

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **046439**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2024.03.14**

**(21)** Номер заявки  
**202191922**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2020.01.10**

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

---

**(54) СПОСОБЫ И КОМПОЗИЦИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ОПУХОЛЕЙ**

---

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

**(32)** **2019.01.11; 2019.08.13; 2019.11.15;  
2019.12.11**

**(33)** **US**

**(43)** **2021.11.15**

**(86)** **PCT/US2020/013183**

**(87)** **WO 2020/146795 2020.07.16**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ОМЕРОС КОРПОРЕЙШН (US)**

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

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

**(56)** OMEROS CORPORATION PRESS RELEASE, "Omeros Proprietary Orphan GPCR Program Delivers New Target and Approach in Cancer Immunotherapy", 05 December 2016 [online]. [Retrieved on 1 May 2020]. Retrieved from the internet <URL: <https://investor.omeross.com/news-releases/news-release-details/omeross-proprietary-orphan-gpcr-program-delivers-new-target-and#>>. Especially pg 1, para 1-3, pg 2, para 2-4

BARNES et al. "Lysophosphatidylserine suppression of T-cell activation via GPR174 requires Gas proteins", Immunology & Cell Biology, February 2018, vol 96, no 4, pp 439-445. Especially abstract

US-A1-20170146542

WO-A1-2016209021

US-A1-20150266933

US-A1-20110027295

US-A1-20110081354

WO-A2-2009120899

US-A1-20150361119

US-A1-20180221472

---

**(57)** Изобретение относится к композициям и способам лечения злокачественных опухолей с использованием ингибиторов GPR174 и антагонистов рецептора A2A.

---

**B1**

**046439**

**046439 B1**

### 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 ATP-аденозин-A2aR или -A2bR передачи сигналов (такого как антагонист A2aR и/или антагонист A2bR, 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 T-клетку (T-reg) 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 (spur) 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 ускорить развитие новых лекарственных средств для этих рецепторов. Однако, несмотря на значительные усилия для идентификации таких лигандов, остается большое количество орфанных рецепторов (см., например, Levoe 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 B- и T-клетках, особенно в регуляторных T-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 функцио-

нально 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 иммуноцитами лиганда-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 злокачественной 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- $\gamma$ , IL-2, TNF и GM-CSF) в PBMC человека, как описано в примерах 15, 18-23, 27 и 29.

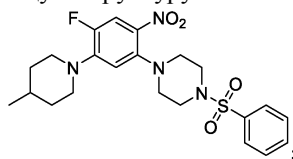
Как далее описано в настоящем описании, авторы настоящего изобретения также показали, что рост опухоли карциномы ободочной кишки мыши и рост опухоли меланомы уменьшался у мышей с недостаточностью GPR174, подвергнутых лечению с использованием антитела против GITR (т.е. ослабляющего Т-рег средства) по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

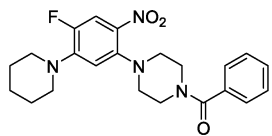
В общем, как показано в настоящем описании, GPR174 представляет собой рестрицированный по иммунной системе сопряженный с G $\alpha$ s GPCR, и PS, экспонированный на липосомах и клеточных мембранах, стимулирует GPR174, поддерживая модель опосредованной активным GPR174 иммуносупрессии в микроокружении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

Таким образом, в одном аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли, включающему введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества ингибитора GPR174, выбранного из группы, состоящей из:

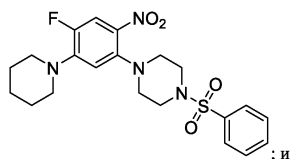
i. соединения 10, имеющего следующую структуру:



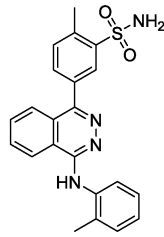
ii. соединения 6, имеющего следующую структуру:



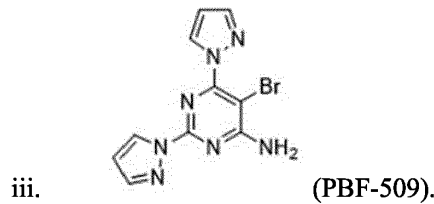
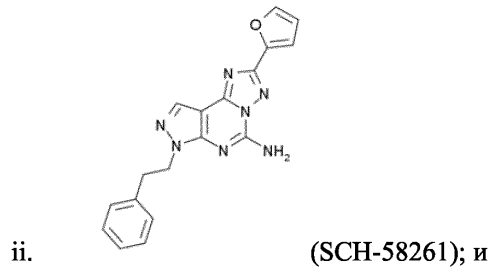
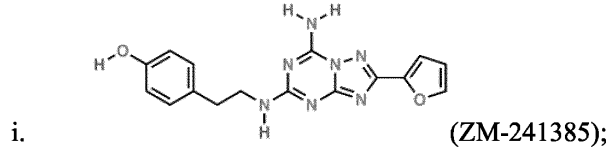
iii. соединения 11, имеющего следующую структуру:



iv. соединения 20, имеющего следующую структуру:



и антагониста рецептора аденозина-A2A (A2A), выбранного из группы, состоящей из:



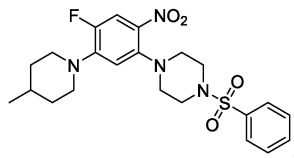
В предпочтительном аспекте настоящего изобретения ингибитор GPR174 ингибирует зависимую от PS или LysPS активацию передачи сигналов GPR174 в клетке, экспрессирующей GPR174, по меньшей мере на 25%.

В другом предпочтительном аспекте настоящего изобретения ингибитор GPR174 стимулирует иммунный ответ у пациента посредством ингибирования передачи через GPR174 сигналов G-альфа-s.

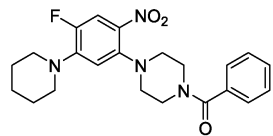
Предпочтительно стимулированный иммунный ответ включает опосредованный NK-клетками иммунный ответ и опосредованный противоопухолевыми цитотоксическими Т-клетками иммунный ответ.

В ещё одном аспекте настоящее изобретение относится к способу увеличения уровня Th1-цитокинов в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) человека, включающий приведение в контакт PBMC человека с ингибитором GPR174, выбранным из группы, состоящей из:

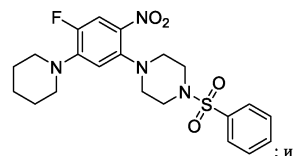
i. соединения 10, имеющего следующую структуру:



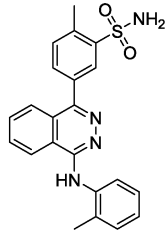
ii. соединения 6, имеющего следующую структуру:



iii. соединения 11, имеющего следующую структуру:



iv. соединения 20, имеющего следующую структуру:



и антагонистом рецептора аденозина-A2A (A2A), выбранным из группы, состоящей из:

- i. ZM-241385;
- ii. SCH-58261; и
- iii. PBF-509.

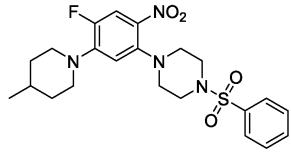
В предпочтительном аспекте настоящего изобретения приведение в контакт осуществляют *in vitro*.

В другом предпочтительном аспекте настоящего изобретения РВМС содержат Т-клетки или НК-клетки.

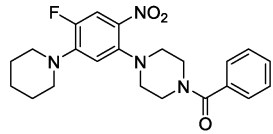
Предпочтительно уровень по меньшей мере одного из Th1-цитокинов IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF или GM-CSF увеличен по меньшей мере на 20%.

В ещё одном аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции для лечения злокачественной опухоли, содержащая комбинацию ингибитора передачи сигналов GPR174, выбранного из группы, состоящей из:

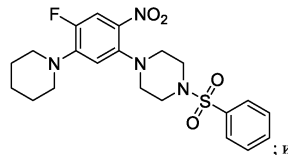
- i. соединения 10, имеющего следующую структуру:



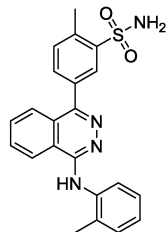
- ii. соединения 6, имеющего следующую структуру:



- iii. соединения 11, имеющего следующую структуру:



- iv. соединения 20, имеющего следующую структуру:



и антагониста рецептора аденозина-A2A (A2A), выбранного из группы, состоящей из:

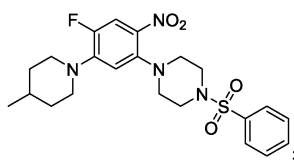
- i. ZM-241385;
- ii. SCH-58261; и
- iii. PBF-509;

и фармацевтически приемлемый наполнитель.

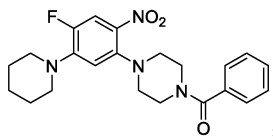
В ещё одном аспекте настоящее изобретение относится к способу усиления противоопухолевого иммунного ответа у субъекта, которого в настоящее время подвергают лечению с использованием антагониста A2aR, выбранного из группы, состоящей из:

- i. ZM-241385;
- ii. SCH-58261; и
- iii. PBF-509,

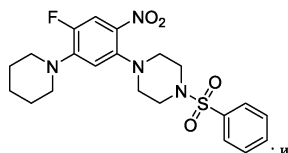
включающий введение эффективного количества ингибитора GPR174, выбранного из группы, состоящей из: i. соединения 10, имеющего следующую структуру:



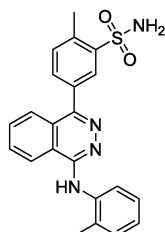
ii. соединения 6, имеющего следующую структуру:



iii. соединения 11, имеющего следующую структуру:



iv. соединения 20, имеющего следующую структуру:



для стимуляции усиленного противоопухолевого ответа у субъекта.

Передача сигналов аденозина через путь рецептора A2A и/или рецептора A2B, в частности, идентифицирована как многообещающий способ иммунотерапии злокачественных опухолей. Leone et al., "Targeting adenosine for cancer immunotherapy", *J. Immunother. Cancer.*, 2018, 5:57. Allard et al., "The ectonucleotidases CD39 and CD73: novel checkpoint inhibitor targets", *Immunol. Rev.*, 2017, 275(1), 121-144 (см. также табл. 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 A2A, 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<sup>+</sup> по оси с центром на метаболизирующем NAD<sup>+</sup> 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 A2A, 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-A2AR идентифицировано в качестве многообещающей мишени для иммунотерапии злокачественных опухолей.

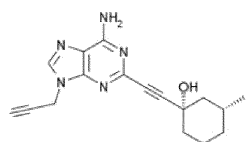
Ингибиторы пути АТФ-рецептора аденозина А2А и/или А2В.

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.

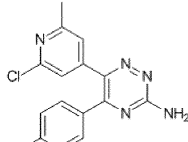
Антагонисты рецептора аденозина А2А.

Антагонисты рецептора аденозина А2А включают соединения ATL-444, AZD4635, кофеин, цифраденант (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, тозаданант (SYN115), VER-6623, VER-6947, VER-7835, випаденант (ВИБ-014) и ZM-241,385, структуры которых приведены ниже.

