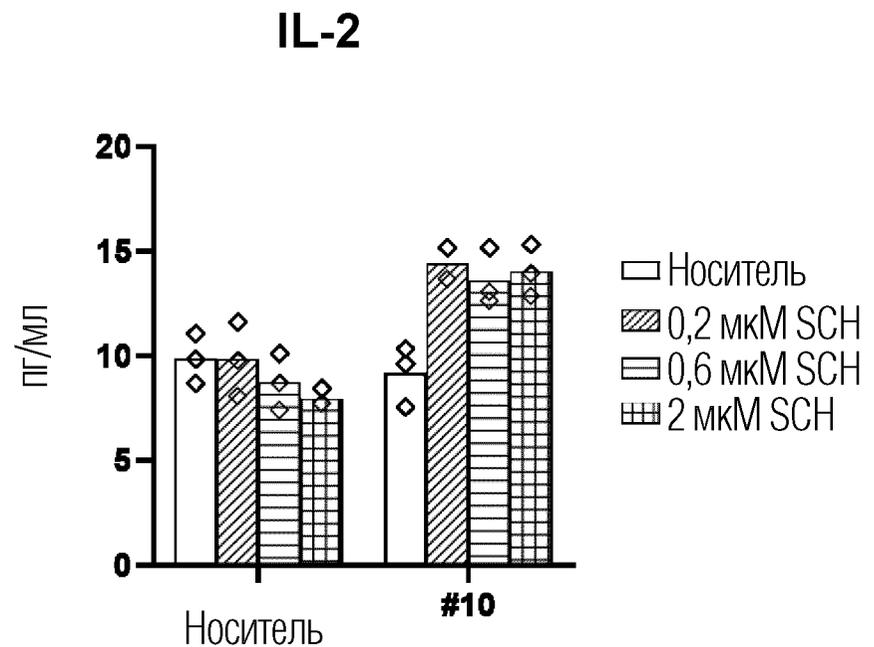
ФИГ. 48В



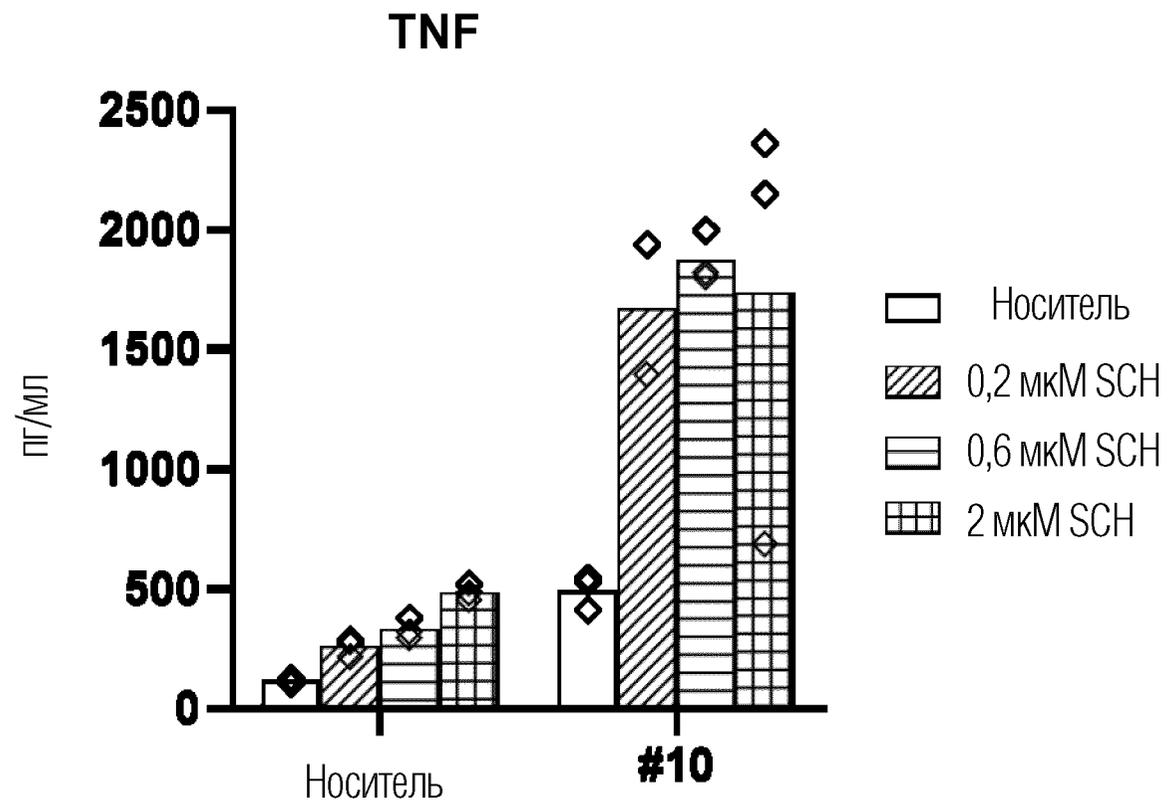
ФИГ. 48С



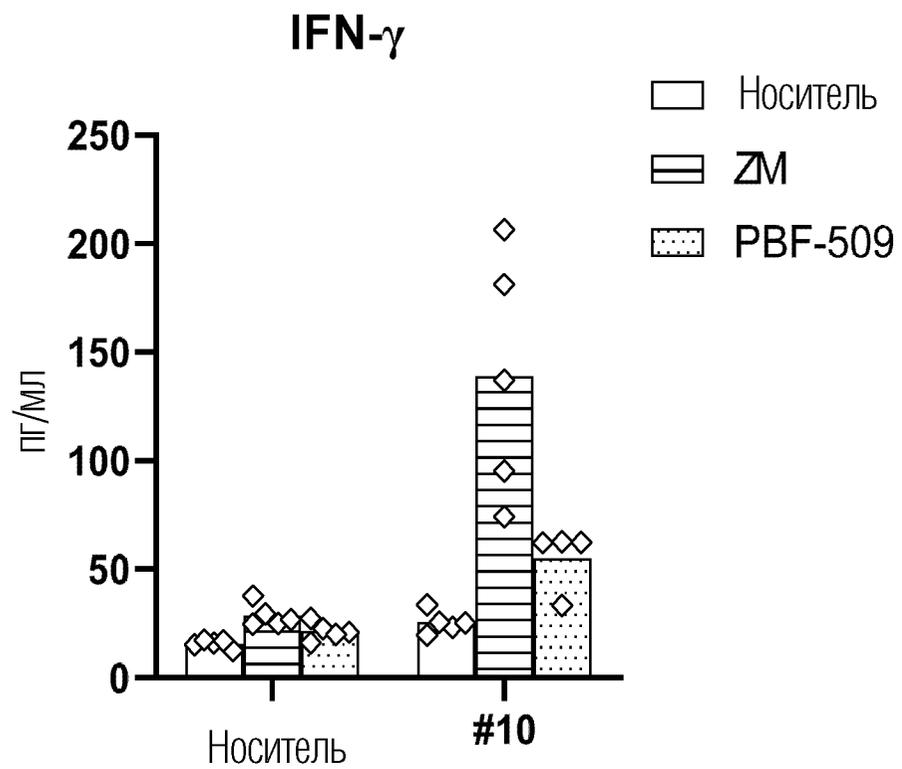
ФИГ. 49А



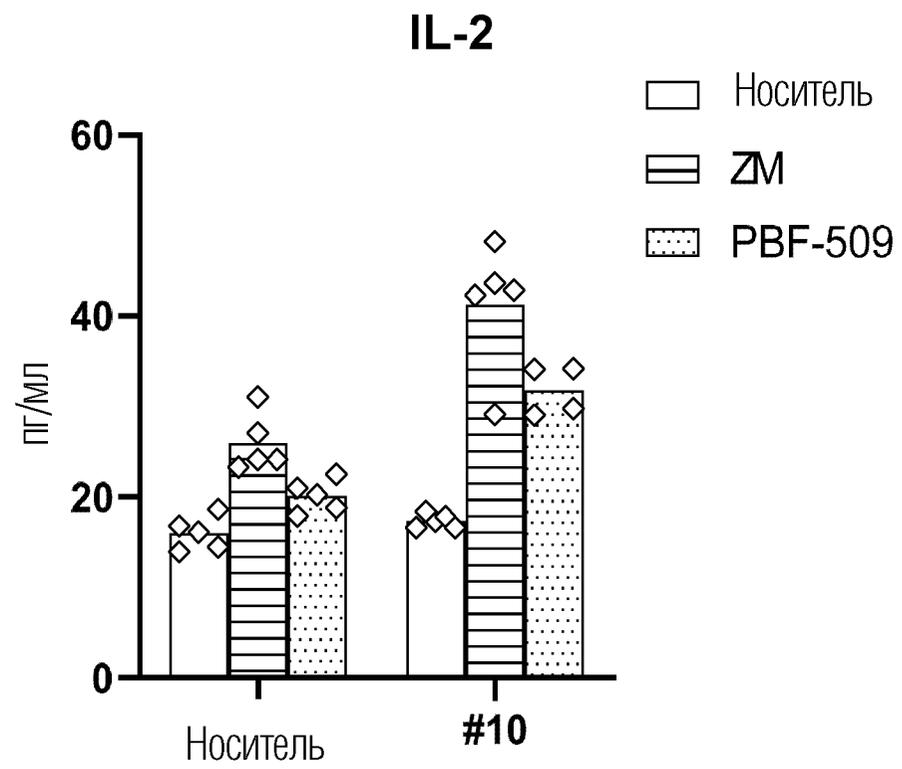
ФИГ. 49В



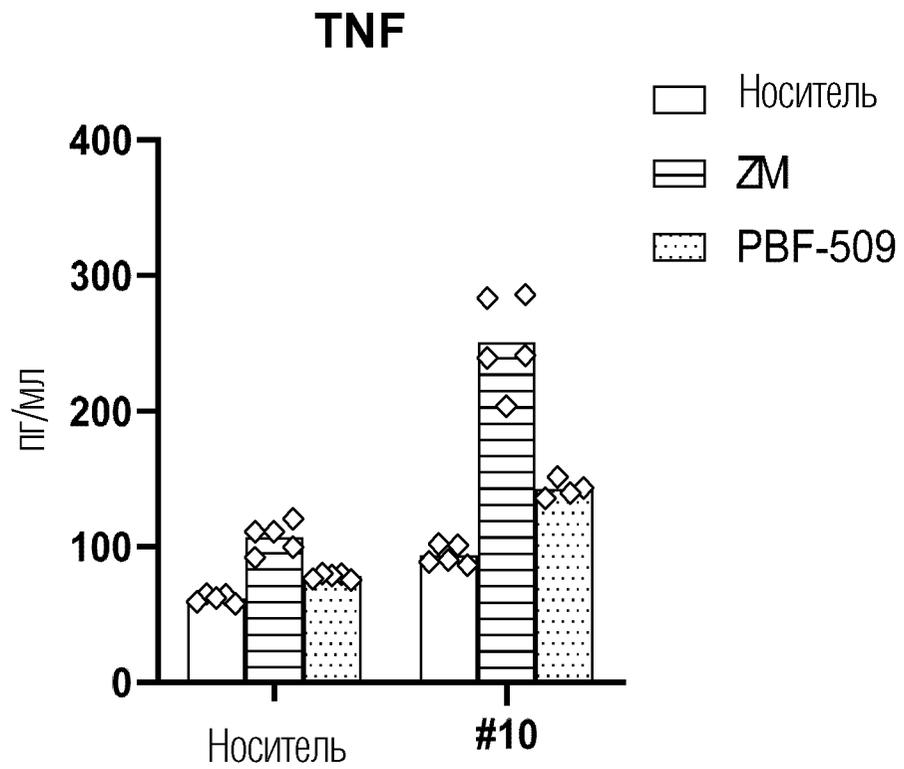
ФИГ. 49С



ФИГ. 50А

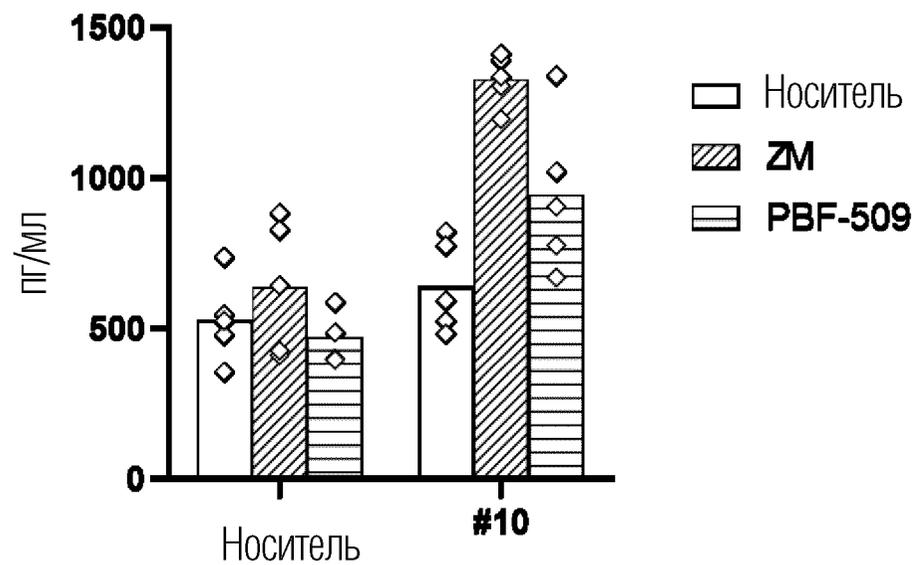


ФИГ. 50В



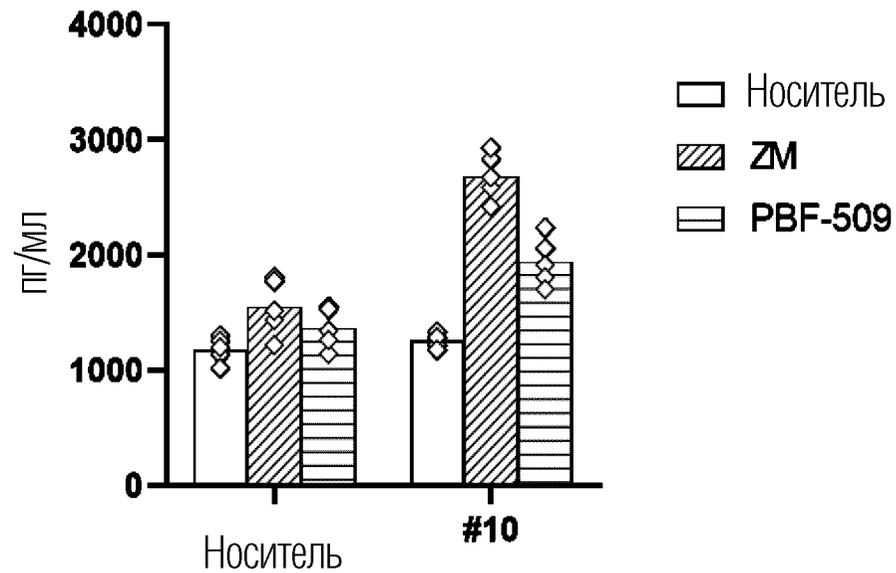
ФИГ. 50С

IFN- γ

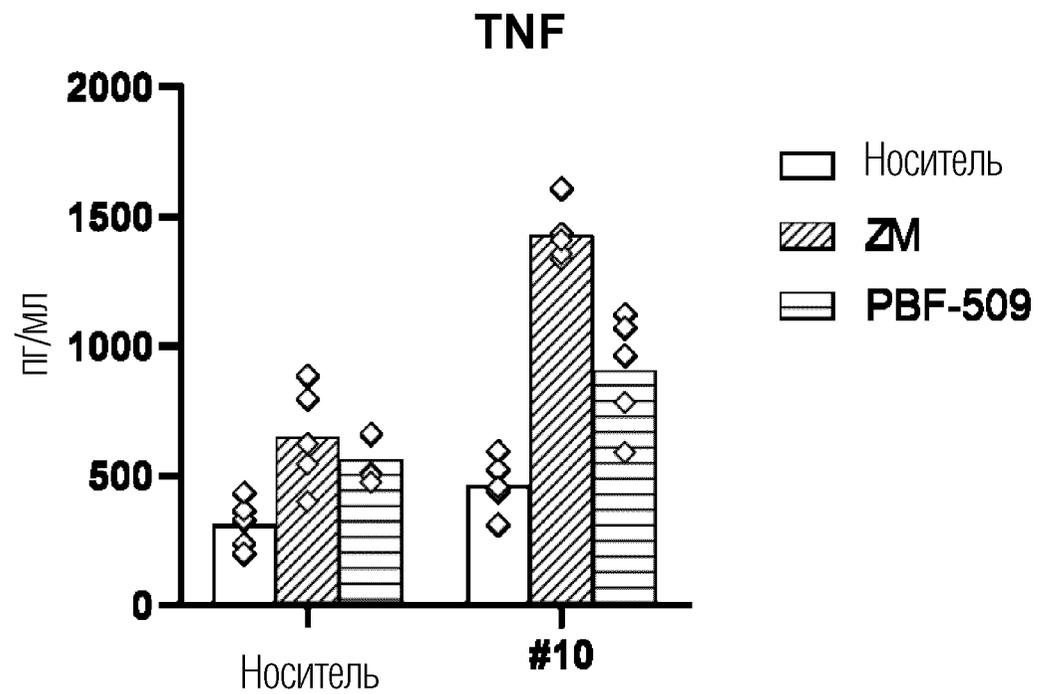