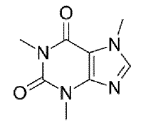
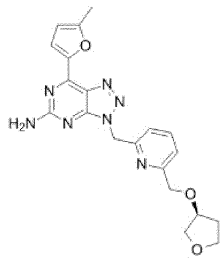
ATL-444



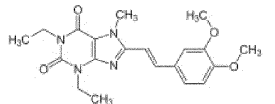
AZD4635



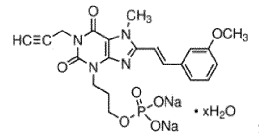
Кофеин

Цифораденант (CPI-444;  
V81444)

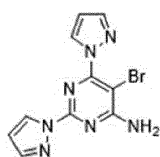
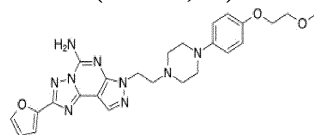
Истрадефиллин (KW-6002)



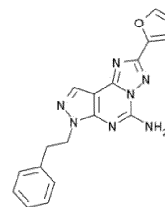
MSX-3



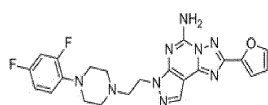
PBF-509 (NIR178)

Преладенант  
(SCH-420,814)

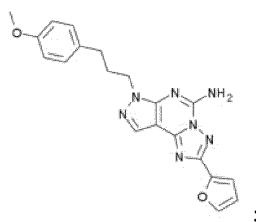
SCH-58261



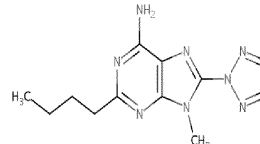
SCH-412,348



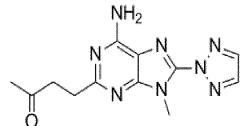
SCH-442,416



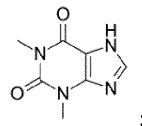
ST-1535



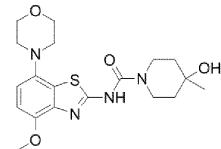
ST-4206



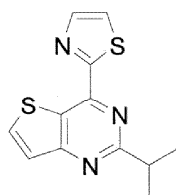
Теофиллин



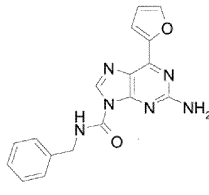
Тозаденант (SYN115)



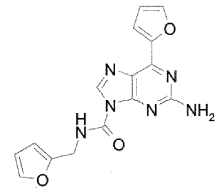
VER-6623



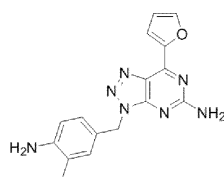
VER-6947



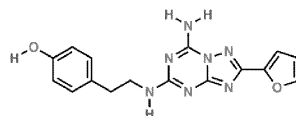
VER-7835



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, co-

держание 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, 73(11), 997-1003.

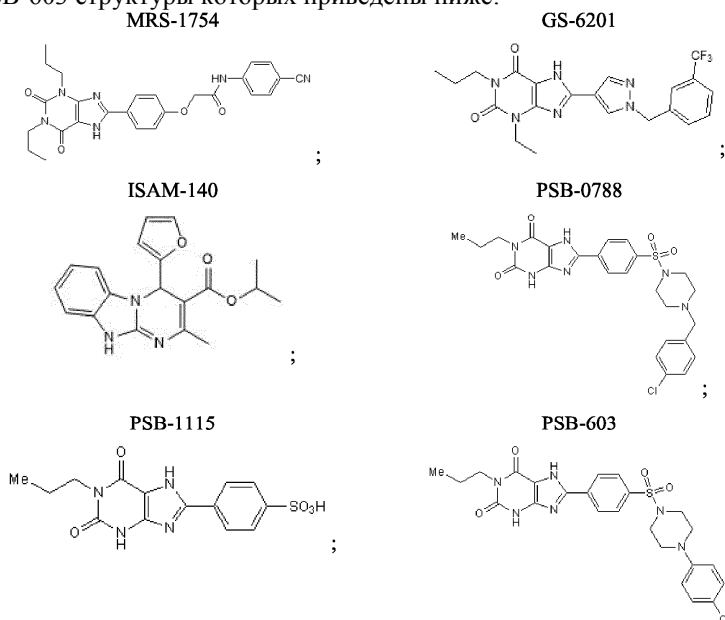
Другие антагонисты рецептора A2A описаны в следующих международных патентных заявках, содержание которых приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

#### 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:



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 № WO 2018/065627.

Ингибиторы CD73 включают натриевую соль N-бензил- $\alpha,\beta$ -метиленаденозин-5'-дифосфата и натриевую соль  $\alpha,\beta$ -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 помочь 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<sup>+</sup> до ADP-рибозы, в дополнение к синтезу NAADP из NADP<sup>+</sup>.

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 № 9840496.

Публикации патентов США № 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 № WO 2018/065622.

Ингибиторы CD39 включают метавольфрамат натрия (POM 1); тринатриевую соль 6-N,N-диэтил-D- $\beta,\gamma$ -дибромметил-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 № WO 2007/135195.

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

#### **Краткое описание чертежей**

Фиг. 1А показывает аминокислотную последовательность GPR174 человека (NP\_115942.1), указанную как SEQ ID NO: 1.

Фиг. 1В показывает кДНК, кодирующую GPR174 человека (NM\_032553.1), указанную как SEQ ID NO: 2.

Фиг. 1С показывает аминокислотную последовательность GPR174 мыши (NP\_001028423.1), указанную как SEQ ID NO: 3.

Фиг. 1D показывает аминокислотную последовательность GPR174 крысы (NP\_001100408.1), указанную как SEQ ID NO: 4.

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

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

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

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

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

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

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

Фиг. 5А 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).

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

Фиг. 6А-6В представляют собой графики, показывающие, что соединение 1 (группа I) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174 (фиг. 6А), но не в присутствии ADBR2 (фиг. 6В).

Фиг. 7А-7В представляют собой графики, показывающие, что соединение 2 (группа I) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174 (фиг. 7А), но не в присутствии ADBR2 (фиг. 7В).

Фиг. 8А-8В представляют собой графики, показывающие, что соединение 4 (группа I) не модулировало путь Gs в присутствии GPR174 (фиг. 8А) и не модулировало путь Gs в присутствии ADBR2 (фиг. 8В).

Фиг. 9А-9В представляют собой графики, показывающие, что соединение 6 (группа I) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174 (фиг. 9А), но не в присутствии ADBR2 (фиг. 9В).

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Фиг. 24А графически иллюстрирует процент FoxP3<sup>+</sup>Helios<sup>-</sup> клеток в CD4<sup>+</sup> популяции клеток на сутки 3 после стимуляции в культурах мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) 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.

Фиг. 24В графически иллюстрирует процент FoxP3<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup> клеток в CD4<sup>+</sup> популяции клеток на сутки 7 после стимуляции в культурах PBMC, 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.

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

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

Фиг. 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 описано в примере 7.

Фиг. 28 графически иллюстрирует процент FoxP3<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup> клеток в CD4<sup>+</sup> популяции клеток на сутки 7 после стимуляции в культурах PBMC 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.

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

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

Фиг. 31 графически иллюстрирует количество IL-2 (кратность по сравнению с продуцированным IL-2 для носителя) в культуральных супернатантах на сутки 2 после стимуляции в культурах PBMC от восьми различных доноров, обработанных носителем или соединением 10 (30 мкМ), как описано в примере 9.

Фиг. 32 графически иллюстрирует количество различных цитокинов (кратность по сравнению с продуцированным цитокином для носителя) в культуральных супернатантах на сутки 2 после стимуляции для PBMC человека, полученных от восьми доноров, обработанных носителем или соединением 10 (30 мкМ), где статистически значимую кратность увеличения наблюдали для интерлейкина-6 (IL-6) (\*\*p<0,001), интерлейкина-10 (IL-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 (EL-17А) (\*\*p<0,001), по сравнению с контрольным носителем, как описано в примере 9.

Фиг. 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 фиг. 34А показаны популяции CD4<sup>+</sup> (46,2%), CD8<sup>+</sup> (17,1%) и не-Т-клеток (33,9%), присутствующие в репрезентативной культуре PBMC от одного донора, через четыре ч после стимуляции антителом против CD3 и антителом против CD28 в присутствии соединения 10 (10 мкМ), как описано в примере 11.

Фиг. 34В графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным IL-2 в популяции CD4<sup>+</sup> Т-клеток



ческих Т-клеток) как процент от тотальных CD8<sup>+</sup> 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.

Фиг. 38 графически иллюстрирует количество окрашенных декстрамером клеток (антигенспецифических Т-клеток) как процент от тотальных CD8<sup>+</sup> 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.

Фиг. 39А графически иллюстрирует долю наивных регуляторных Т-клеток (Т-рег) с положительным по CTLA-4 окрашиванием (процент от наивных Т-рег клеток (CD45RA+FOXP3<sup>+</sup>) 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;

Фиг. 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<sup>-</sup>) 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;

Фиг. 40А графически иллюстрирует долю Т-рег памяти с положительным по CTLA-4 окрашиванием (процент от Т-рег памяти (CD45RA-FOXP3<sup>+</sup>) 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;

Фиг. 40В графически иллюстрирует долю не-Т-рег клеток памяти с положительным по CTLA-4 окрашиванием (процент от не-Т-рег памяти (CD45RA-FOXP3<sup>-</sup>) 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;

Фиг. 41 графически иллюстрирует долю CD4<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> Т-клетках, обработанных соединением 10, зависимым от дозы образом, по сравнению с обработанными контрольным носителем клетками, как описано в примере 14;

Фиг. 42 графически иллюстрирует долю CD8<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> Т-клетке, обработанной соединением 10, зависимым от дозы образом, по сравнению с обработанными контрольным носителем клетками, как описано в примере 14; и

Фиг. 43 графически иллюстрирует долю CD4<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> Т-клетках, обработанных соединением 10, зависимым от дозы образом, по сравнению с обработанными контрольным носителем клетками, как описано в примере 14;

Фиг. 44 графически иллюстрирует количество IFN- $\gamma$  в культуральных супернатантах через 24 ч 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- $\gamma$ , как описано в примере 15.

Фиг. 45А графически иллюстрирует кратность индукции активности передачи сигналов Gs в клетках HEK293, трансфицированных экспрессирующей GPR174 дикого типа плазмидой и экспрессирующей биосенсор сAMP плазмидой pGlo22F, в присутствии увеличивающихся концентраций липосом из фосфатидилсерина (PS) или лизофосфатидилсерина (Lyso-PS), как описано в примере 16.

Фиг. 45В графически иллюстрирует кратность индукции активности передачи сигналов Gs в клетках HEK293, трансфицированных экспрессирующей мутант GPR174-v38 плазмидой и экспрессирующей биосенсор сAMP плазмидой pGlo22F, в присутствии увеличивающихся концентраций липосом из фосфатидилсерина (PS) или лизофосфатидилсерина (Lyso-PS), как описано в примере 16.

Фиг. 46 графически иллюстрирует уровень активности передачи через GPR174 сигналов Gs в клетках HEK293, трансфицированных экспрессирующей GPR174 плазмидой и экспрессирующей биосенсор сAMP плазмидой pGlo22F (показанный как соотношение люминесценции после добавления фосфолипидов к предварительно считанному значению люминесценции) в присутствии липосом из PS, фосфатидил-

холина (PC), фосфатидилэтаноламина (PE) и фосфатидилинозитола (PI), как описано в примере 16.

Фиг. 47А графически иллюстрирует ингибирование индуцированной PS передачи через GPR174 сигналов Gs посредством ингибирующего GPR174 соединения 10 (группа I) зависимым от дозы образом, с кажущейся  $IC_{50}$  приблизительно 20-40 нМ, как описано в примере 16.

Фиг. 47В 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, как описано в примере 16.

Фиг. 47С 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, как описано в примере 16.

Фиг. 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, как описано в примере 16.

Фиг. 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, как описано в примере 16.

Фиг. 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.

Фиг. 48А 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.

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

Фиг. 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 (P1), как описано в примере 17.

Фиг. 49А графически иллюстрирует количество  $IFN-\gamma$  (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 ч 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.

Фиг. 49В графически иллюстрирует количество IL-2 (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 ч 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.

Фиг. 49С графически иллюстрирует количество TNF (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 ч 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.

Фиг. 50А графически иллюстрирует количество  $IFN-\gamma$  (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 ч 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.

Фиг. 50В графически иллюстрирует количество IL-2 (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 ч 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.

Фиг. 50С графически иллюстрирует количество TNF (пг/мл) в культуральных супернатантах через



MRS (1 мкМ), аденозиндезаминазы (ADA, 0,75 мкг/мл), отдельно или в комбинации с соединением 10, или контрольного носителя, как описано в примере 20.

Фиг. 54В графически иллюстрирует количество IL-2 (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 ч 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.

Фиг. 54С графически иллюстрирует количество TNF (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 ч 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.

Фиг. 55А графически иллюстрирует количество IFN- $\gamma$  (пг/мл) в супернатантах через 24 ч 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.

Фиг. 55В графически иллюстрирует количество IL-2 (пг/мл) в супернатантах через 24 ч 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.

Фиг. 55С графически иллюстрирует количество TNF (пг/мл) в супернатантах через 24 ч 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.

Фиг. 55D графически иллюстрирует количество GM-CSF (пг/мл) в супернатантах через 24 ч 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.

Фиг. 56А графически иллюстрирует кратность изменения, по сравнению с носителем, количества IFN- $\gamma$  в культуральных супернатантах через 24 ч 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.

Фиг. 56В графически иллюстрирует кратность изменения, по сравнению с носителем, количества IL-2 в культуральных супернатантах через 24 ч 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.

Фиг. 56С графически иллюстрирует кратность изменения, по сравнению с носителем, количества TNF в культуральных супернатантах через 24 ч 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.

Фиг. 57 графически иллюстрирует кратность уменьшения количества AREG<sup>+</sup> 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.

Фиг. 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.

Фиг. 59А графически иллюстрирует рост опухолей CT26 у индивидуальных мышей дикого типа (WT), подвергнутых инокуляции клеток мышинной карциномы ободочной кишки CT26.c125 на сутки 0 и обработке антителом против GITR на сутки 7 и 9, как описано в примере 24.

Фиг. 59В графически иллюстрирует рост опухолей CT26 у индивидуальных мышей GPR174-KO, подвергнутых инокуляции клеток мышинной карциномы ободочной кишки CT26.c125 на сутки 0 и обработке антителом против GITR на сутки 7 и 9; как описано в примере 24.

Фиг. 60 графически иллюстрирует процент выживаемости несущих опухоль мышей WT и GPR174-KO, подвергнутых инокуляции клеток мышинной карциномы ободочной кишки CT26.c125 на сутки 0 и обработке антителом против GITR на сутки 7 и 9, показывающий, что мыши GPR174-KO имели более высокий процент выживаемости (т.е. были подвергнуты эвтаназии значительно позже), чем мыши WT ( $p=0,03$ , логарифмический ранговый критерий), как описано в примере 24.

Фиг. 61А графически иллюстрирует рост опухолей CT26 у индивидуальных мышей WT, подвергнутых инокуляции клеток мышинной карциномы ободочной кишки CT26.c125 на сутки 0 и обработке ан-



тителом против GITR на сутки 7, 9 и 14, как описано в примере 24.

Фиг. 61В графически иллюстрирует рост опухолей у индивидуальных мышей GPR174-KO, подвергнутых инокуляции клеток мышинной карциномы ободочной кишки CT26.c125 на сутки 0 и обработке антителом против GITR на сутки 7, 9 и 14; как описано в примере 24.

Фиг. 62 графически иллюстрирует процент выживаемости несущих опухоль мышей WT и GPR174-KO, подвергнутых инокуляции клеток мышинной карциномы ободочной кишки CT26.c125 на сутки 0 и обработке антителом против GITR на сутки 7, 9 и 14, показывающий, что мыши GPR174-KO имели более высокий процент выживаемости (т.е. были подвергнуты эвтаназии значимо позже), чем мыши WT, как описано в примере 24.

Фиг. 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.

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

Фиг. 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, показывающий, что средние размеры опухолей были значимо меньше у мышей GPR174 KO на сутки 14 (где "\*" обозначает  $p=0,01$ ) и 16 (где "\*\*\*\*" обозначает:  $p=0,00005$ ), как описано в примере 25.

Фиг. 64 графически иллюстрирует процент выживаемости несущих опухоль меланому B16F10-Kb мышей WT и GPR174-KO, подвергнутых инокуляции клеток B16F10-Kb на сутки 0 и обработке антителом против GITR на сутки 4 и 14, показывающий, что мыши GPR174-KO 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.

Фиг. 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.

Фиг. 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.

Фиг. 66В графически иллюстрирует концентрацию IFN- $\gamma$  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.

Фиг. 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.

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

Фиг. 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 уровне 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.

Фиг. 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 уровне IL-2 в супернатантах культивированных спленоцитов, выделенных от мышей  $n=3$  GPR174-KO после 2 суток стимуляции антителом против CD3 и антителом против CD28, как описано в примере 27.

Фиг. 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 уровне 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.

Фиг. 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 уровне 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.

Фиг. 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.

Фиг. 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 ч после стимуляции, как описано в примере 28.

Фиг. 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.

Фиг. 72В графически иллюстрирует концентрацию IFN- $\gamma$  (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.

Фиг. 72С графически иллюстрирует концентрацию IFN- $\gamma$  (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 Т-рег средства приводит к синергической индукции продукции IFN- $\gamma$ , 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 АТФ-аденозин-A2aR и/или A2bR передачи сигналов (например, антагонистом A2aR и/или антагонистом A2bR), или комбинации ингибитора опосредованной GPR174 передачи сигналов и ингибитора гидролиза АТФ до аденозина посредством CD38, CD39 и CD73 (например, ингибитора CD73 или ингибитора CD38, или ингибитора CD39) и/или ослабляющего Т-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: секретинные, 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 А-Ф, где класс А представляет рецепторы, родственные родопсину и адренергическим рецепторам, класс В, рецепторы, родственные кальцитонину и рецепторам паратиреоидного гормона, класс С, рецепторы, родственные метаболитным рецепторам, и классы D-F представляют рецепторы, обнаруженные в грибах и археобактериях.

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.  $G\alpha_s$ ,  $G\alpha_i$ ,  $G\alpha_q$  и  $G\alpha_{12/13}$ . Гетеротримерный G-белок связывает активированный белок GPCR, т.е. 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  $G\alpha_{i1-3}$ ,  $G\alpha_o$ ,  $G\alpha_t$ ,  $G\alpha_{\text{gust}}$  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  $\beta$ -изоформы фосфолипазы C (PLC $\beta$ ), 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, регулируемую подходящим фактором транскрипции.

"Путь передачи сигналов Gi" или "путь передачи сигналов  $G\alpha_i$ " относится к внутриклеточному пути передачи сигналов, активируемому посредством активированного белка Gi альфа. Белок  $G\alpha_i$  активируется после связывания с активированным белком GPCR.  $G\alpha_{i1-3}$ ,  $G\alpha_o$  и  $G\alpha_z$  ингибируют активность аденилилциклазы (AC). Сенсорный белок Gi,  $G\alpha_t$ , активирует зависимую от циклического гуанозинмонофосфата (cGMP) фосфодиэстеразу, вызывая уменьшение уровня внутриклеточного cGMP, и  $G\alpha_{\text{gust}}$  активирует фосфолипазу C (PLC). Все члены семейства Gi, за исключением  $G\alpha_z$ , являются чувствительными к ингибированию токсином коклюша посредством рибозилирования аденозиндифосфатом (ADP) их субъединицы  $\alpha$  (Siehler, Biotechnology 3:471-83, 2008).

"Путь передачи сигналов Gs" или "путь передачи сигналов  $G\alpha_s$ " относится к внутриклеточному пути передачи сигналов, активируемому посредством активированного белка Gs альфа. Белок  $G\alpha_s$  активируется после связывания с активированным белком GPCR. Семейство Gs белков G ( $G\alpha_s$  и  $G\alpha_{olf}$ ) активирует AC, которая образует вторичный мессенджер 3',5'-циклический аденозинмонофосфат (cAMP).

"Путь передачи сигналов  $G_{12/13}$ " или "путь передачи сигналов  $G\alpha_{12/13}$ " относится к внутриклеточному пути передачи сигналов, активируемому посредством активированного белка  $G_{12/13}$  альфа. Белок  $G\alpha_{12/13}$  активируется после связывания с белком GPCR. Семейство  $G_{12/13}$  белков G ( $G\alpha_{12}$  и  $G\alpha_{13}$ ) 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, сенсibilизировать, 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 участка 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 H<sub>1</sub>; человеческий мускариновый M<sub>2</sub>; человеческий никотиновый ацетилхолина  $\alpha 1$ ; человеческий опиата  $\mu$  (OP3, MOP); человеческий калиевый канал [K<sub>ATP</sub>]; человеческий калиевый канал hERG; человеческий сигма  $\sigma 1$ ; крысиный сигма  $\sigma 2$ ; 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 G<sub>s</sub>, который проводят в клетке, экспрессирующей GPR174, по сравнению с активностью передачи сигналов G<sub>s</sub> 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 органический молекула" и "малая неорганический 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 мас.%, свободных от других компонентов. В конкретных вариантах осуществления, препарат составляет по меньшей мере 50, 60, 75, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99 мас.%, 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 алканоильной 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 алканоилокси-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 C и H при отсутствии замещения. Алкениленовая группа может содержать, если не ука-



зано иное, 2, 3, 4, 5 или 6 атомов углерода, исключая атомы углерода из любых заместителей, если они присутствуют. Неограничивающие примеры алкениловых 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 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-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 C и H 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, NO<sub>2</sub>, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, COOR', CONR'<sub>2</sub>, OR', SR', SOR, SO<sub>2</sub>R', NR'<sub>2</sub>, NR'(CO)R', NR'C(O)OR', NR'C(O)NR'<sub>2</sub>, NR'SO<sub>2</sub>NR'<sub>2</sub>, NR'SO<sub>2</sub>R', 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, NO<sub>2</sub>, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, COOR', CONR'<sub>2</sub>, OR', SR', SOR', SO<sub>2</sub>R', NR'<sub>2</sub>, NR'(CO)R', NR'C(O)OR', NR'C(O)NR'<sub>2</sub>, NR'SO<sub>2</sub>NR'<sub>2</sub>, NR'SO<sub>2</sub>R', 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)<sub>2</sub>-, 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 алкиниленовых 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. Алкинилен может являться незамещенным или замещенным (например, необязательно замещенный алкинилен), 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 гетероцикла 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 (моноклической или бициклической с конденсированными кольцами), в котором карбоцикл удовлетворяет правилу Хюккеля ( $4n+2$  электронов в одной системе  $\pi$ ) 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 моноклических 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 ( $C_6$ - $C_{10}$ -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 ( $C_1$ - $C_9$ -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, ( $C_6$ - $C_{10}$ -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 ( $C_6$ - $C_{10}$ -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 ( $C_1$ - $C_9$ -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 ( $C_6$ - $C_{10}$ -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 ( $C_6$ - $C_{10}$ -арил)-S(O)<sub>2</sub>-. 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 ( $C_6$ - $C_{10}$ -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 гидроксид. 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  $C_1$ - $C_9$ - гетероцикла, необязательно замещенного  $C_6$ - $C_{10}$ -арила, необязательно замещенного  $C_1$ - $C_9$ - гетероарила, или R' и R" объединяются с формированием необязательно замещенного гетероцикла. 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 опи-