ФИГ. 51А

IL-2

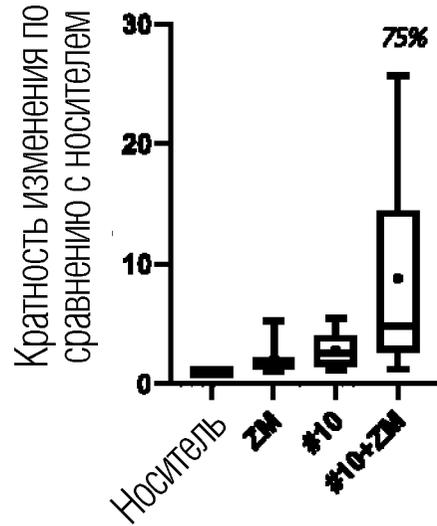


ФИГ. 51В



ФИГ. 51С

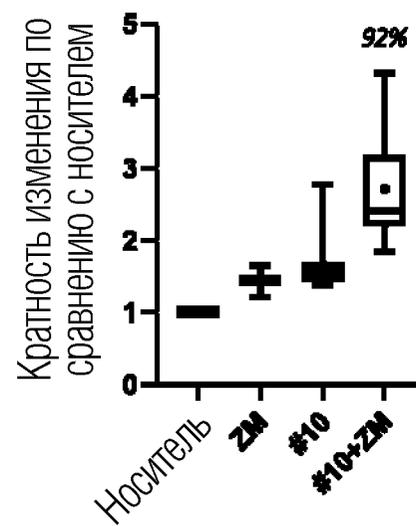
IFN- γ



% доноров, для которых показан синергизм #10/ZM

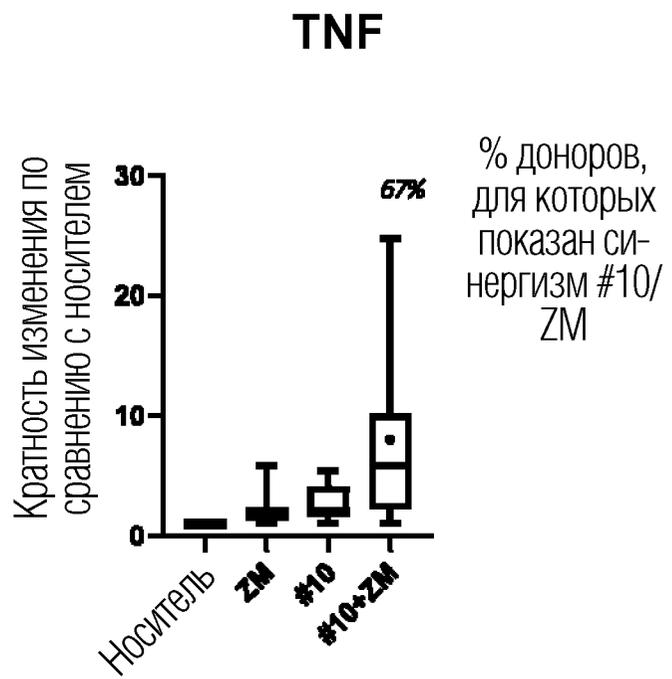
ФИГ. 52А

IL-2

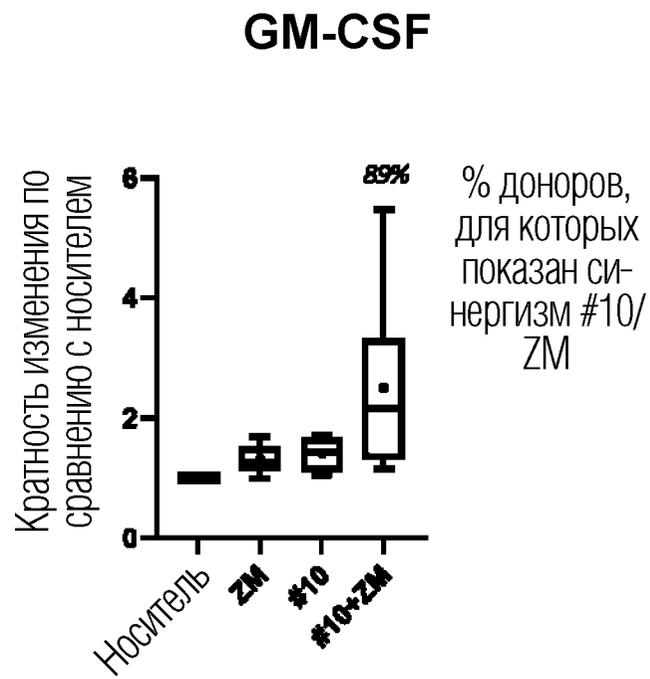


% доноров, для которых показан синергизм #10/ZM

ФИГ. 52В

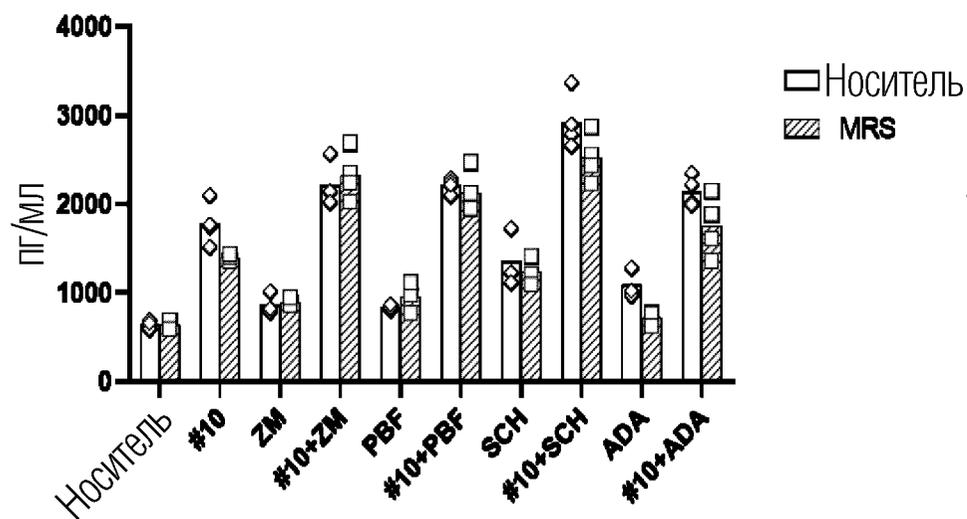


ФИГ. 52С



ФИГ. 52D

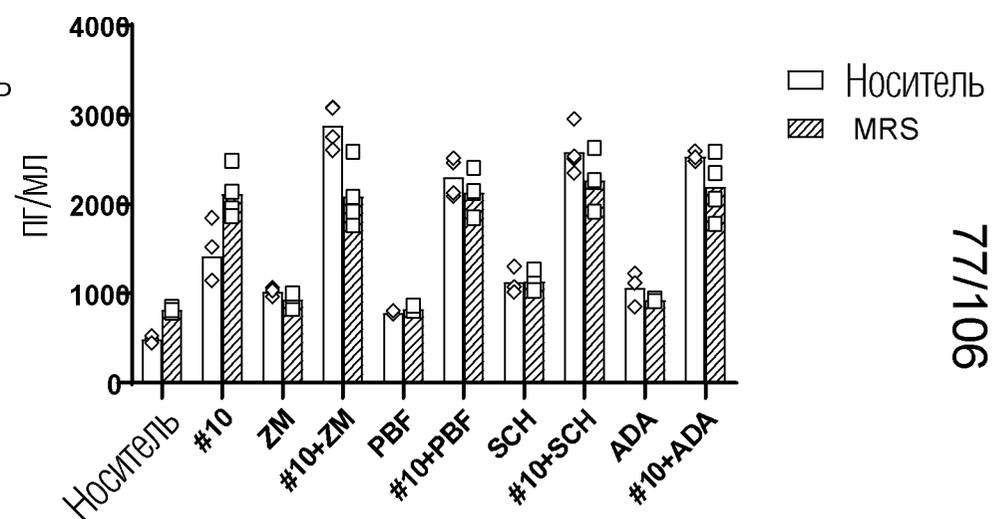
IFN- γ



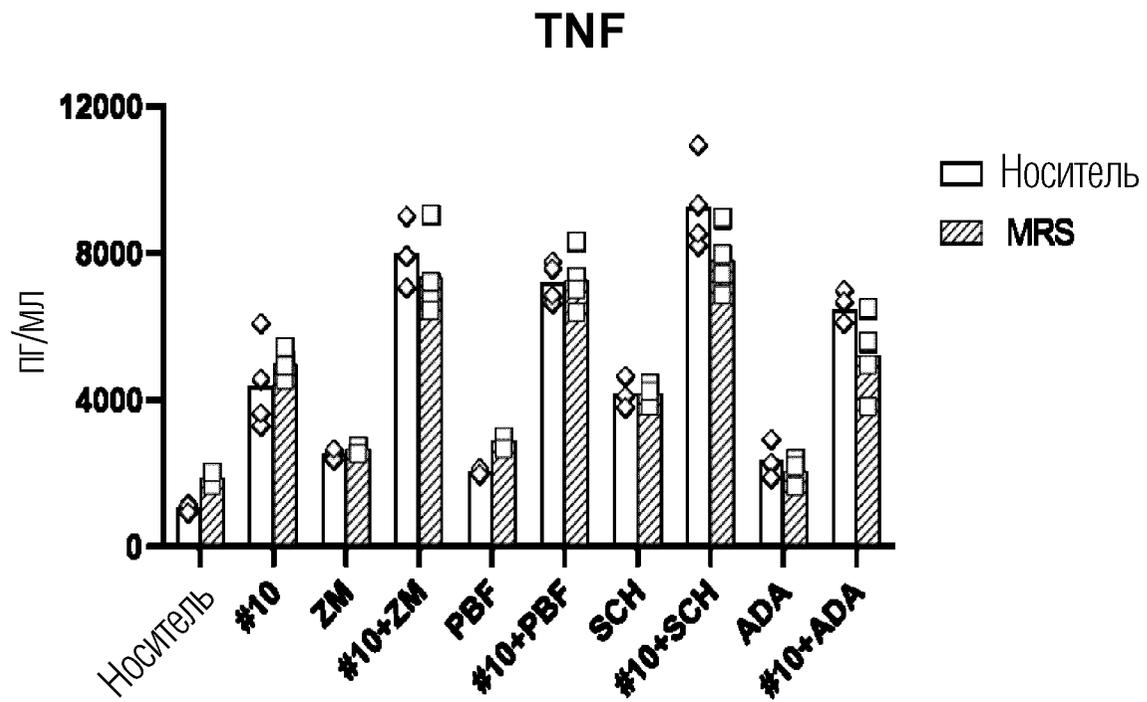
ФИГ. 53А

IL-2

IL-2, донор 403

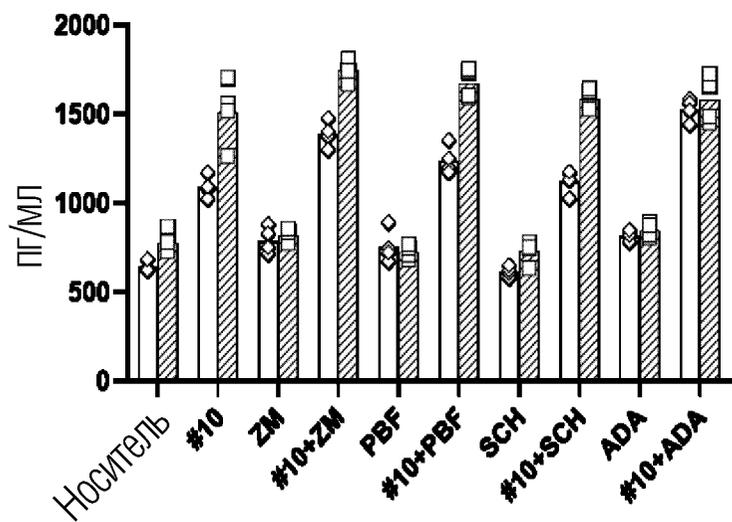


ФИГ. 53В



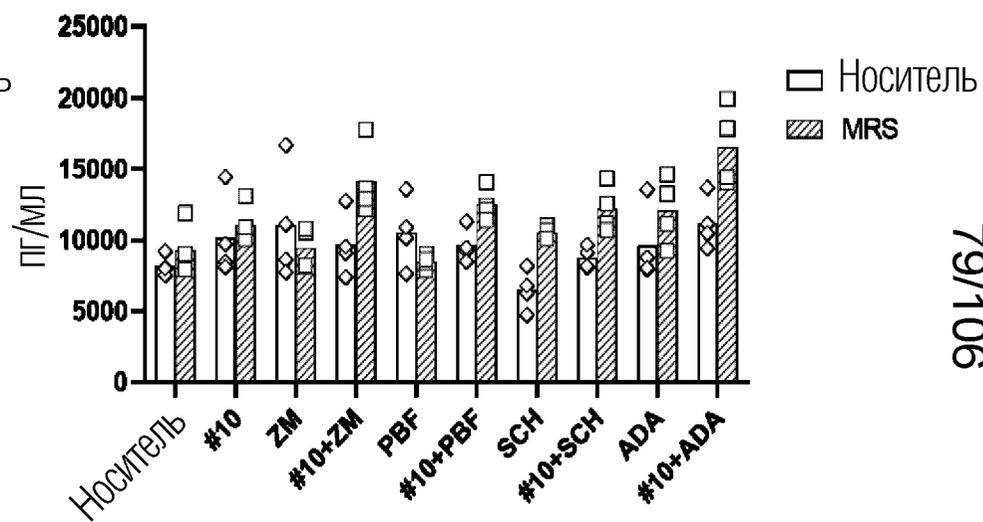
ФИГ. 53С

IL-2



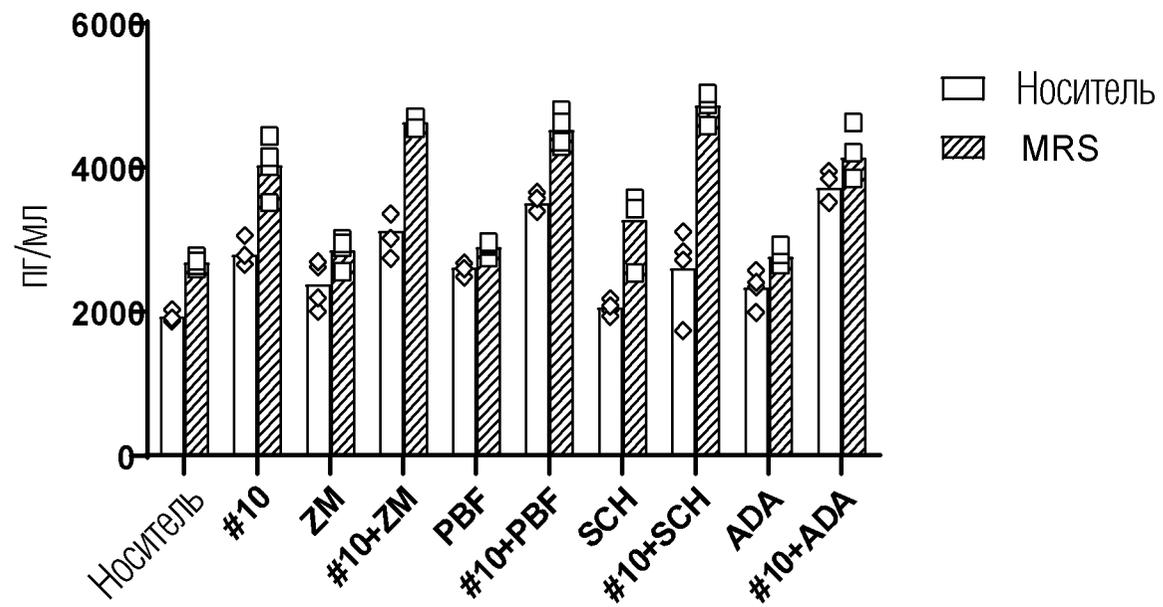
ФИГ. 54А

IFN- γ

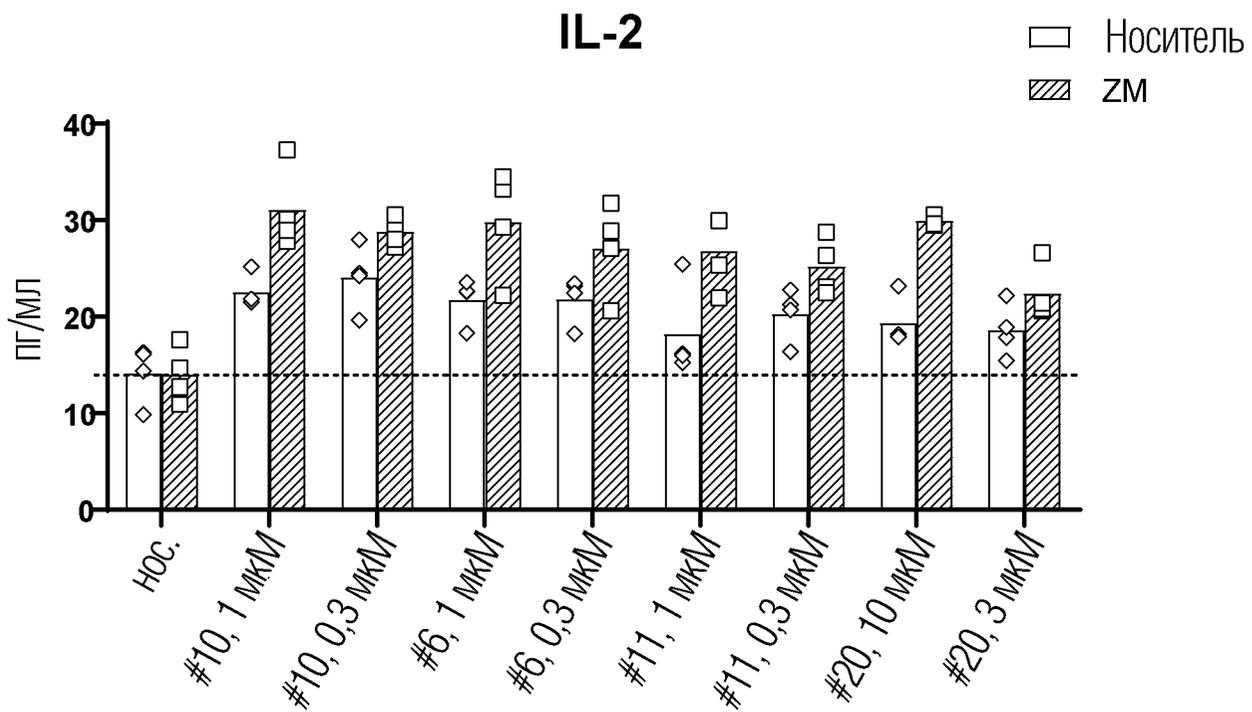


ФИГ. 54В

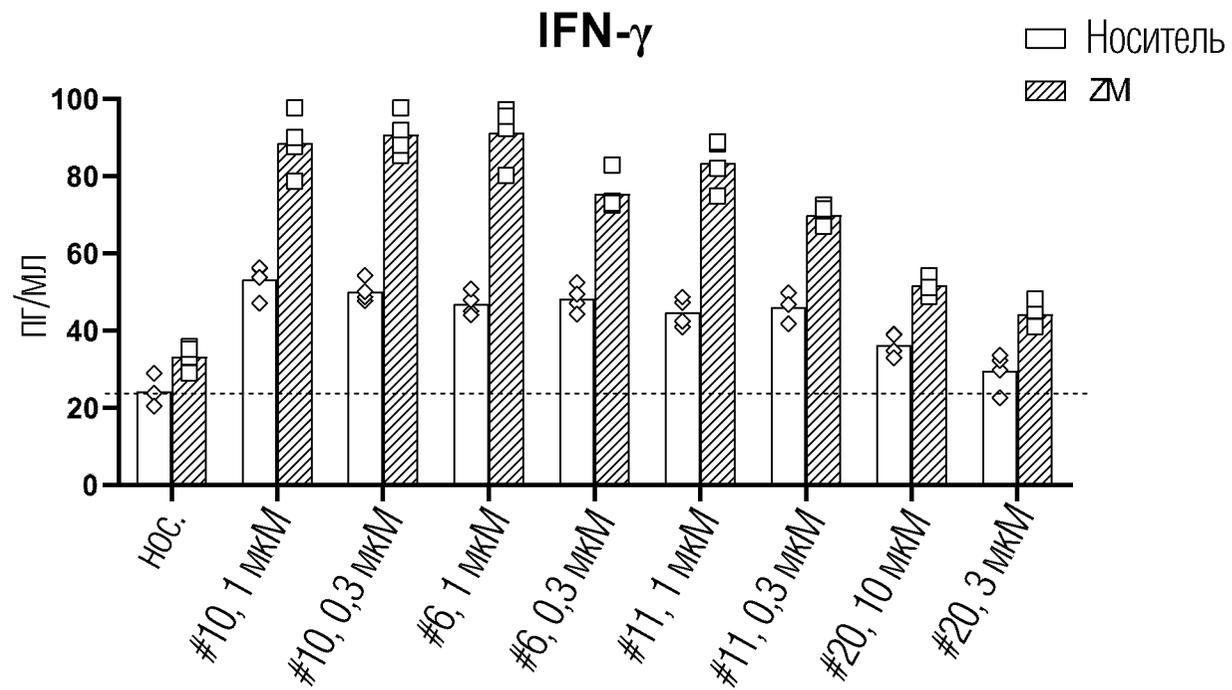
TNF



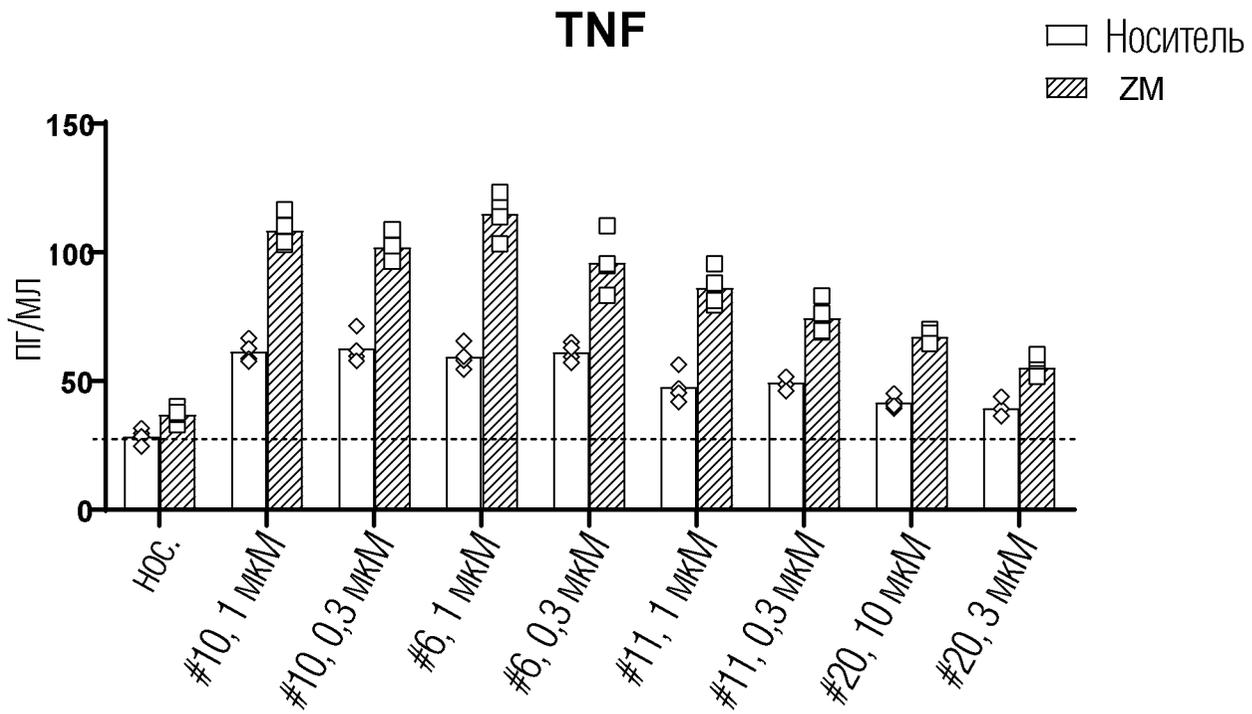
ФИГ. 54С