сании. 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 гетероцикла, 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,  $C_3$ - $C_{10}$ -циклоалкенил), 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,  $C_3$ - $C_{10}$ -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-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,  $C_3$ - $C_{10}$ -циклоалкил), если не указано иное. Циклоалкильные группы могут являться моноциклическими или бициклическими. Бициклические циклоалкильные группы могут принадлежать к типу бицикло[ $r.q$ ]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, NO<sub>2</sub>, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, COOR', CONR'<sub>2</sub>, OR', SR', SOR, SO<sub>2</sub>R, NR'<sub>2</sub>, NR'(CO)R', NR'(O)OR, NR'(O)NR'<sub>2</sub>, NR'SO<sub>2</sub>NR'<sub>2</sub>, NR'SO<sub>2</sub>R, 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,  $C_3$ - $C_{10}$ -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, C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>-циклоалкил), если не указано иное. Неограничивающие примеры циклоалкинила включают циклооктинил, циклононинил, циклодецинил и циклодекадиинил. 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 C на каждом конце, присоединенном к другим группам. В некоторых вариантах осуществления, гетероатом представляет собой O 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 O, 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 гетероциклоксикарбонила. 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, гетероциклоила, гетероциклоила, амина, аминокарбонила, алкоксикарбонила, арилоксикарбонила, гетероарилоксикарбонила и гетероциклоксикарбонила. 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), как описано для гетероалкенилена.

Термины "гетероароматическая группа" и "гетероарил", в рамках изобретения, относятся к гетероциклической структуре (моноциклической или конденсированной бициклической), удовлетворяющей правилу Хюккеля ( $4n+2$  электронов в одной системе  $\pi$ ) 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, бензимидазол, бензотриазол, изохинолил, хинолил, бензотиазол, бензофуранил, тиенил, фурил, пирролил, тиазол, оксазол, изоксазол, бензоксазол, бензоизоксазол и имидазол. 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 5-12-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, бензотиазол, бензимидазол, пиразол, имидазол, изоксазол, тиазол, бензотиазол или индолил. В конкретных вариантах осуществления, гетероароматическая группа представляет собой пиридил или пиримидил. Термин "гетероарил" относится к гетероарильной группе, как описано в настоящем описании, за исключением того, что гетероарил 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)<sub>2</sub>-, 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, т.е. 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, C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>-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)<sub>2</sub>-). 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, циклогексенным 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, пуринил, тиадиазолил (например, 1,3,4-тиадиазол), тетрагидрофуранил, дигидрофуранил, тетрагидротиенил, дигидротиенил, дигидроиндолил, тетрагидрохинолил, тетрагидроизохинолил, пиридил, дигидропиридил, дитиазолил, бензофуранил, бензотиенил и т.п. Другие иллюстративные гетероциклилы включают: 2,3,4,5-тетрагидро-2-оксо-оксазолил; 2,3-дигидро-2-оксо-1Н-имидазолил; 2,3,4,5-тетрагидро-5-оксо-1Н-пиразолил (например, 2,3,4,5-тетрагидро-2-фенил-5-оксо-1Н-пиразолил); 2,3,4,5-тетрагидро-2,4-диоксо-1Н-имидазолил (например, 2,3,4,5-тетрагидро-2,4-диоксо-5-метил-5-фенил-1Н-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-1Н-триазолил (например, 4,5-дигидро-3-метил-4-амино-5-оксо-1Н-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-1Н-индолил (например, 3,3-диметил-2,3-дигидро-2-оксо-1Н-индолил и 2,3-дигидро-2-оксо-3,3'-спиропропан-1Н-индол-1-ил); 1,3-дигидро-1-оксо-2Н-изо-индолил; 1,3-дигидро-1,3-диоксо-2Н-изо-индолил; 1Н-бензопиразолил (например, 1-(этоксикарбонил)-1Н-бензопиразолил); 2,3-дигидро-2-оксо-1Н-бензимидазолил (например, 3-этил-2,3-дигидро-2-оксо-1Н-бензимидазолил); 2,3-дигидро-2-оксо-бензоксазолил (например, 5-хлор-2,3-дигидро-2-оксо-бензоксазолил); 2,3-дигидро-2-оксо-бензоксазолил; 2-оксо-2Н-бензопиранил; 1,4-бензодиоксанил; 1,3-бензодиоксанил; 2,3-дигидро-3-оксо,4Н-1,3-бензотиазинил; 3,4-дигидро-4-оксо-3R-хиназолинил (например, 2-метил-3,4-дигидро-4-оксо-3Н-хиназолинил); 1,2,3,4-тетрагидро-2,4-диоксо-3Н-хиназолил (например, 1-этил-1,2,3,4-тетрагидро-2,4-диоксо-3R-хиназолил); 1,2,3,6-тетрагидро-2,6-диоксо-7Н-пуринил (например, 1,2,3,6-тетрагидро-1,3-диметил-2,6-диоксо-7Н-пуринил); 1,2,3,6-тетрагидро-2,6-диоксо-1Н-пуринил (например, 1,2,3,6-тетрагидро-3,7-диметил-2,6-диоксо-1Н-пуринил); 2-оксобенз[с, d]индолил; 1,1-диоксо-1Н-нафт[1,8-с, d]изотиазолил; и 1,8-нафтилендикарбоксамидо. Гетероциклическая группа может являться незамещенной или замещенной (например, необязательно замещенный гетероциклил). Термин "гетероциклилен" относится к гетероциклической группе, как описано в настоящем описании, за исключением

того, что гетероциклический представляет собой двухвалентный заместитель.

Термин "гетероциклический", в рамках изобретения, относится к группе, имеющей структуру (C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>-гетероциклический)-O-. Гетероциклический может являться незамещенным или замещенным (например, необязательно замещенный гетероциклический), в соответствии с определением гетероциклического.

Термин "гетероциклический", в рамках изобретения, относится к группе, имеющей структуру (C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>-гетероциклический)-C(O). Гетероциклический может являться незамещенным или замещенным (например, необязательно замещенный гетероциклический), в соответствии с определением гетероциклического.

Термин "гетероциклический", в рамках изобретения, относится к группе, имеющей структуру (C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>-гетероциклический)-C(O)-O-. Гетероциклический может являться незамещенным или замещенным (например, необязательно замещенный гетероциклический), в соответствии с определением гетероциклического.

Термин "гетероциклический" относится к группе, имеющей структуру гетероциклический-S(O)-, в которой гетероциклический является таким, как описано в настоящем описании. Гетероциклическийсульфонильная группа может являться незамещенной или замещенной, как описано в настоящем описании.

Термин "гетероциклический" относится к группе, имеющей структуру гетероциклический-S(O)<sub>2</sub>-, в которой гетероциклический является таким, как описано в настоящем описании. Гетероциклическийсульфонильная группа может являться незамещенной или замещенной, как описано в настоящем описании.

Термин "гетероциклический" относится к группе, имеющей структуру гетероциклический-S-, в которой гетероциклический является таким, как описано в настоящем описании. Гетероциклический-S-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 гидрокси-групп, при условии, что не более одной гидрокси-группы 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 -NO<sub>2</sub>.

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 гетероциклический. 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, гидрокси, необязательно замещенного амина, необязательно замещенного амидо, тиол, циано, необязательно замещенного C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкила, необязательно замещенного C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкенила, необязательно замещенного C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкинила, необязательно замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкокси, необязательно замещенного C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>-арилокси, необязательно замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>-гетероарилокси, необязательно замещенного C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алканоила, необязательно замещенного C<sub>7</sub>-C<sub>11</sub>-арилоила, необязательно замещенного C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-гетероарилоила, необязательно замещенного C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-гетероциклического, гидроксикарбонила, необязательно замещенного сложного эфира, необязательно замещенного карбоксиамида, необязательно замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алканоилокси, необязательно замещенного C<sub>7</sub>-C<sub>11</sub>-арилоилокси, необязательно замещенного C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-гетероарилоилокси, необязательно замещенного C<sub>2</sub>-C<sub>10</sub>-гетероциклическогоилокси, необязательно замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-тиоалкила, необязательно замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкилсульфинила, необязательно замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкилсульфонила, необязательно замещенного C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>-арилтио, необязательно замещенного C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>-арилсульфинила, необязательно замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>-гетероарилтио, необязательно замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>-гетероарилсульфинила, необязательно замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>-гетероарилсульфонила, необязательно замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>-гетероциклическийсульфинила, необязательно замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>-гетероциклическийсульфонила, необязательно замещенного сульфамиола, необязательно замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-гетероалкила, необязательно замещенного C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-гетероалкенила, необязательно замещенного C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-гетероалкинила, необязательно замещенного C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>-циклоалкила, необязательно замещенного C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub>-циклоалкенила, необязательно замещенного C<sub>8</sub>-C<sub>10</sub>-циклоалкинила, необязательно замещенного C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>-арила, необязательно замещенного C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>-арил C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкила, необязательно замещенного C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>-арил C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкенила, необязательно замещенного C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>-арил C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкинила, необязательно замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>-гетероарила, необязательно замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>-гетероарил C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкила, необязательно замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>-гетероарил C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкенила, необязательно замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>-гетероарил C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкинила, необязательно замещенного C<sub>1</sub>-C<sub>9</sub>-гетероциклического, необязательно замещенного C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>-гетероциклический C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкила, необязательно замещенного C<sub>2</sub>-C<sub>9</sub>-гетероциклический



$C_2$ - $C_6$ -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 кислотнo-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, amino- или гидразиновой) группы от участия в одной или нескольких нежелательных реакциях в ходе химического синтеза. Общеизвестные O- и N-защитные группы описаны в Greene, "Protective Groups in Organic Synthesis", 3<sup>rd</sup> 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, т-бутилацетил, 2-хлорацетил, 2-бромацетил, трифторацетил, трихлорацетил, фталил, о-нитрофеноксиацетил,  $\alpha$ -хлорбутирил, бензоил, 4-хлорбензоил, 4-бромбензоил, m-бутилдиметилсилил, три-изо-пропилсилилоксиметил, 4,4'-диметокситритил, изобутирил, феноксиацетил, 4-изопропилфеноксиацетил, диметилформамидино и 4-нитробензоил.

Иллюстративные O-защитные группы для защиты содержащих карбонил групп, включают, но без ограничения: ацетали, ацилалли, 1,3-дителианы, 1,3-диоксаны, 1,3-диоксоланы и 1,3-дителиоланы.