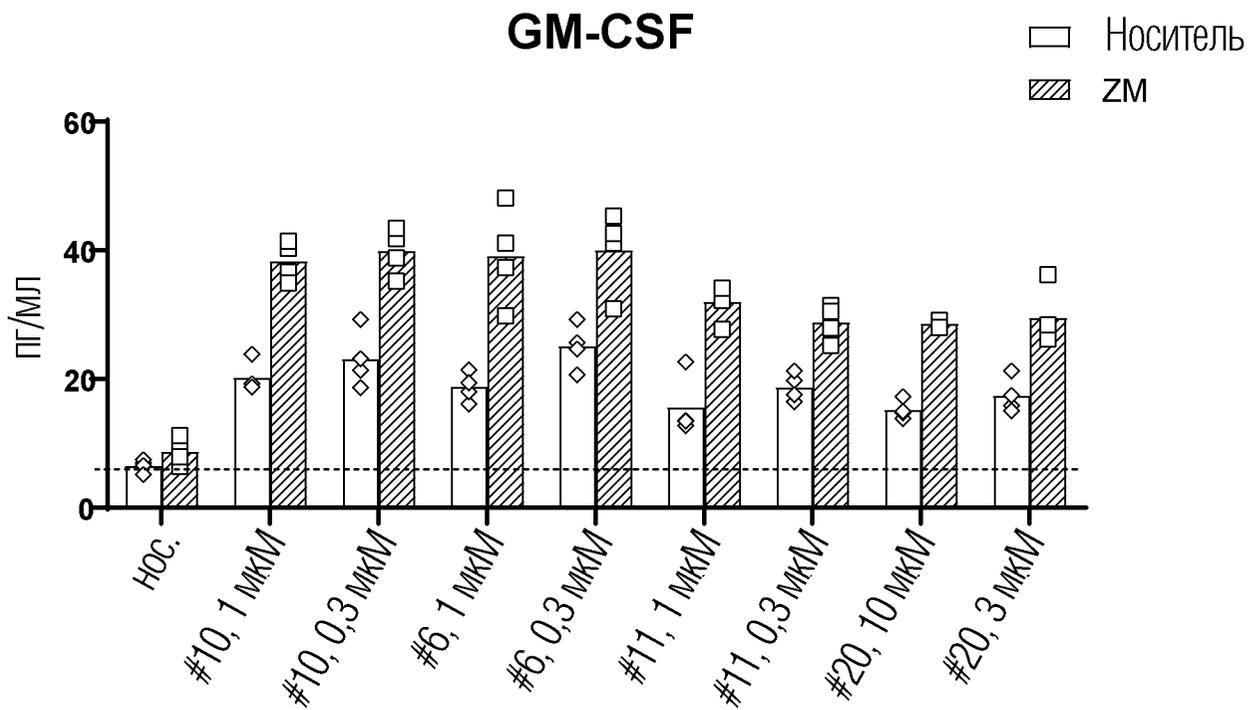
ФИГ. 55А



ФИГ. 55В

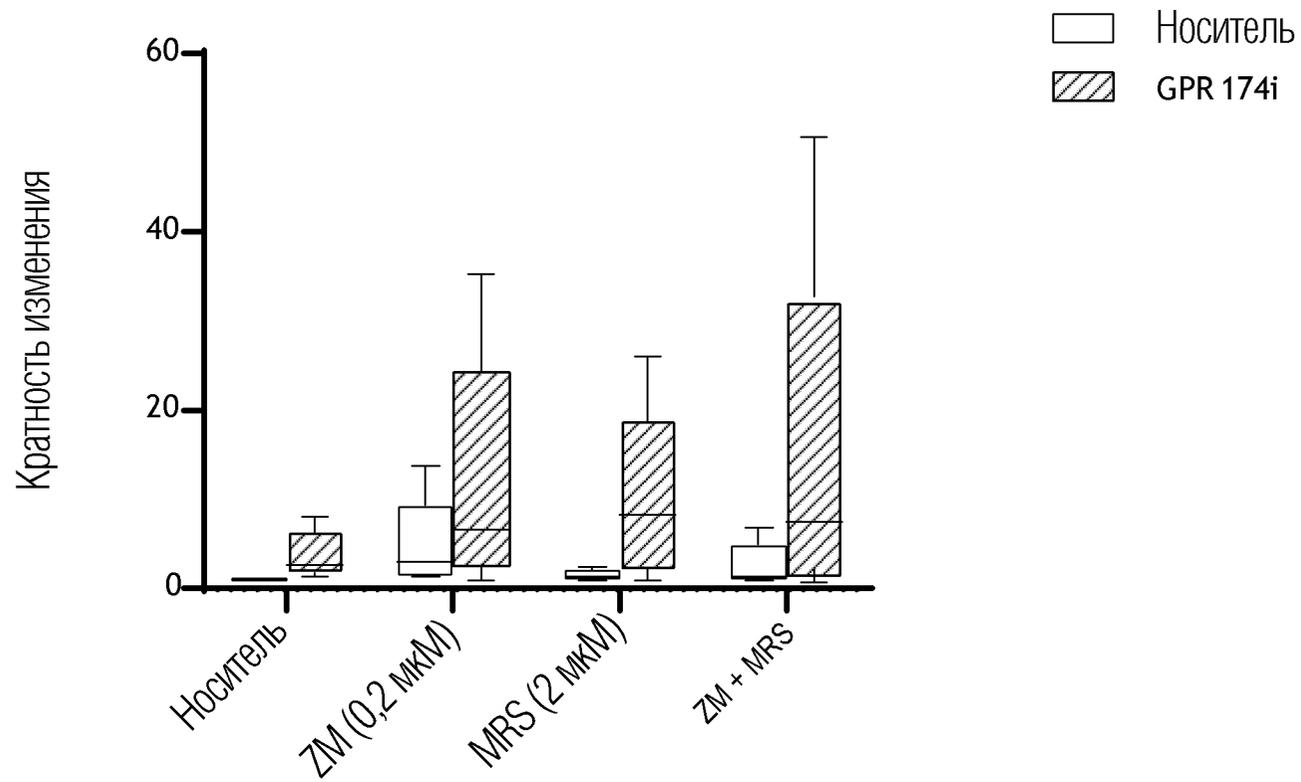


ФИГ. 55С



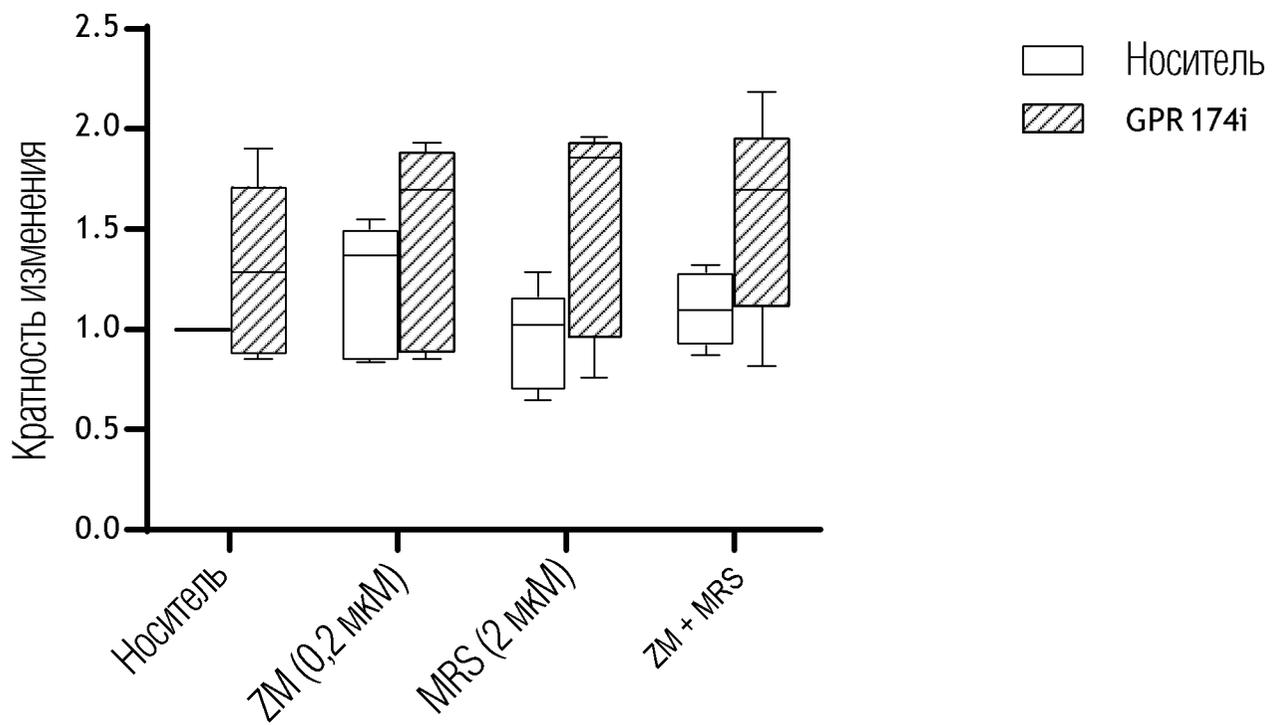
ФИГ. 55D

IFN- γ



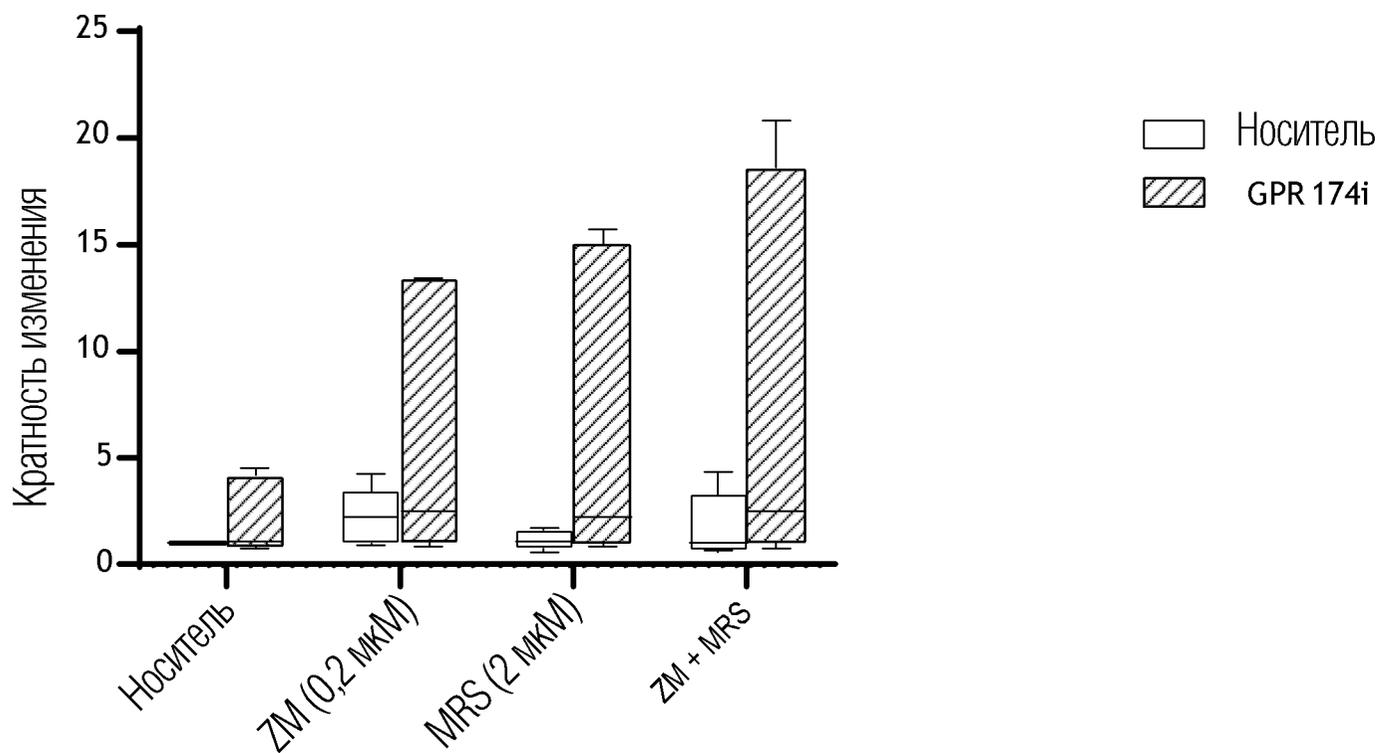
ФИГ. 56А

IL-2



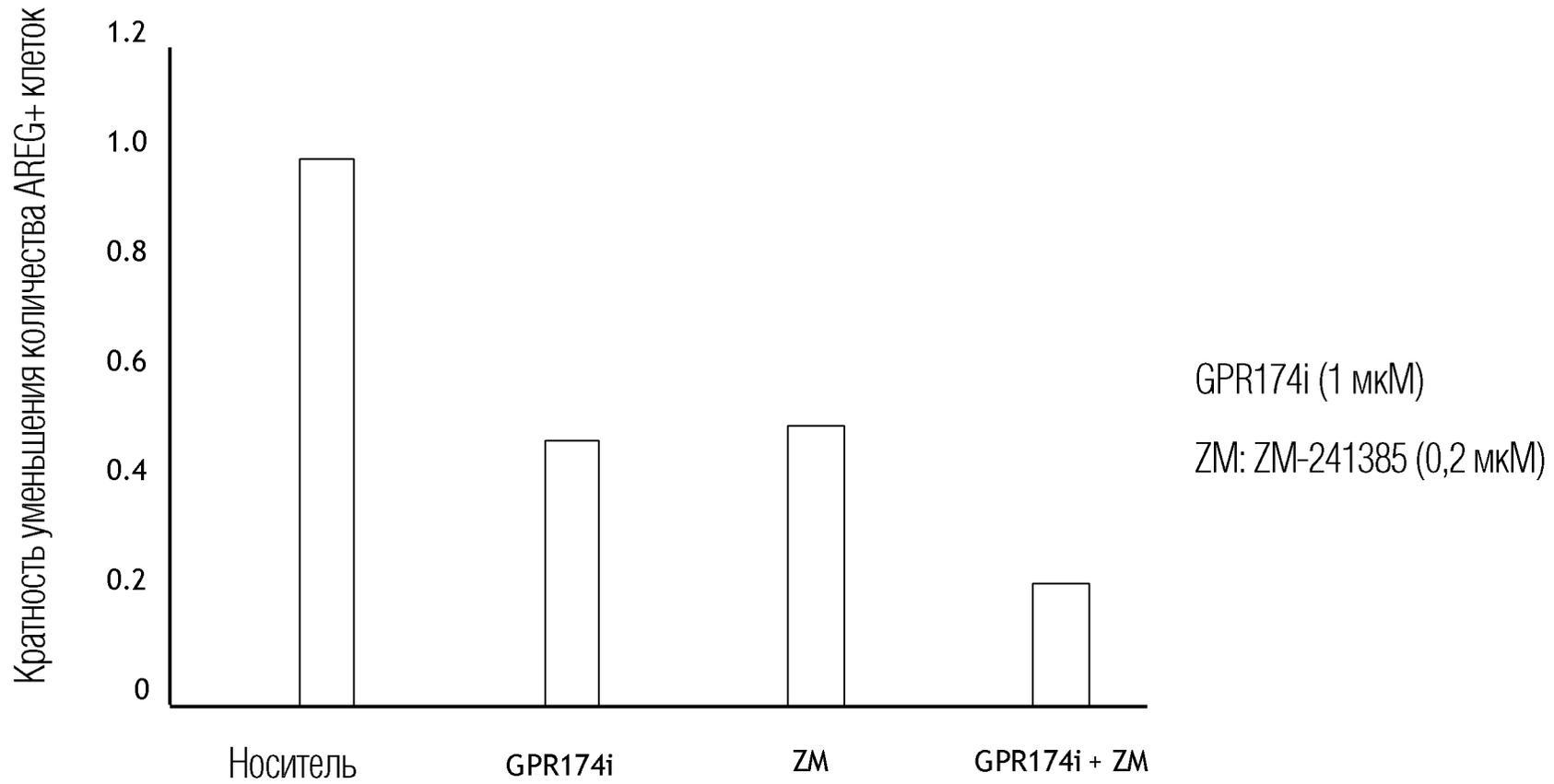
ФИГ. 56В

TNF- α



ФИГ. 56С

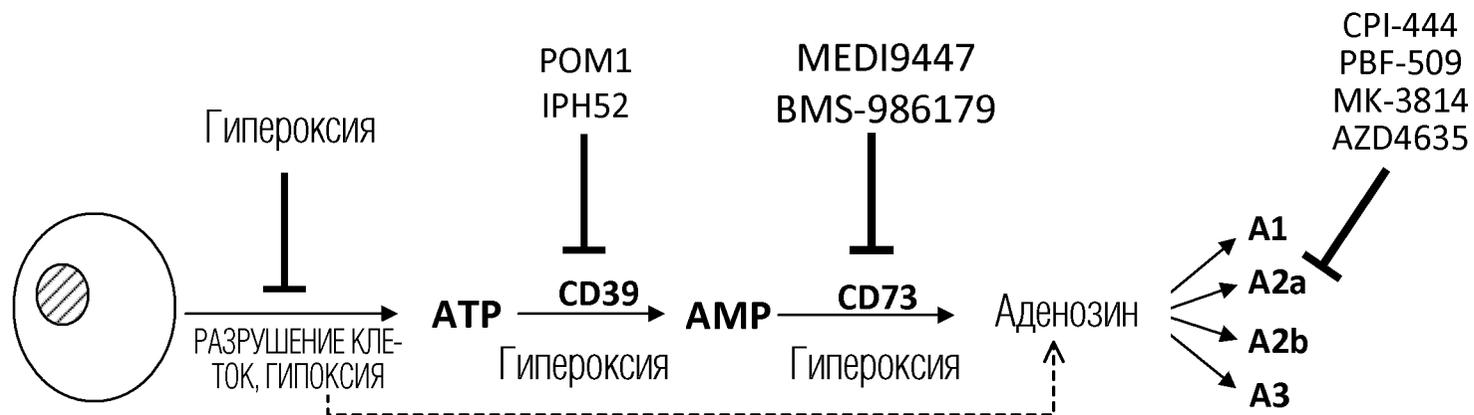
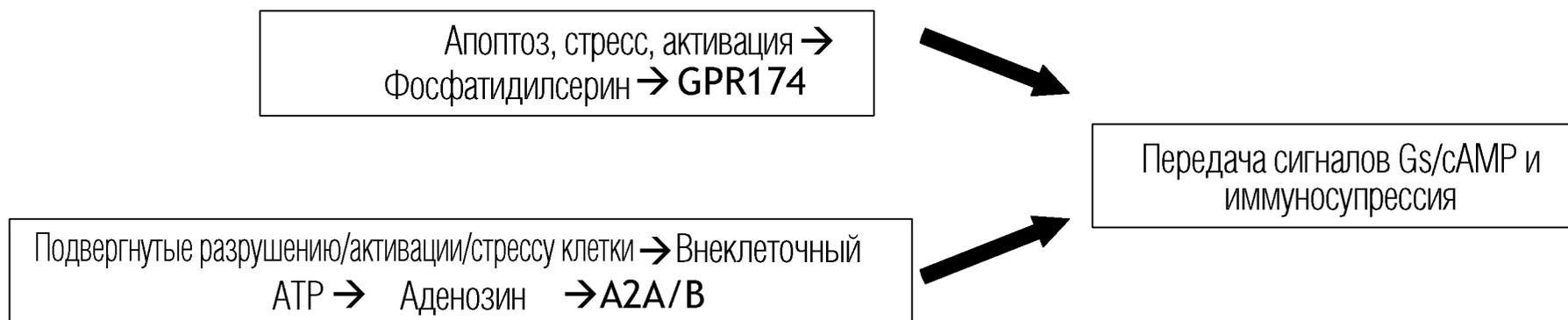
Активированные CD4+ Т-клетки



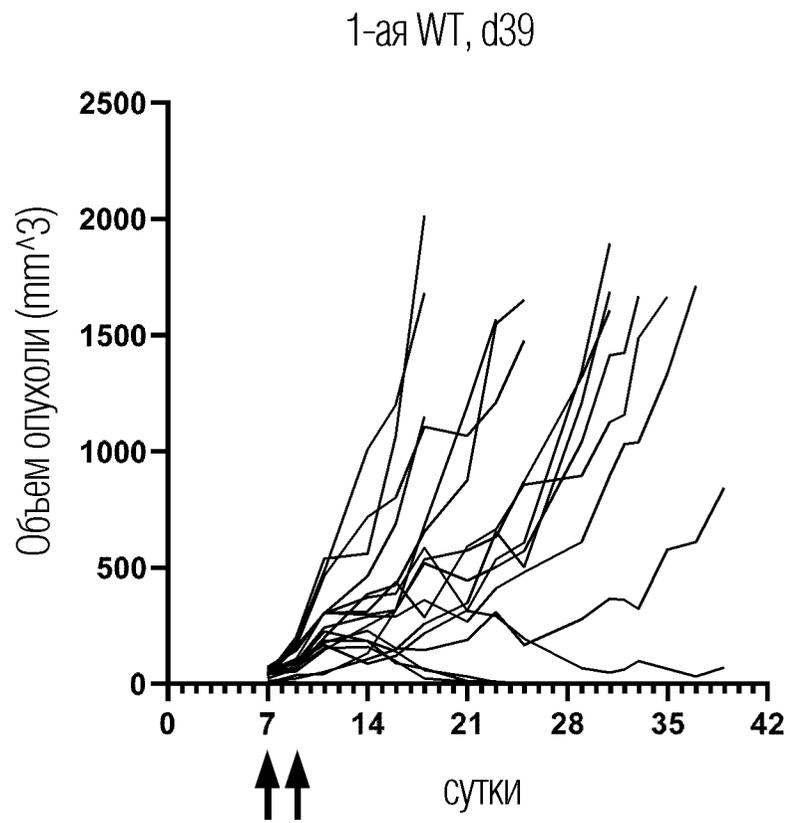
88/106

ФИГ. 57

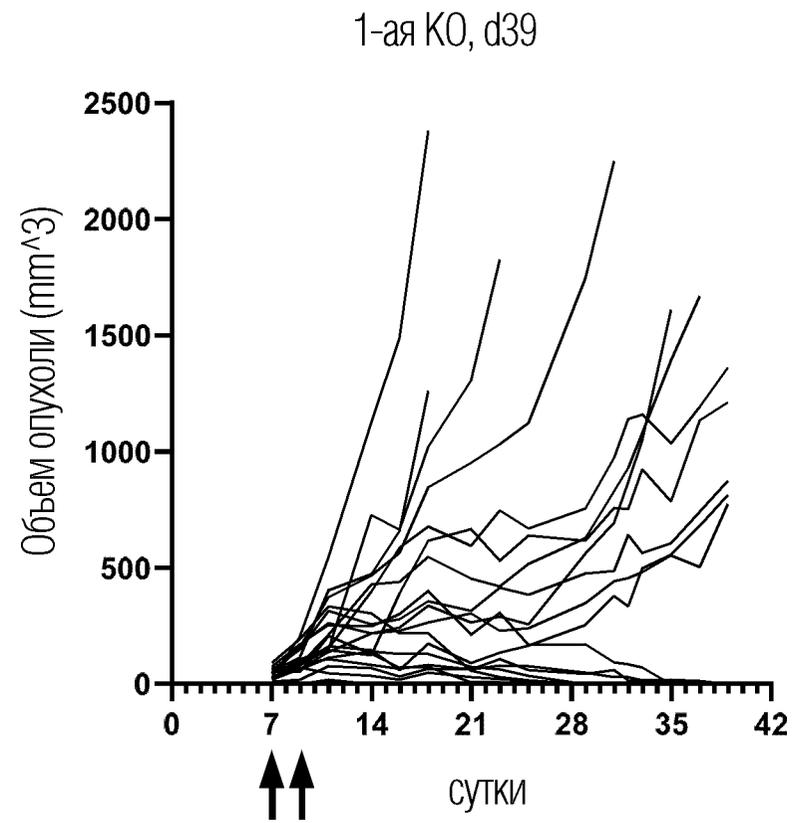
Как GPR174, так и рецепторы аденозина отвечают на продукты стресса и гибели клеток



ФИГ. 58

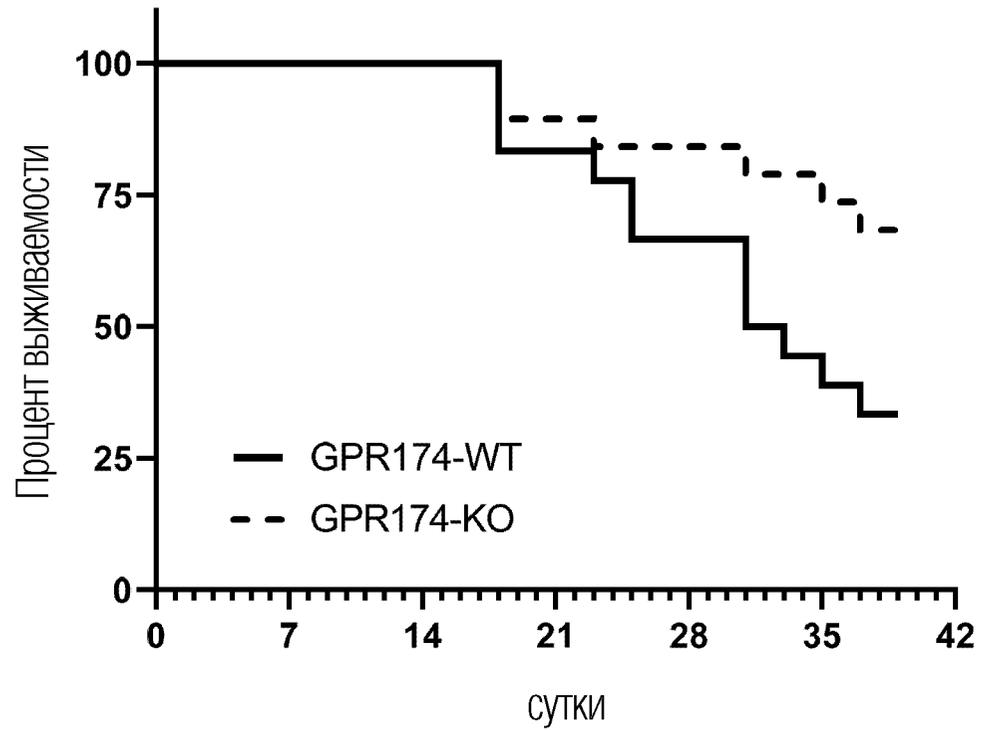


ФИГ. 59А



ФИГ. 59В

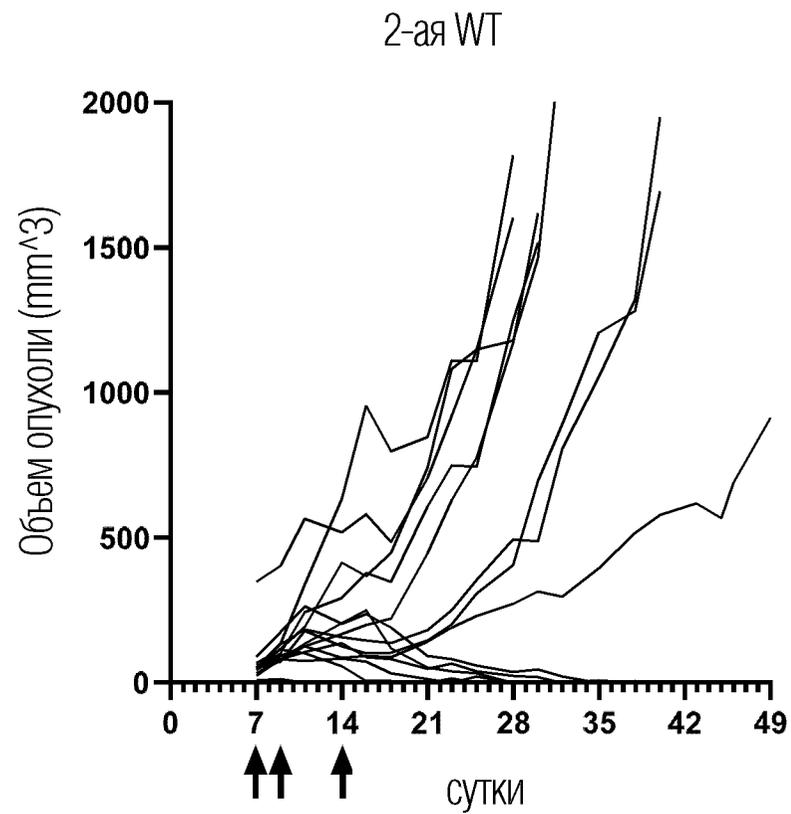
CT26, антитело против GITR на сутки 7, 9