Другие O-защитные группы включают, но без ограничения: замещенные алкиловые, ариловые и арил-алкиленовые эфиры (например, тритил; метилтиометил; метоксиметил; бензилоксиметил; силилоксиметил; 2,2,2-трихлорэтоксиметил; тетрагидропиранил; тетрагидрофуранил; этоксиэтил; 1-[2-(триметилсилил)этокси]этил; 2-триметилсилилэтил; т-бутиловый эфир; п-хлорфенил, п-метоксифенил, п-нитрофенил, бензил, п-метоксибензил, и нитробензил); силиловые эфиры (например, триметилсилил; триэтилсилил; триизопропилсилил; диметилизопропилсилил; т-бутилдиметилсилил; т-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, п-толуолсульфонил, и т.п.; формирующие карбамат группы, такие как бензилоксикарбонил, п-хлорбензилоксикарбонил, п-метоксибензилоксикарбонил, п-нитробензилоксикарбонил, 2-нитробензилоксикарбонил, п-бромбензилоксикарбонил, 3,4-диметоксибензилоксикарбонил, 3,5-диметоксибензилоксикарбонил, 2,4-диметоксибензилоксикарбонил, 4-метоксибензилоксикарбонил, 2-нитро-4,5-диметоксибензилоксикарбонил, 3,4,5-триметоксибензилоксикарбонил, 1-(п-бифенилил)-1-метилэтоксикарбонил,  $\alpha,\alpha$ -диметил-3,5-диметоксибензилоксикарбонил, бензгидрилоксикарбонил, т-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, т-бутилацетил, аланил, фенилсульфонил, бензил, т-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, гетероцикл (например, гетероарил), гетероциклилалкил (например, гетероарилалкил), или два  $R^{N1}$  объединяются с формированием гетероцикла. 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, гетероцикл (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, NO<sub>2</sub>, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, COOR, CONR'<sub>2</sub>, OR, SR', SOR', SO<sub>2</sub>R', NR'<sub>2</sub>, NR'(CO)R', NR'C(O)OR', NR'C(O)NR'<sub>2</sub>, NR'SO<sub>2</sub>NR'<sub>2</sub> или NR'SO<sub>2</sub>R, 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, NO<sub>2</sub>, CF<sub>3</sub>, OCF<sub>3</sub>, COOR', CONR'<sub>2</sub>, OR', SR', SOR', SO<sub>2</sub>R', NR'<sub>2</sub>, NR'(CO)R', NR'C(O)OR', NR'C(O)NR'<sub>2</sub>, NR'SO<sub>2</sub>NR'<sub>2</sub> или NR'SO<sub>2</sub>R', 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, 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: C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-алкил или гетероалкил, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкенил или гетероалкенил, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкинил или гетероалкинил, галоген; арил, гетероарил, азидо(-N<sub>3</sub>), нитро (-NO<sub>2</sub>), 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 (-CO<sub>2</sub>H), карбоновый сложный эфир (-CO<sub>2</sub>R'), карбамоил (-OC(=O)NR'R'' или -NRC(=O)OR'), гидроксид (-OH), изоциано (-NC), сульфонат (-S(=O)<sub>2</sub>OR), сульфонамид (-S(=O)<sub>2</sub>NRR' или -NRS(=O)<sub>2</sub>R'), или сульфонил (-S(=O)<sub>2</sub>R), где каждый R или R' выбран, независимо, из H, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>алкила или гетероалкила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-алкенила или гетероалкенила, C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-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 неприродную аминокислоту. "Неприродная аминокислота" представляет собой аминокислоту, которая не продуцирована или не обнаружена у млекопитающего в природе. Примеры неприродных аминокислот включают D-аминокислоты; аминокислоту, имеющую ацетиламинометильную группу, присоединенную к атому серы цистеина; пэгиллированную 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)<sub>2</sub>, F(ab')<sub>2</sub>, 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')<sub>2</sub>, 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 изоформ IgG2 или IgG4, можно получать одним из нескольких способов, известных специалисту в данной области, как описано в Vaughan et al., Nature Biotechnol 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 взаимодействие 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 токсоид 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 солибилизовать 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 № 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 изо-

бретению, 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 № 4816567, от Cabilly; и Morrison, S.L., et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA #7:6851 6855, (1984)). Одной из форм химерного антитела, которое можно использовать по настоящему изобретению, является гуманизованное моноклональное антитело против GPR174. Гуманизованные формы не относящихся к человеку (например, мышиных) антител представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, происходящую из не относящегося к человеку иммуноглобулина. Гуманизованные моноклональные антитела получают посредством переноса не относящихся к человеку (например, мышиных) 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, гуманизованные антитела могут содержать остатки, не обнаруженные в реципиентном антителе или в донорном антителе. Эти модификации осуществляют для дополнительного уточнения активности антитела. Как правило, гуманизованное 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. Гуманизованное 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).

Гуманизованные 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 гуманизованные 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 гуманизованных 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. 750:2844, (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 № 5693762, от Queen, 1997. Кроме того, существуют коммерческие организации, которые синтезируют гуманизованные 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')<sub>2</sub>). 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)<sub>2</sub>, F(ab')<sub>2</sub> 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')<sub>2</sub> и сохраняет оба антигенсвязывающих участка интактного антитела. Выделенный фрагмент F(ab')<sub>2</sub> 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')<sub>2</sub>. 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 № 4331647 от Goldenberg; Nisonoff, A., et al., Arch. Biochem. Biophys. 89:230, (1960); Porter, R.R., Biochem. J. 75:119, (1959); Edelman, et al., in Methods in Enzymology 7:422, 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 соединить 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 № 4946778, от Ladner; Pack, P., et al., Bio/Technology 77:1271, (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 № 5223409, от Lardner; Патент США № 4946778, от Ladner; Патент США № 5403484, от Lardner; Патент США № 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 № 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 возможной 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 № 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, иден-

тифицированных 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, Gαq, Gαs, Gαi, Gαz, Gαo, Gα12, Gα13, Gα15 и Gα16. 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 Gα12/13. В дополнение к путям передачи сигналов G-белка, GPCR могут передавать сигналы посредством комплексов субъединиц βγ, 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'-О-(3'-[<sup>35</sup>S]тио)-трифосфата ([<sup>35</sup>S]GTPγS) с субъединицами Gα 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, интернализуются 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 кластрином 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 рассматривает, 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 Gαq, Gα11, Gα14, Gα15/16 (в совокупности, семейство Gq) активируют путь передачи сигналов Gq и ассоциированы с активацией фермента PLC, который, в свою очередь, гидролизует фосфолипид PIP<sub>2</sub>, высвобождая два внутриклеточных мессенджера: DAG и IP<sub>3</sub>. IP<sub>3</sub> является растворимым и диффундирует через цитоплазму и взаимодействует с рецепторами IP<sub>3</sub> 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 IP<sub>3</sub> ассоциировано с активацией ассоциированных с Gq рецепторов. Анализы, детектирующие накопление IP<sub>3</sub>, можно использовать для определения того, является ли соединение кандидатом, например, агонистом ассоциированного с Gq рецептора (т.е. такое соединение может увеличивать уровни IP<sub>3</sub>). 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.

#### б. Путь передачи сигналов Gs.

Активированный белок Gs (Gαs и Gαolf) 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 (PKA) и имеет другие нижестоящие эффекты. PKA 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,  $\beta$ -галактозидаза, или другой поддающийся детекции выход. Кроме того, анализы, детектирующие внутриклеточные уровни cAMP, можно использовать для оценки активности передачи сигналов Gs. Можно использовать множество способов, известных в данной области для измерения cAMP; в некоторых вариантах осуществления, предпочтительный способ основан на использовании антител против cAMP в формате на основе ELISA.

c. Пути передачи сигналов Gi.

G-белки G1 (Gai1, Gai2, и Gai3), Gao, Gat1, Gat2, Gagust, Gaz (в совокупности, семейство Gi) активируют путь передачи сигналов Gi и ассоциированы с ингибированием AC и супрессией образования cAMP. Сенсорный белок Gi, Gat, активирует зависимую от cGMP фосфодиэстеразу, вызывая уменьшение внутриклеточного уровня cGMP, и Gagust активирует PLC. Таким образом, анализы, детектирующие внутриклеточные уровни cAMP, как описано выше, можно использовать для оценки активности пути передачи сигналов Gi. Некоторые клетки имеют относительно низкие уровни cAMP, таким образом, увеличение клеточного уровня cAMP может способствовать определению исходного уровня активности передачи сигналов Gi. Специалист в данной области способен увеличивать клеточные уровни cAMP посредством приведения клеток в контакт, например, с форболовыми 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 Gaz, являются чувствительными к ингибированию токсином коклюша посредством ADP-рибозилирования их соответствующей субъединицы  $\alpha$  (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 Rhoкиназу, 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).

e. Роль  $\beta$ - и  $\gamma$ -субъединиц.

В дополнение к 16 субъединицам G $\alpha$ , существуют пять различных  $\beta$ - и 12  $\gamma$ -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).

f. 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 Gs посредством GPR174. Соответственно, авторы настоящего изобретения однозначно определили, что идентифицированные соединения функционально взаимодействуют с GPR174. В частности (применительно к табл. 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 Gs, 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 передаче через GPR174 сигналов Gs и, как обнаружено, конкурирует с агонистом GPR174 LysoPS, таким образом, соединение 4 характеризуется как антагонист GPR174. Эти результаты подробно описаны в примере 4 ниже.

C. 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, Lagerstrom 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 Фиг. 1А, кодируемой SEQ ID NO: 2 (NM\_032553.1), как показано на Фиг. 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 фиг. 1С). Аминокислотная последовательность белка GPR174 крысы (NP\_001100408.1) указана как SEQ ID NO: 4 (показано на фиг. 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 Фиг. 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 фиг. 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). EC<sub>50</sub> 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<sub>50</sub> LysoPS для P2Y10 составляет 28 нМ при условии, что EC<sub>50</sub> для GPR174 составляет 520 нМ. Следует отметить, что Международный союз фундаментальной и клинической фармакологии (IUPHAR) продолжает перечислять GPR174 как орфанный GPCR ([guidetopharmacology.org/GRAC](http://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<sup>-Y</sup>), количества Т-рег клеток являлись значимо увеличенным в конкретных тканях, в соответствии с наблюдением, что пролиферация и дифференцировка CD4<sup>+</sup> 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<sup>-Y</sup> 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 CHO 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 фиг. 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 значительно увеличенными в конкретных тканях.

Как далее описано в настоящем описании в примерах 3 и 4, показанных в таблице 1 и на фиг. 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 cAMP. cAMP является ключевым регулятором иммунной системы (Mosenden and Tasken, Cellular Signaling 23:1009-1016, 2011). Известно, что cAMP 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 cAMP 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., Oncoimmunology 5(6):el 163462, 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 фиг. 47А-47Е, 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, 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 фосфатидилсерином (PS) или лизофосфатидилсерином (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 Т-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 Т-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, неходжжкинских 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, бронхоальвеолярной 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 мочеточника, 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, аденокарциномы, 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.

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 (Kirpnis 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- $\gamma$ , 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- $\beta$  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 нейродеге-

неративных 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.