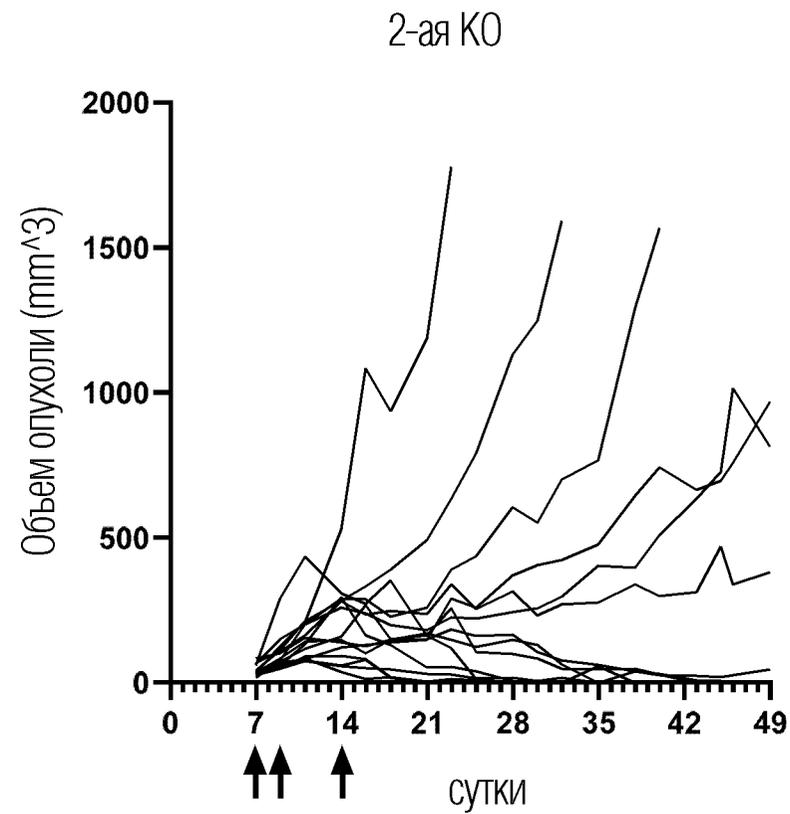
$p = 0.03$

Логарифмический ранговый критерий

ФИГ. 60

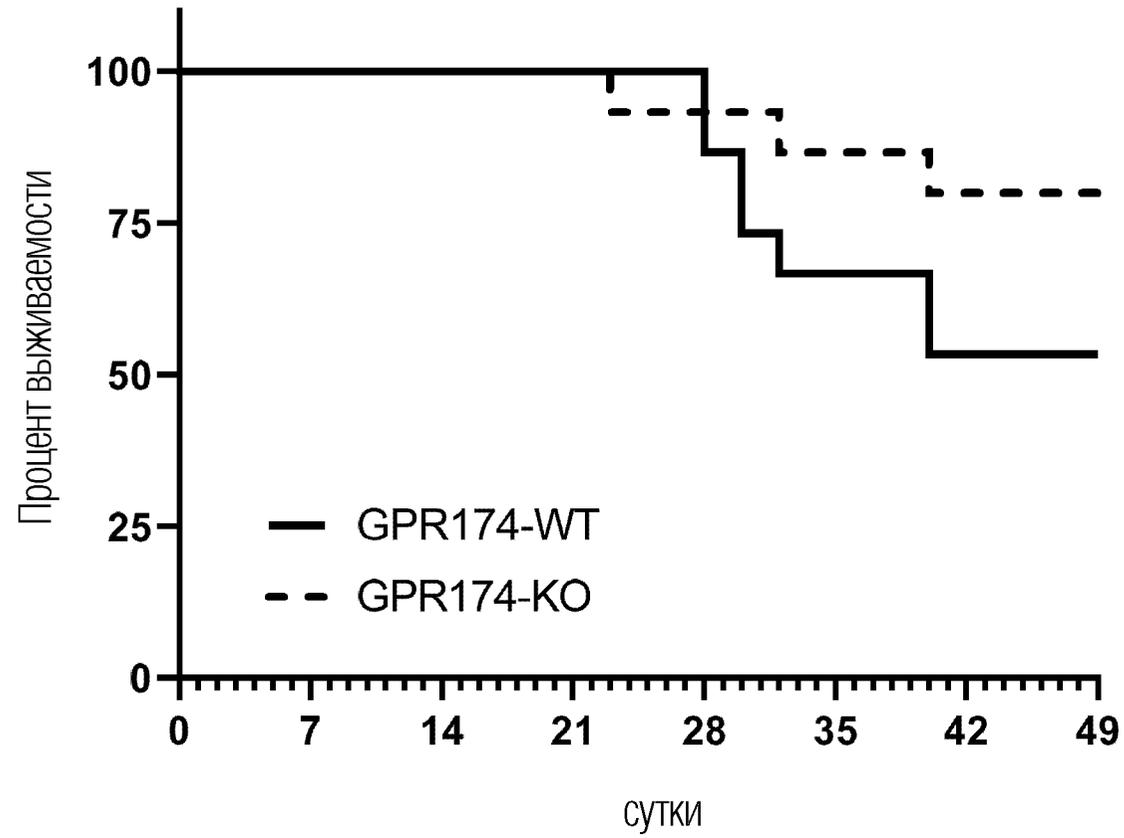


ФИГ. 61А

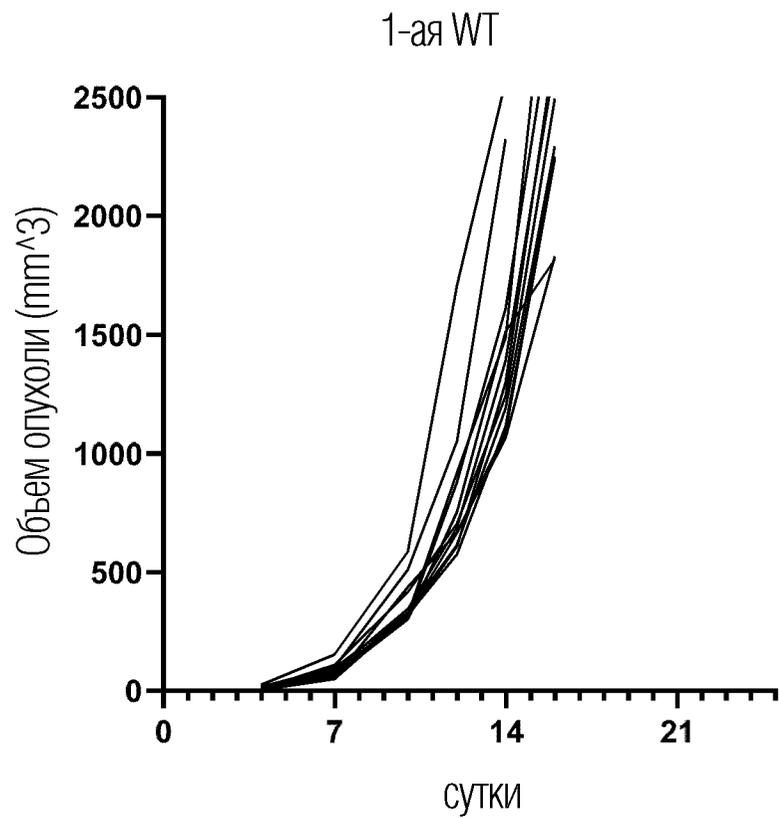


ФИГ. 61В

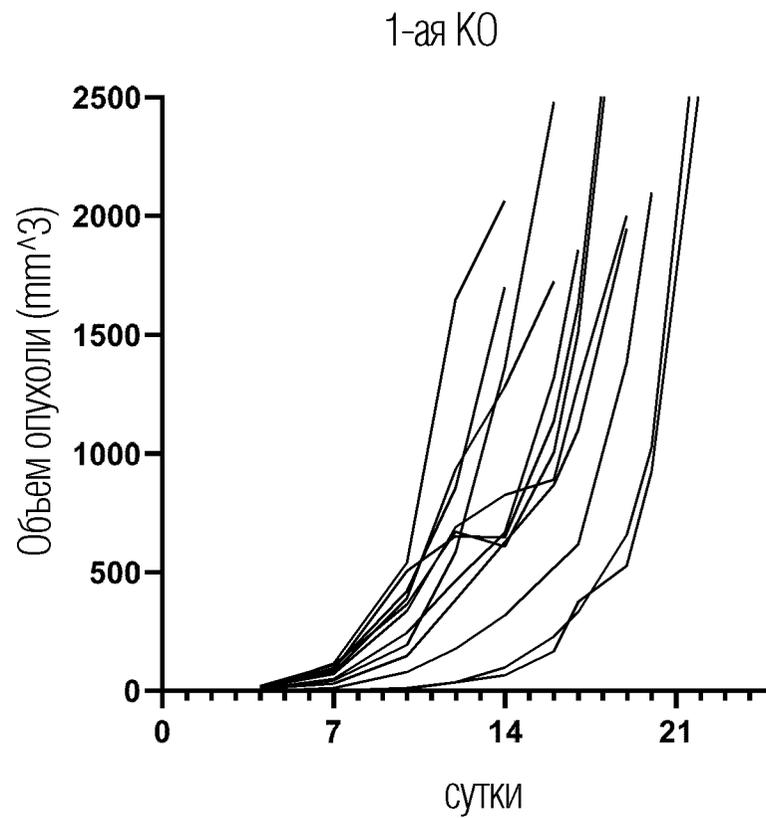
CT26, антитело против GITR на сутки 7, 9, 14