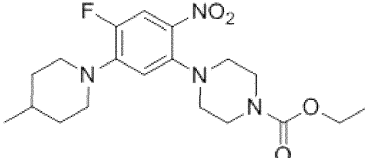
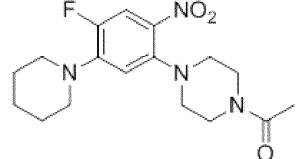
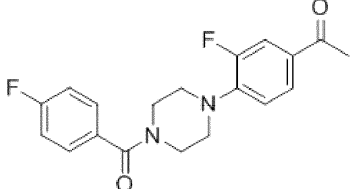
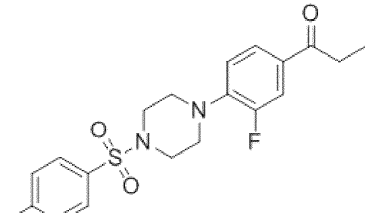
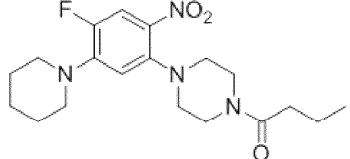
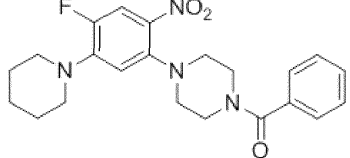
Клетки естественные киллеры (клетки NK) играют критическую роль в врожденной иммунной системе, и в отличие от других клеток в иммунной системе, клетки NK могут являться цитотоксическими без предварительной стимуляции (Mandal et al., *Nematol Oncol Stem Cell Ther.* (2): 47-55, 2015). Например, они могут 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., *Nematol 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 NK и улучшения прогноза для пациента. Клетки NK 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 NK 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 NK 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.

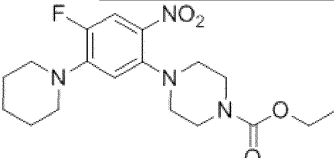
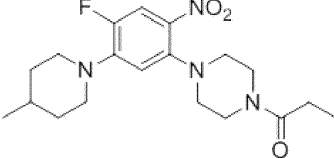
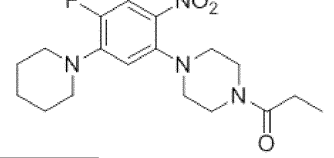
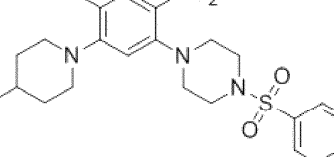
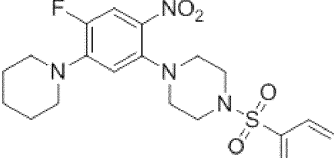
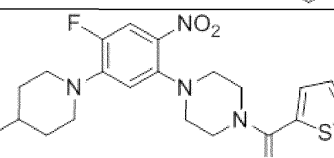
В соответствии с вышеуказанным, в одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу лечения, предотвращения и/или уменьшения вероятности развития злокачественной опухоли у субъекта, нуждающегося в таком лечении. Способ включает введение соединения, которое ингибирует опосредованный GPR174 путь 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.

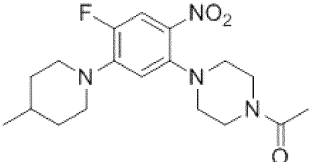
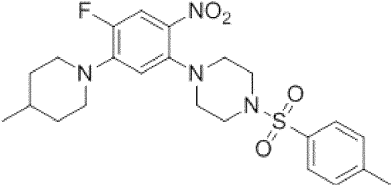
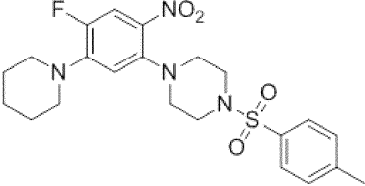
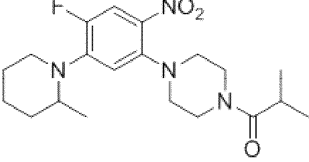
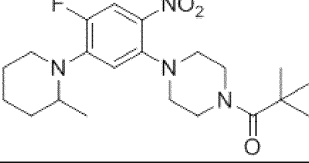
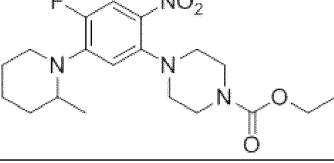
#### D. Взаимодействующие с GPR174 соединения.

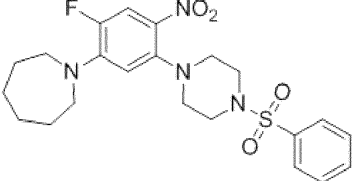
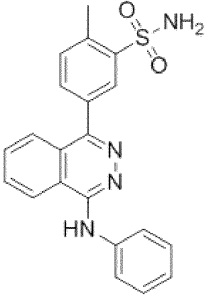
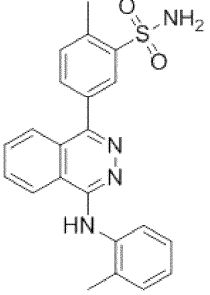
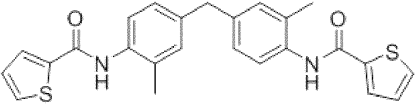
Авторы изобретения идентифицировали следующие соединения как функционально взаимодействующие с рецептором GPR174, с использованием модифицированной формы анализа CRA, описанного выше. Структуры идентифицированных репрезентативных соединений указаны ниже в табл. 1.

Таблица 1. Репрезентативные соединения

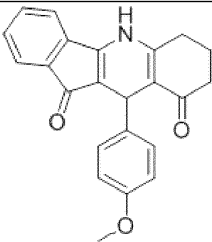
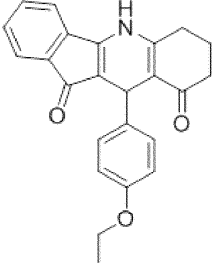
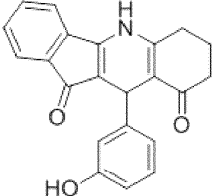
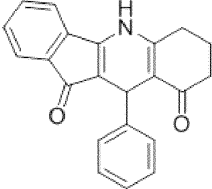
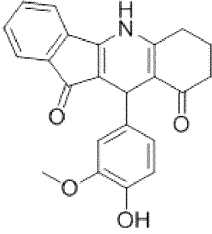
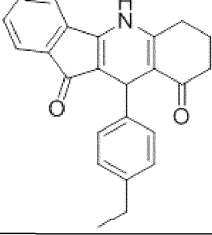
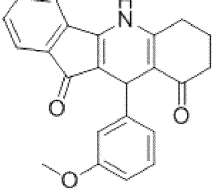
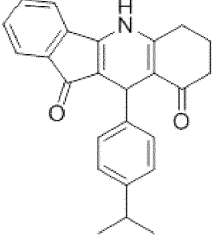
№. соединения/ группа формул	Структура	CRA EC <sub>50</sub> (мкМ)	Активность CRE GPR174 человека, EC <sub>50</sub> ; Кратность уменьшения активности передачи сигналов Gs
1 (группа I)		2,1, 2,1, 1,5, 0,9	IA; кратность уменьшения 0,4, 0,8; 2,9
2 (группа I)		3,3, 3,0, 5,1, 0,4	IA; кратность уменьшения 0,4, 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

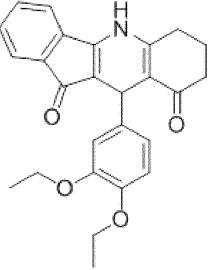
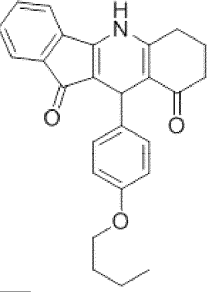
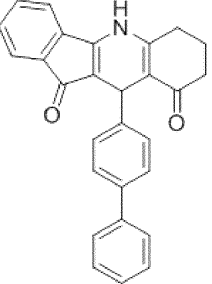
7 (группа I)		>0,6, >0,7	IA; 0,3, 0,5; кратность уменьшения 2,4
8 (группа I)		>0,7, >1,6	IA; 0,7, 0,4; кратность уменьшения 3,3
9 (группа I)		>2	IA; 0,7, 0,5; кратность уменьшения 2,1
10 (группа I)		0,6, 0,5	IA, 0,2, 0,5; кратность уменьшения 5,1
11 (группа I)		1,5, >1,1	IA, 0,5, 1,3, 0,6; кратность уменьшения 3,1
12 (группа I)		0,3	IA, 0,4, 0,7, кратность уменьшения 3,9

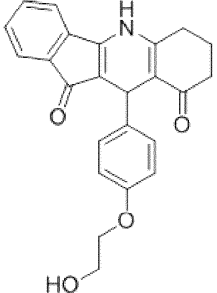
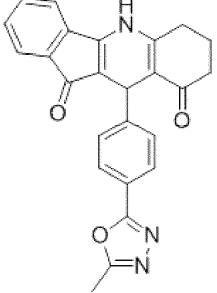
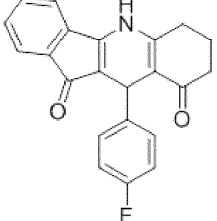
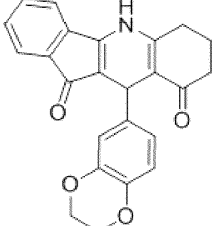
13 (группа I)		>2	IA, 0,8, 1,2; кратность уменьшения 2,2
14 (группа I)		ND	IA, 1,1; кратность уменьшения 3
15 (группа I)		ND	IA, 1,7, кратность уменьшения 2,6
16 (группа I)		ND	IA, 0,8, кратность уменьшения 2,1
17 (группа I)		ND	IA, 3,0, кратность уменьшения 2,0
18 (группа I)		ND	IA, 1,0; кратность уменьшения 1,9

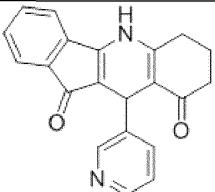
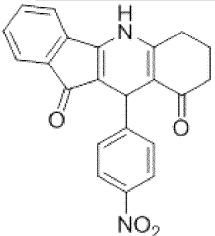
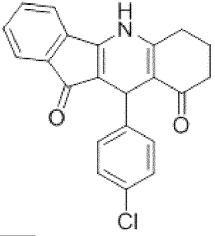
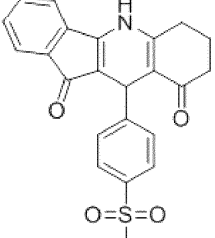
53 (группа I)		ND	IA, 1,8; кратность уменьшения 3,4
19 (группа II)		1,0, 2,0, 1,6	Антагонист или аллостерический модулятор
20 (группа II)		0,5, 1,0, 5,0	Антагонист или аллостерический модулятор
21 (группа III)		2,7, 0,5, >0,5	Антагонист или аллостерический модулятор

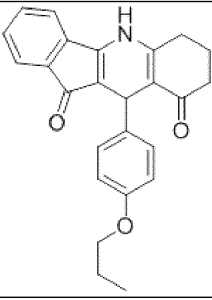
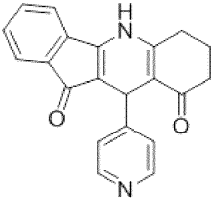
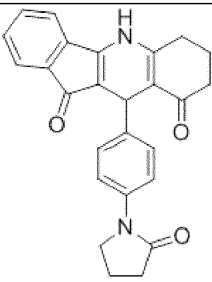
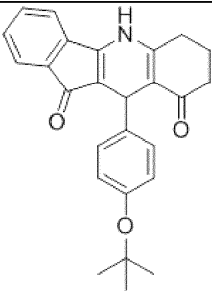