ФИГ. 62

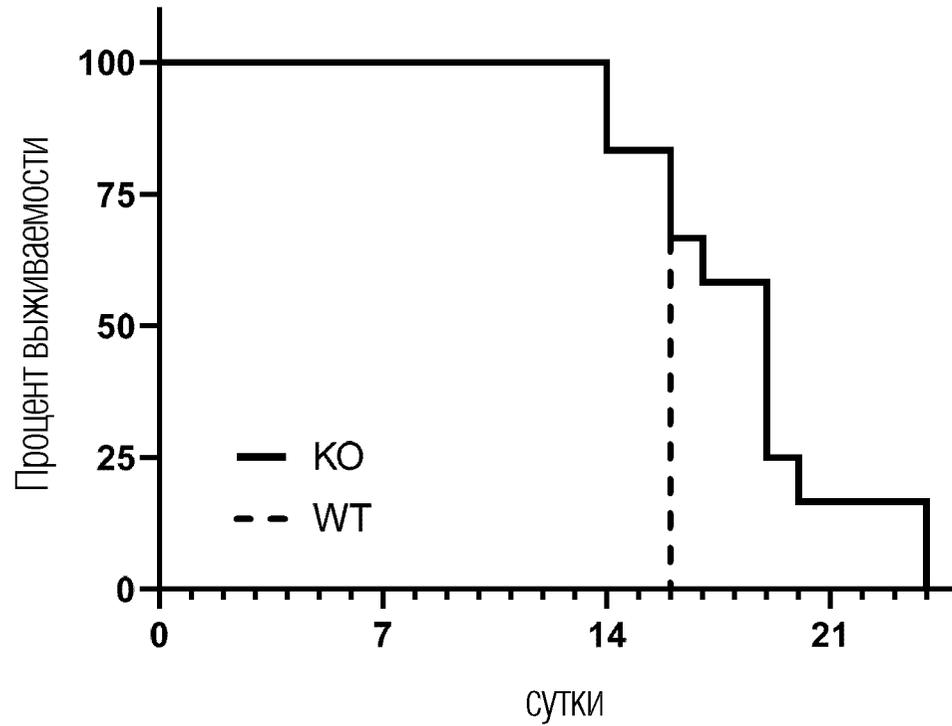


ФИГ. 63А



ФИГ. 63В

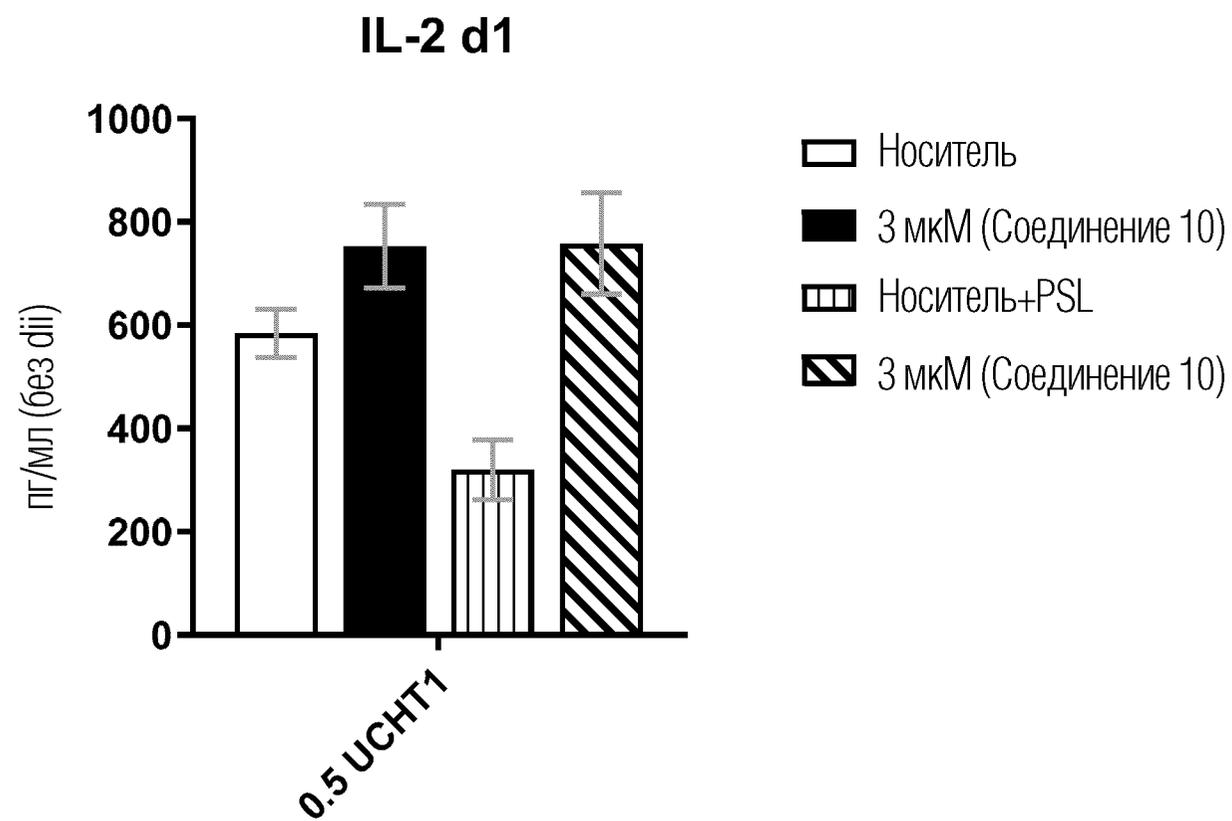
B16F10, антитело против GITR, d4



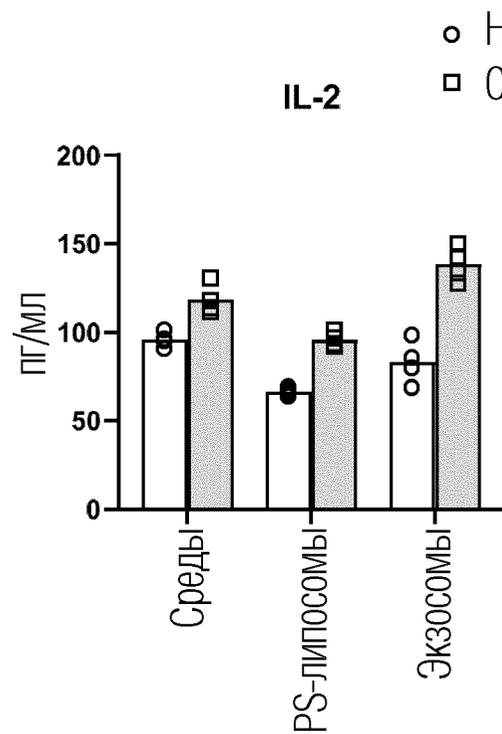
$p = 0.006$

Логарифмический ранговый критерий

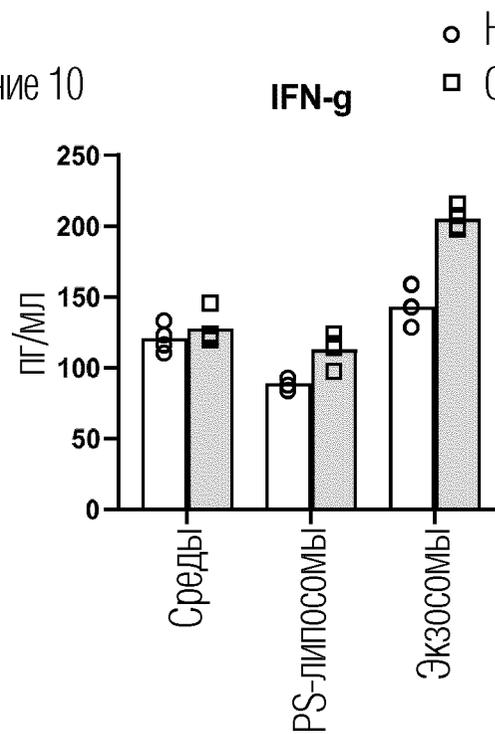
ФИГ. 64



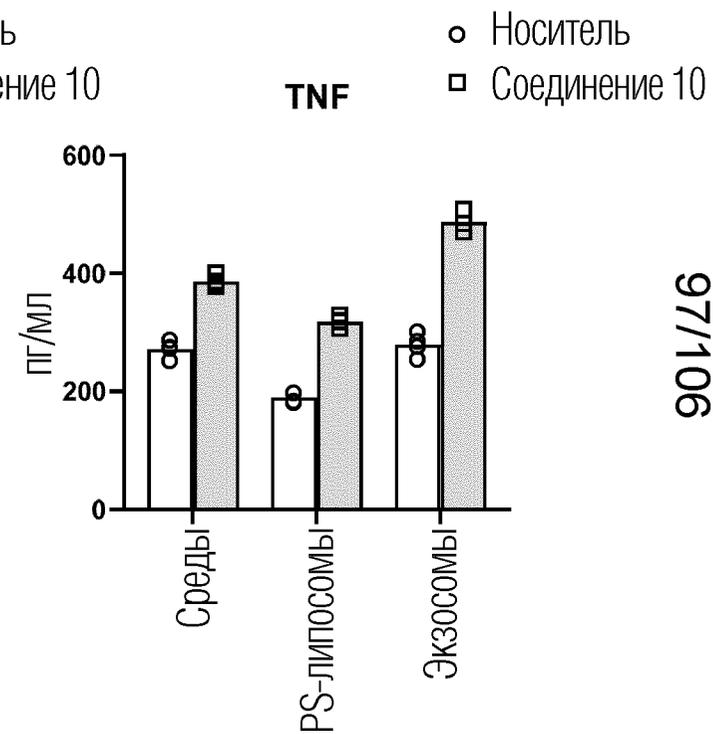
ФИГ. 65



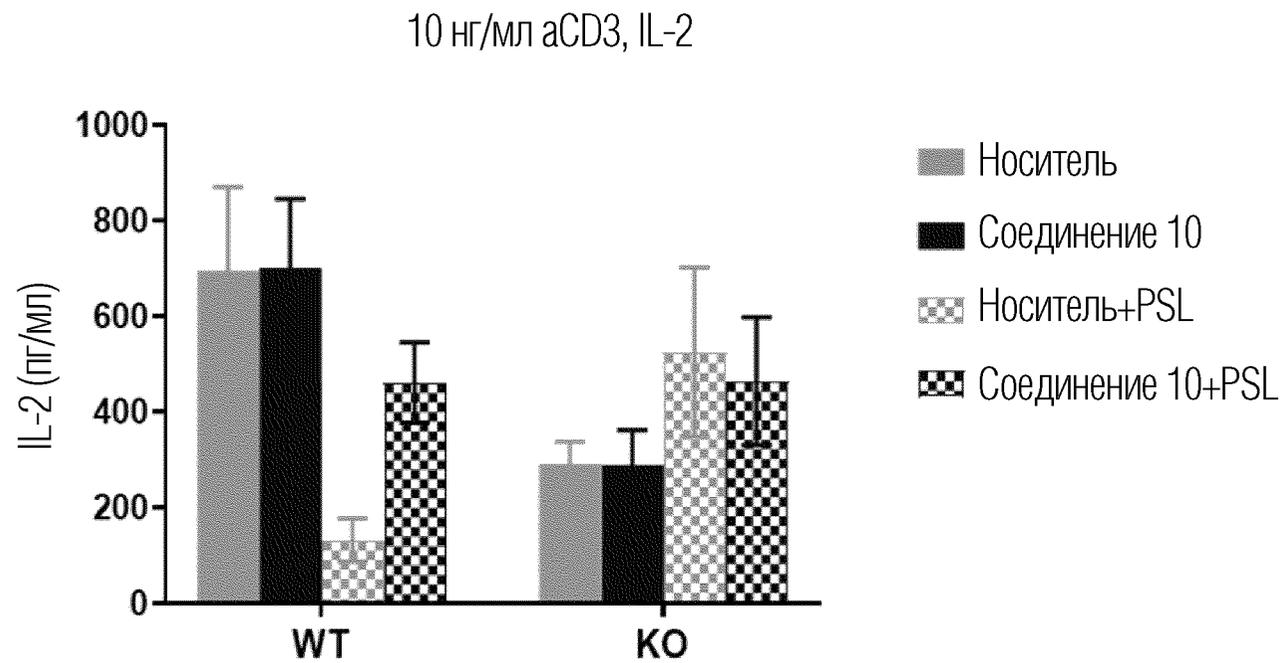
ФИГ. 66А



ФИГ. 66В

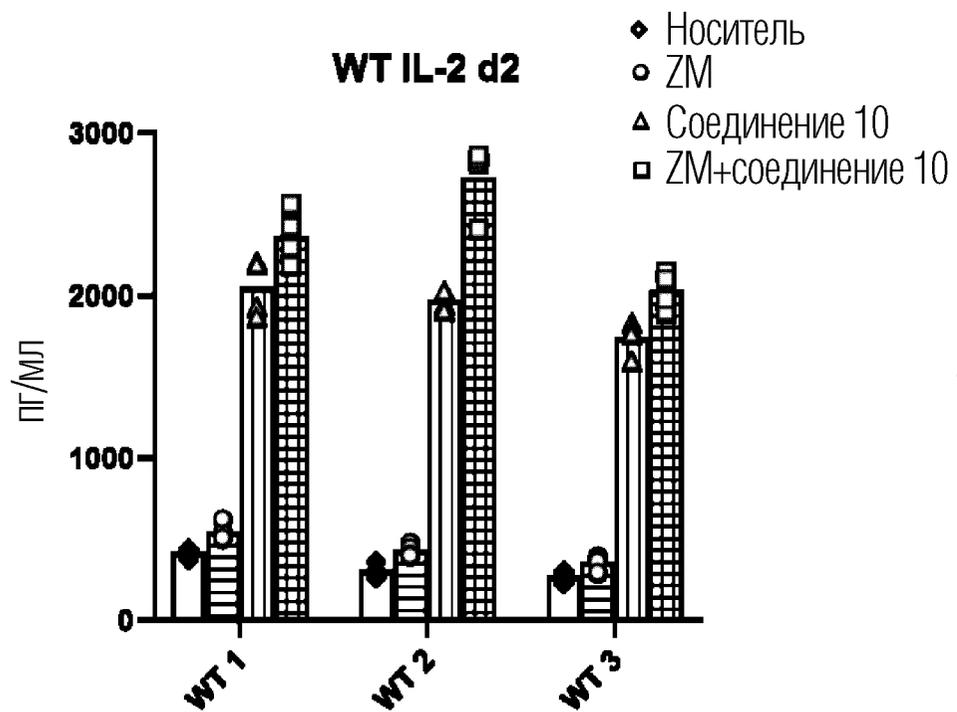


ФИГ. 66С

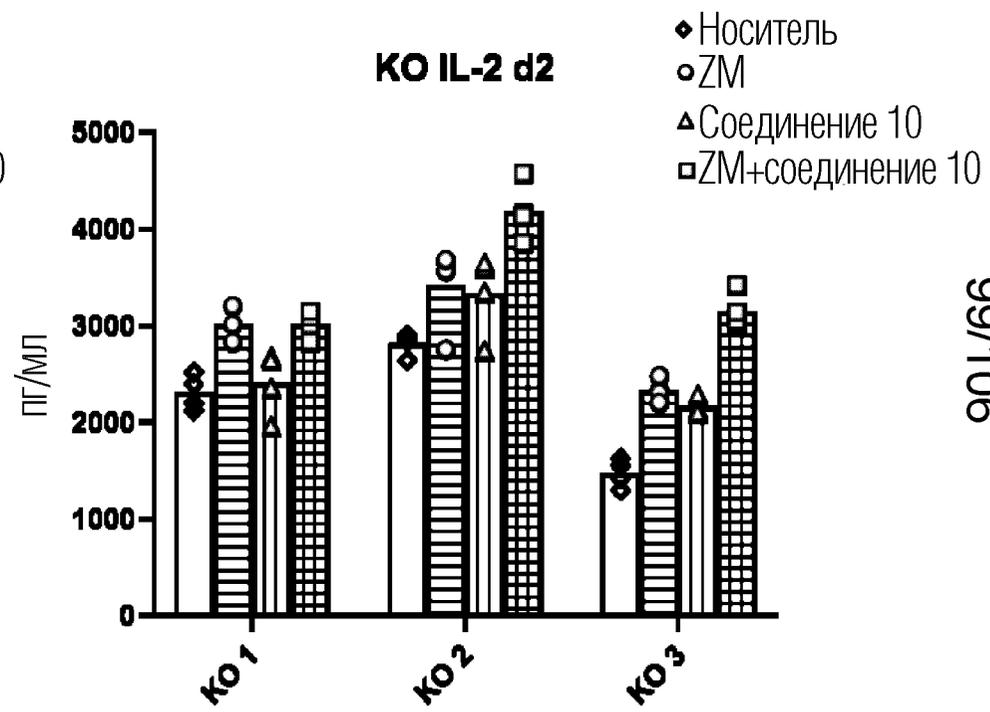


Очищенные Т-клетки, стимулированные связанными с планшетом CD3/28

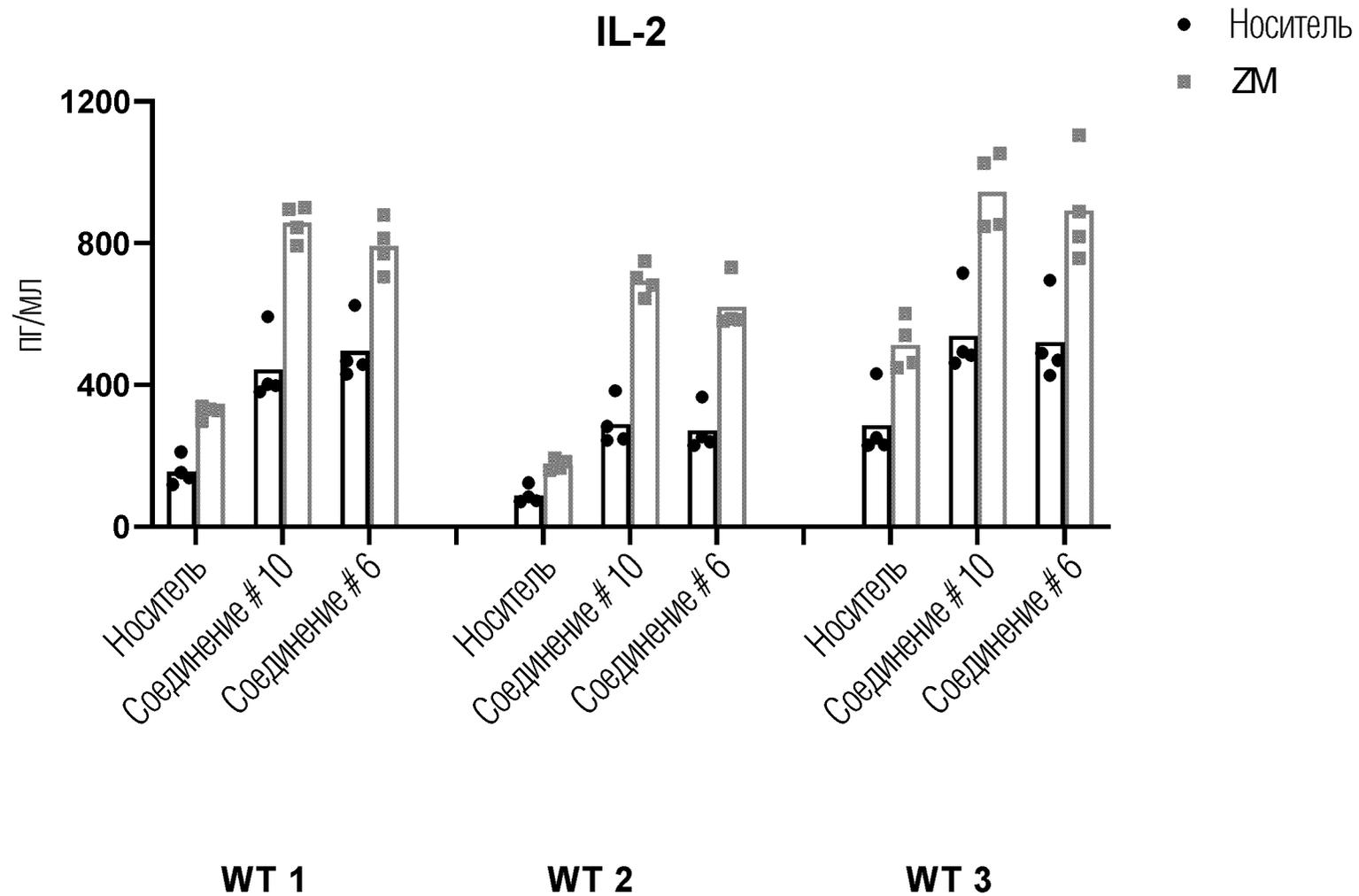
ФИГ. 67



ФИГ. 68А

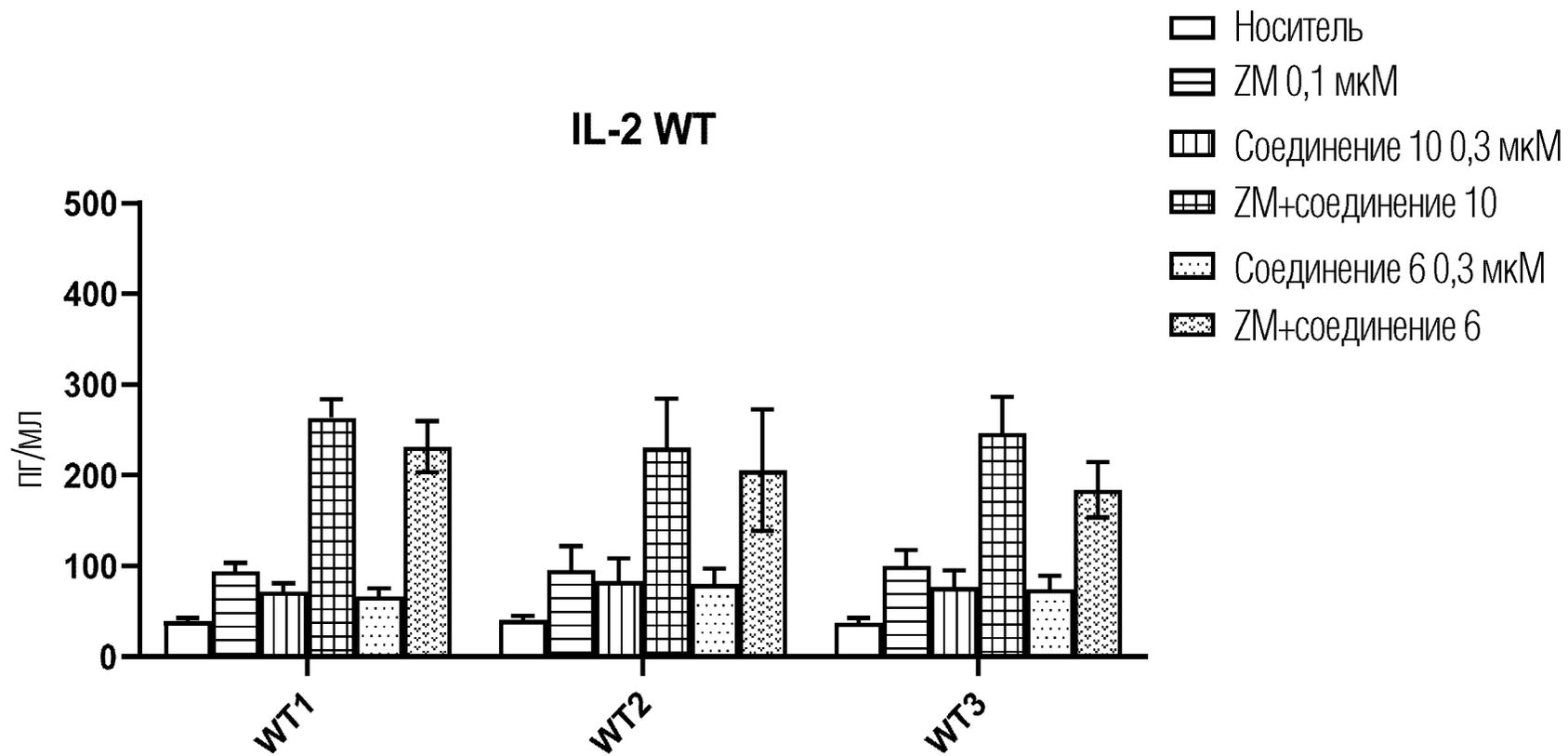


ФИГ. 68В

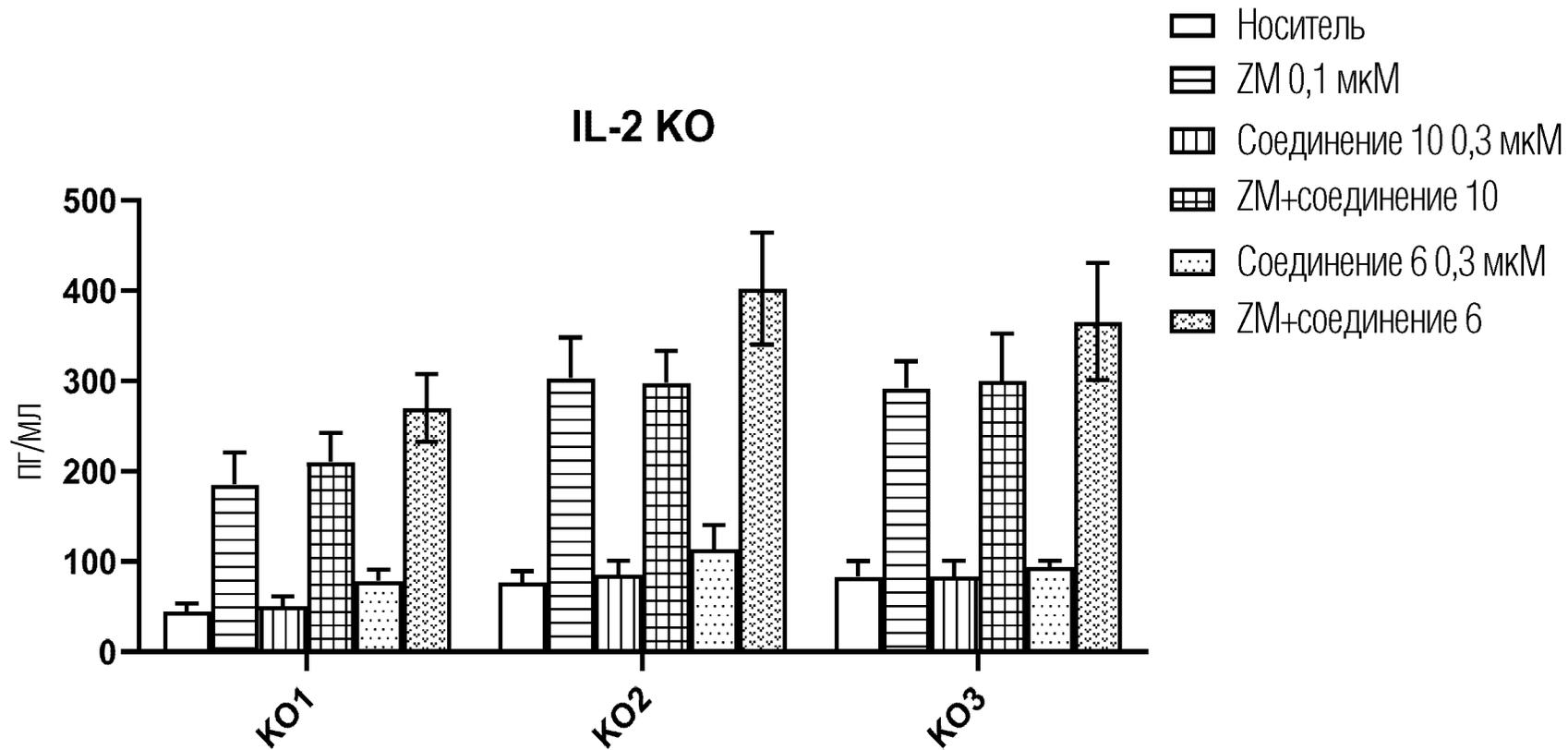


100/106

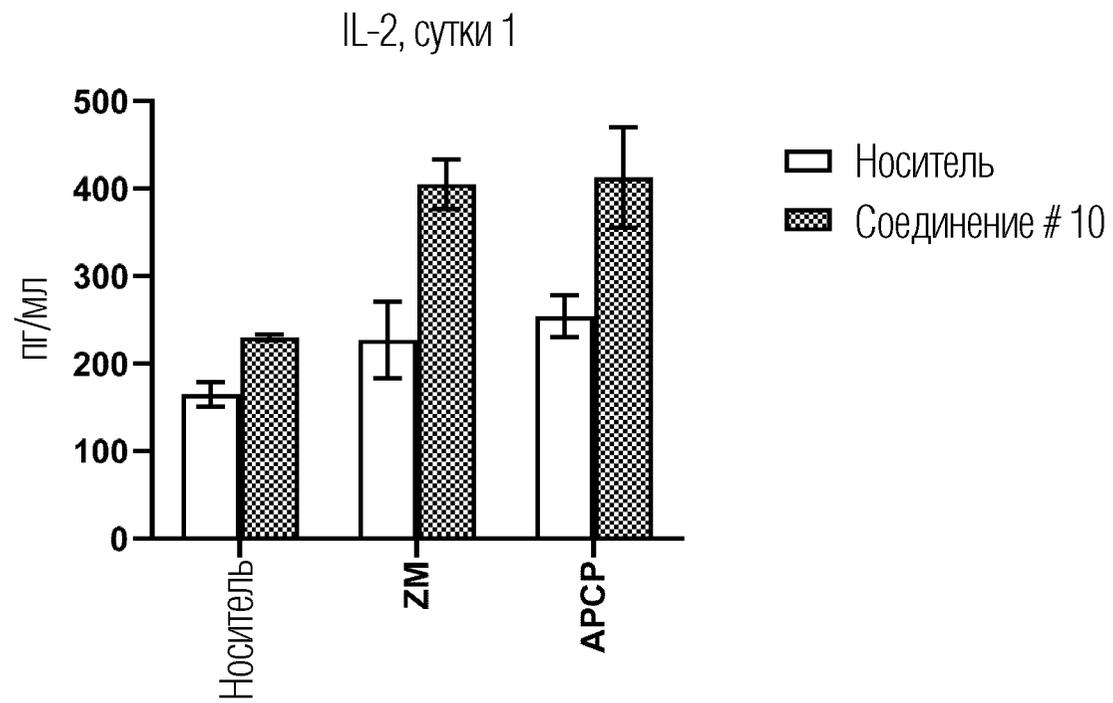
ФИГ. 69



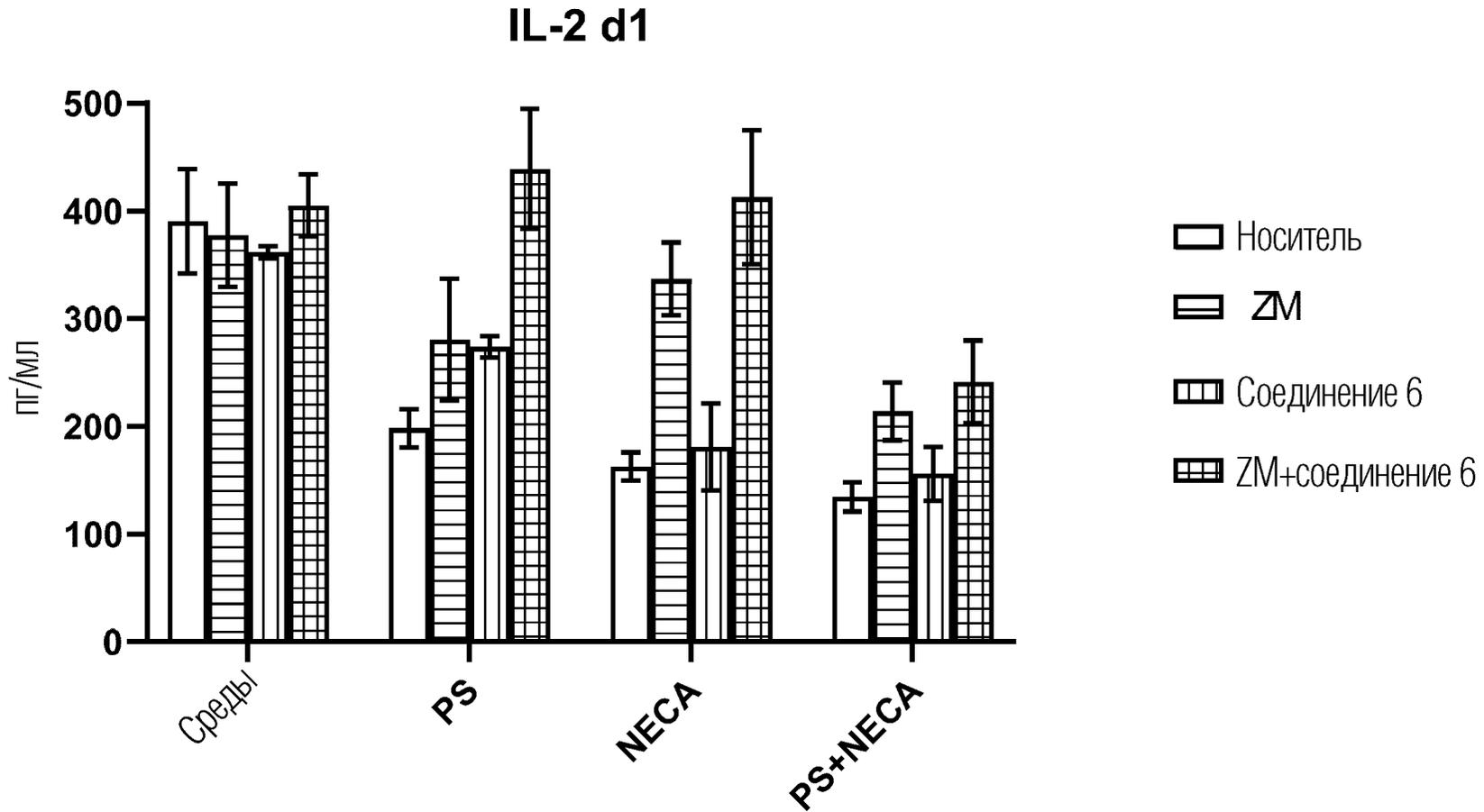
ФИГ. 70А



ФИГ. 70В

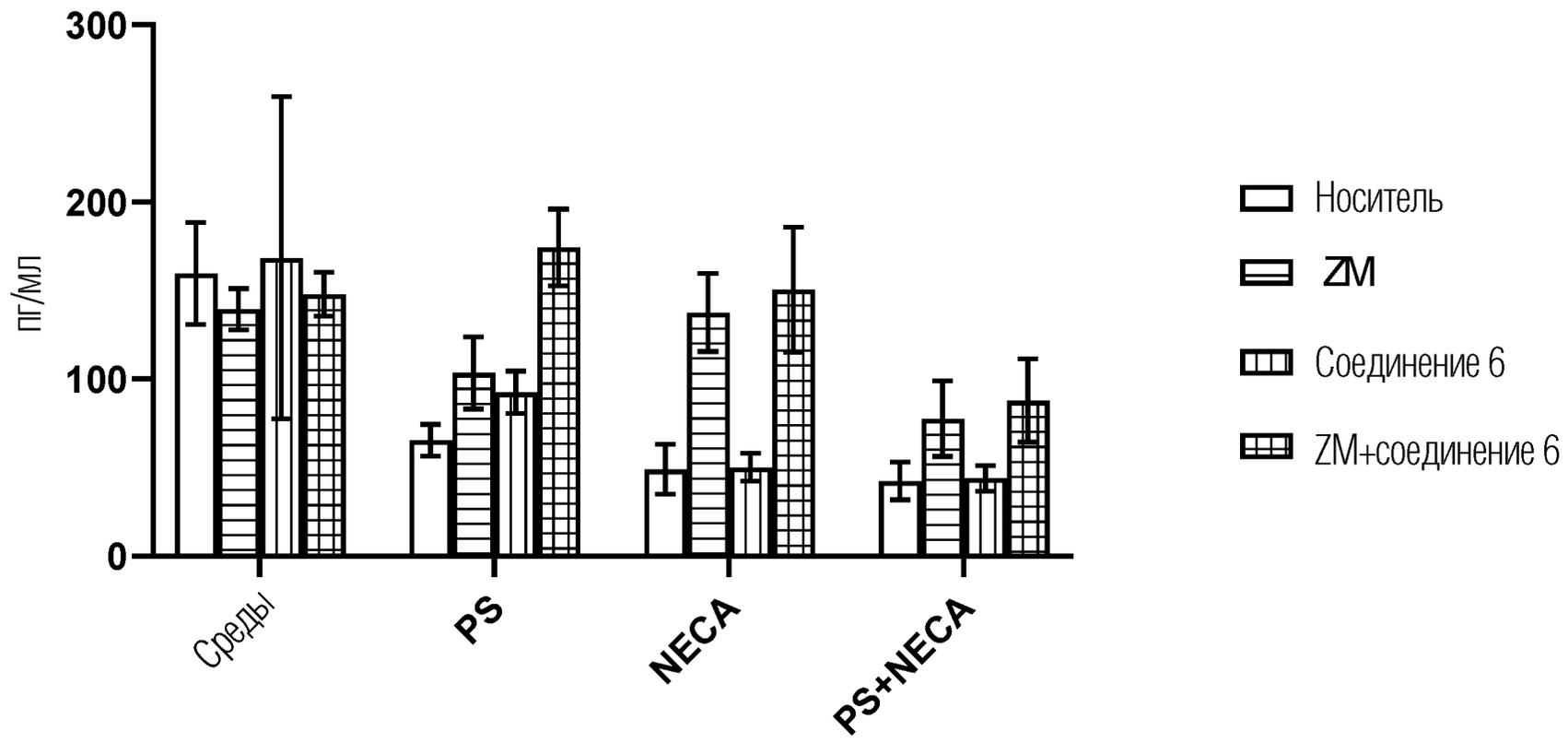


ФИГ. 71



ФИГ. 72А

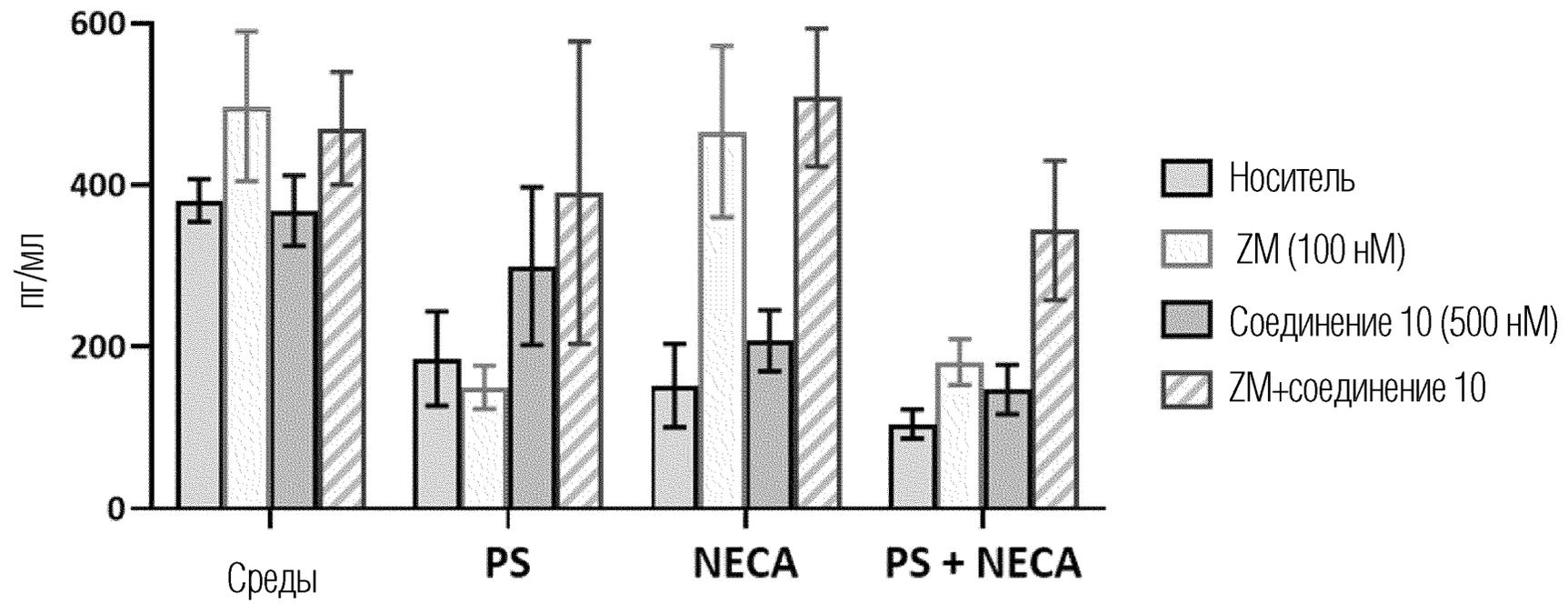
IFN-g d1



105/106

ФИГ. 72В

IFN- γ



106/106

ФИГ. 72С