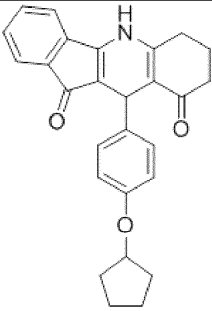
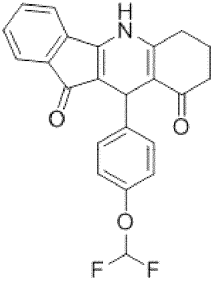
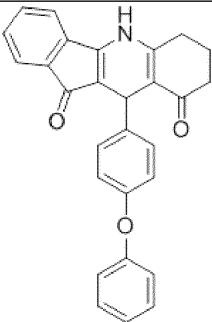
22 (группа IV)		6,7, 5,3	IA, 1,0, 1,5; кратность уменьшения 10,2
23 (группа IV)		>10, 2,9	IA, 0,4, 0,9, 1,2, 1,0; кратность уменьшения 14,1
24 (группа IV)		ND	IA, 4,4; кратность уменьшения 2,8
25 (группа IV)		ND	IA, 4,6, кратность уменьшения 4,2
26 (группа IV)		ND	IA, 3,6, кратность уменьшения 1,7
27 (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

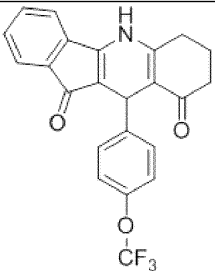
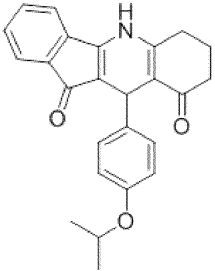
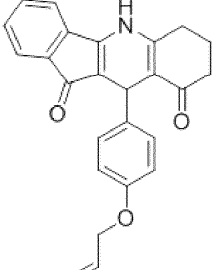
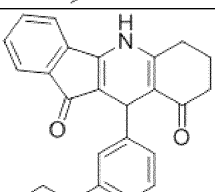
30 (группа IV)		ND	IA, 3,8, кратность уменьшения 2,2
31 (группа IV)		ND	IA, 1,2, кратность уменьшения 8,9
32 (группа IV)		ND	IA, 2,5, кратность уменьшения 3,9

33 (группа IV)		ND	IA, 4,4, кратность уменьшения 9,2
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
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
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
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
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
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  $EC_{50}$ , следует отметить, что для всех соединений, включенных в табл. 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 "немодулятор". 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 табл. 1) можно получать в соответствии со способами, известными в данной области с использованием общепринятых исходных материалов. Иллюстративные синтезы представлены в настоящем описании.

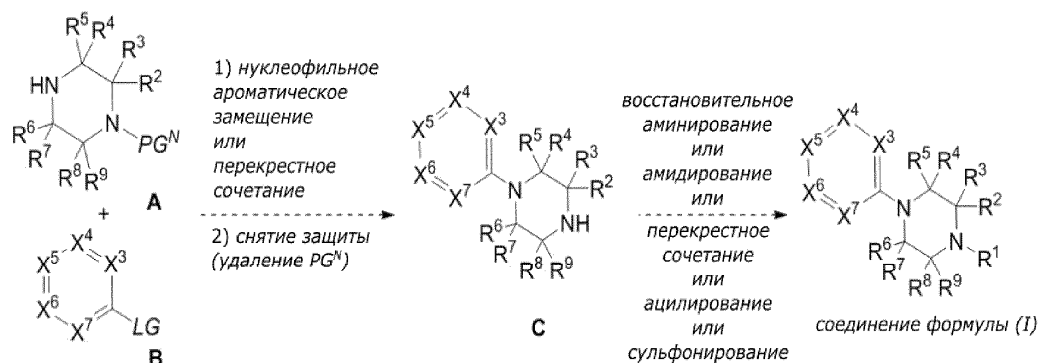
Соединения формулы (I) можно получать в соответствии со способами, известными в данной области. Как показано на схеме 1A, производное пиперазина А и электрофил В можно подвергать реакции перекрестного сочетания или реакции нуклеофильного ароматического замещения (например, когда один или оба из  $X^3$  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 С-N (например, сочетания Бухвальда-Хартвига или сочетания Ульмана), реакции перекрестного сочетания С-О и т.д. Типичные реакции перекрестного сочетания состоят из реакции между электрофилом (например, соединением В) и нуклеофилом (например, соединением А) в присутствии каталитических количеств соли металла, например, соли палладия, меди, железа или никеля (например, PdCl<sub>2</sub>, Pd(OAc)<sub>2</sub>,

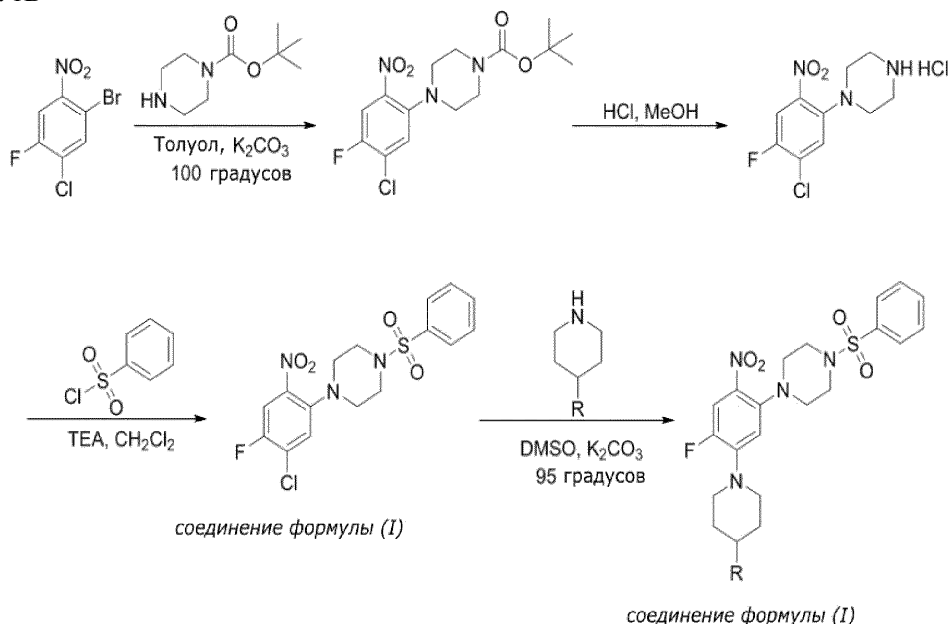
CuBr, CuI, комплекса (CuOTf)<sub>2</sub>-толуола, Fe(OTf)<sub>3</sub>, FeCl<sub>3</sub>, FeBr<sub>3</sub>, NiCl<sub>2</sub> или NiBr<sub>2</sub>). Необязательные лиганды, например, фосфин (например, PPh<sub>3</sub>, P(2-фурил)<sub>3</sub>, P(t-Bu)<sub>3</sub>, dppf, dppb или BINAP), N-гетероциклический 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<sub>3</sub>)<sub>4</sub> или (dppf)PdCl<sub>2</sub>, 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. Set, 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<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 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, 15<sup>th</sup> 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<sup>N</sup>) для получения С, который можно далее функционализировать для включения R<sup>1</sup>, который не представляет собой H, посредством восстановительного аминирования, амидирования, перекрестного сочетания, ацилирования или сульфирования. Типичные условия амидирования включают использование реагентов, таких как EDC/DMAP, НА-TU/НОАт или НВТУ/НОАт. Специалисту в данной области известны условия восстановительного аминирования состояния и подходящие источники гидрида (например, NaBH(OAc)<sub>3</sub> или NaBH<sub>3</sub>CN). 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 1В.

Схема 1А



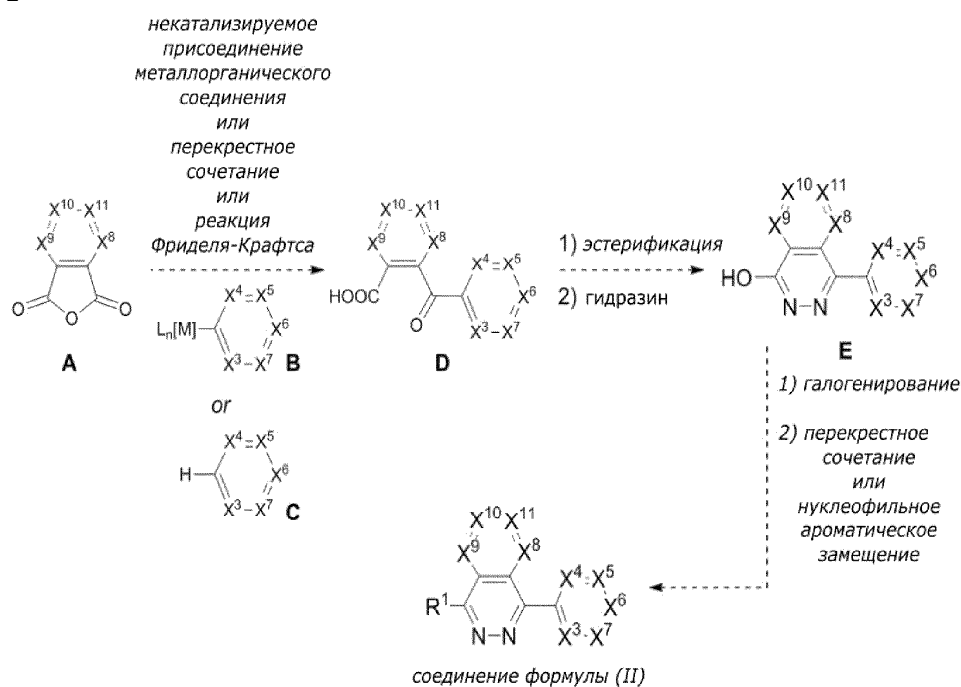
LG = галид или псевдогалид (например, фосфат, OTf, ONf, OTs или OMs)  
 PG<sup>N</sup> = N-защитная группа

Схема 1В



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 [M] 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 [M] 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,  $AlCl_3$  или  $BF_3$ )). 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,  $K_2CO_3$ ) и электрофила (например,  $Me_2SO_4$ ) в полярном апротонном растворителе (например, ацетоне). Неограничивающий пример условий реакции для образования фталазина из сложного эфира о-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

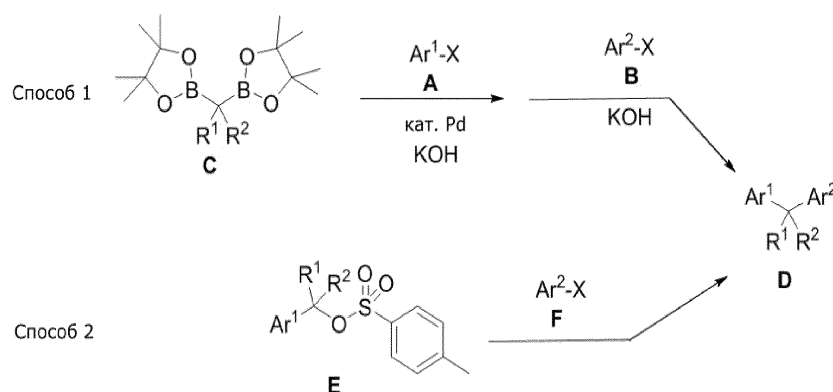


[M] = Li, Mg, Zn, Cu, Sn, Si или B (в зависимости от паттерна замещения реактантов)  
L<sub>n</sub> = вспомогательные лиганды

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.

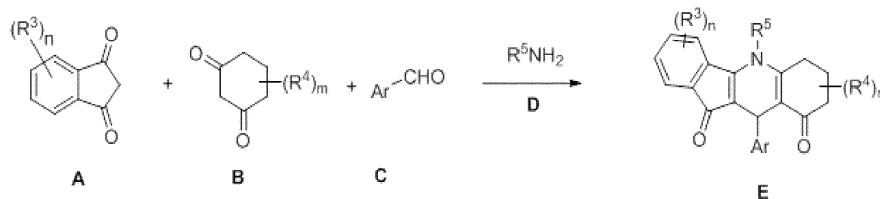
Схема 3



Соединения формулы (IV) можно получать в соответствии со способами, известными в данной области. Например, как показано на схеме 4, соединение A и соединение B можно подвергать реакции с ариальдегидом C и амином D в подходящих условиях для получения соединения E (соединение формулы (IV)). Неограничивающие примеры условий реакций, который можно использовать в синтезе соединения E, 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, amino, 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 адаптации, 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 перевести 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, гидроксида 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 гидроксида 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 сульфоноксигруппы (например, алкилсульфонилокси, например, трифторметилсульфонилокси, или арилсульфонил, например, p-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 об-

мену галоген-металл посредством обработки основанием (например, литиевым основанием, например, *n*-бутил- или *t*-бутиллитием) необязательно, при низкой температуре (например,  $-78^{\circ}\text{C}$ ) 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 аминозаместителей.

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 диметилсульфоксида 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  $-78^{\circ}\text{C}$ , 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, -ОН-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  $-78^{\circ}\text{C}$ , 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, хемиллюминесцентная 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  $^{125}\text{I}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  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 изолоуинол, 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<sub>2</sub>S), 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 подающуюся 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, мо-



дулирующее 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 табл. 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 меченным молекулярной меткой(метками), включающими радиоактивный изотоп, такой как  $^{125}\text{I}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$   $^{99\text{m}}\text{Tc}$ , или другую пригодную радиометрическую метку. В другом варианте осуществления, эталонное соединение является меченым флуоресцентной меткой, такой как 6-карбоксихлорофлуоресцеин (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 изолюминол, 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% конfluence и затем используют для получения цельных клеток, препаратов разрушенных клеток или препаратов мембраны клетки, которые затем замораживают при  $-80^\circ\text{C}$ . 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 мин до 2 ч) при подходящей температуре (т.е.  $\sim 20-37^\circ\text{C}$ ), 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 исключить. 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  $\text{IC}_{50}$  (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, анализам придают конфигурацию таким образом, что значения  $\text{IC}_{50}$  отражают константы диссоциации для ингибирующих молекул (например,  $\text{IC}_{50} = K_i(1 + [\text{эталонное соединение}]/K_D)$ , где  $[\text{эталонное соединение}] \ll K_D$ ). В случаях, когда конкурентное ингибирование является слабым, и значение  $\text{IC}_{50}$

невозможно получить, значения регистрируют как > наивысшей тестируемой концентрации. Соединения рассматривают как "активные конкурентные средства", когда % активности при наивысшей тестируемой концентрации является значимо меньшим ( $P \geq 95\%$ ,  $n=3$ ), чем 100% активность. В других случаях, таких как положительная аллостерическая модуляция, связывание можно характеризовать по EC50 (половине максимальных эффективных концентраций), превышающим связывание эталонного соединения отдельно из-за увеличенной аффинности и/или доступности участков связывания. В случаях, когда значения EC50 невозможно получить для положительных модуляторов, соединения рассматривают как "активные положительные модуляторы", когда % активности при наивысшей тестируемой 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 табл. 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 табл. 1) с GPR174; или

указанное соединение вызывает различие в модулирующей активности любого из эталонных соединений 1-59 (как указано в табл. 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 табл. 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  $^{125}\text{I}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{18}\text{F}$  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 табл. 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 (PET).

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: (а) 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 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 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 структу-

ру 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.

Анализ 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 (необработанным 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 HEK293, 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 участка 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 Gi 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 экспрессии репортерного гена. Активацию Gi можно детектировать посредством репортерной системы CRE, если необходимо, посредством сначала инкубации клеток с флорсколином 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 меченного 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 мин. 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 GTPγS.

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 [<sup>35</sup>S]-GTPγS 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 Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> фосфатно-солевого буфера, и снимают скребком в 5 мл такого же буфера. Клетки осаждают посредством

центрифугирования (500 g, 5 мин), 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 мин для удаления ядер; и неразрушенных клеток.

Супернатант гомогената центрифугируют при 20000 g в течение 20 мин 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<sub>2</sub>, 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 мин при 30°C и затем помещают на лед. К каждому образцу, гуанозин 5'-0-(3[<sup>35</sup>S тио)трифосфат (NEN, 1200 Ки/ммоль; [<sup>35</sup>S]-GTPγS) добавляют до конечной концентрации 100-200 пМ. Образцы инкубируют при 30°C в течение дополнительных 30 мин, добавляют 1 мл 10 mM HEPES, pH 7,4, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 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<sub>2</sub>. Фильтры подсчитывают посредством жидкостной сцинтилляционной спектроскопии. Неспецифическое связывание [<sup>35</sup>S]-GTPγS 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/лунку в 96-луночных планшетах, специально разработанных для различения флуоресцентных сигналов, испускаемых из различных лунок на планшете. Клетки инкубируют в течение 60 мин при 37°C в модифицированном способе Дульбекко PBS, содержащем пируват и 1 г/л глюкозы с добавлением 1% эмбриональной бычьей сыворотки и индикаторного красителя для кальция, такого как Fluo-3<sup>TM</sup> AM, Fluo-4<sup>TM</sup> AM, Calcium Green<sup>TM</sup>-1 AM, или Oregon Green<sup>TM</sup> BAPTA-1 AM. Планшеты промывают один раз модифицированным способом Дульбекко PBS без 1% эмбриональной бычьей сыворотки и инкубируют в течение 10 мин 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 АТФ (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 [<sup>3</sup>H]-арахидоновой кислоты (Amersham Corp., 210 Ки/ммоль) в течение 2 ч 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 мин. 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% CO<sub>2</sub> в течение 24 ч. 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 с, и насос повторно запускают через 60 с 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 (сAMP) измеряют в клетках, трансфицированных экспрессирующим GPCR вектором. Экспрессирующие GPCR клетки подвергают воздействию соединений-кандидатов. Протоколы анализов сAMP 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 сAMP, включают: Hill et al., *Br. J. Pharmacol.* 161(6): 1266-1275, 2010; Smith et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.* 41(3):189-218, 1993; и Berrera 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 рассеивают в 96-луночные микропланшеты из микропланшетов FlashPlate® (покрытые твердым сцинтиллятором, с которым связана антисыворотка против сAMP). Для контроля, в некоторые лунки рассеивают клетки CHO дикого типа (нетрансфицированные). В другие лунки в планшете вводят различные количества стандартного раствора сAMP для использования в получении стандартной кривой.

Одно или несколько протестированных 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, сAMP позволяют накапливаться в клетках в течение точно 15 мин при комнатной температуре. Анализ останавливают посредством добавления буфера для лизиса, содержащего меченый сAMP, и планшет подсчитывают с использованием сцинтилляционного счетчика для 96-луночных микропланшетов Packard Topcount®. Немеченый сAMP из лизированных клеток (или из стандартов) и фиксированные количества сAMP конкурируют за связывание с антителом, связанным с планшетом. Конструируют стандартную кривую, и значения сAMP для неизвестных точек получают посредством интерполяции. Изменения внутриклеточных уровней сAMP клеток в ответ на воздействие тестируемого соединения являются показательными для активности ингибирования или активации GPCR. Можно использовать другие анализы для детекции уровней сAMP, например, детекции меченого сAMP.

Кроме того, множество других наборов для измерения уровней сAMP являются коммерчески доступными, например, набор для детекции сAMP посредством прямого иммуноанализа от Abscam (кат. №

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 Abscam (кат. № 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- $\gamma$  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 LEG-ENDDplex™ от BioLegend позволяет одновременное измерение IL-2, L-4, IL-5, IL-6, L-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17A, L-17F, IL-21, IL-22, GM-CSF, IFN- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ . Альтернативно, эти цитокины можно также детектировать в супернатантах с использованием платформы MSD (MesoScale).

Можно также определять внутриклеточные уровни цитокинов. Например, моноклеарные 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- $\gamma$  и TNF- $\alpha$ . 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- $\gamma$ , 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- $\gamma$ , TNF, GM-CSF, IL-6, IL-12, IL-17A и IL-10. В некоторых вариантах осуществления, уровень одного или нескольких из IL-2, IFN- $\gamma$ , 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 по меньшей мере с 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 PBMC, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, уровень IFN- $\gamma$  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 и/или ингибитора CD73, по сравнению с популяцией PBMC, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, уровень TNF- $\alpha$  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 и/или ингибитора CD73, 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

PBMS, не подвергнутой воздействию низкомолекулярного ингибитора передачи сигналов GPR174. В некоторых вариантах осуществления, цитокин или цитокины выбраны из группы, состоящей из: IL-4, L-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- $\gamma$ , 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- $\gamma$  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- $\alpha$  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, L-5, L-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  $\beta$ -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 многочис-

ленные варианты обоих анализов, включая некоторые, которые являются коммерчески доступными. Например, Discoverx предоставляет анализы как привлечения  $\beta$ -аррестина, так и интернализации рецептора, и ThermoFisher Scientific и Molecular Devices поставляют анализ GPCR Tango и технологию TransFluor, соответственно, для количественной оценки привлечения  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\beta$ -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 реакционно-способные 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 эпимерные 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,  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{31}\text{P}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{18}\text{F}$  и  $^{36}\text{Cl}$ ). Меченные изотопами соединения можно получать посредством синтеза соединения с использованием легко доступного реагента для мечения изотопами вме-

сто 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- $\gamma$ , 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, неходжжкинской 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 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, остро 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 паразитовидной 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, адренокортикальной карциномы, астроцитарных опухолей, базальноклеточной карциномы, хондросаркомы, саркомы Юинга, рака желчного пузыря, гипоглоттичной 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 адаптивная Т-клеточная терапия. Ингибиторы контрольных точек являются эффективными только у незначительной части пациентов, и высокие уровни образующих аденозин молекул наблюдали у неответствующих 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, внутримышечного, внутримышечного введения, инфузии, инфильтрации, орошения, внутрисуставного введения, ингаляции, подкожного, местного, ректального, вагинального, кожного, назального, чрескожного или глазного введения и т.п. Для введения посредством инъекции и/или инфильтрации, или инфузии, композиции или составы по настоящему изобретению можно суспендировать или растворять, как известно в данной области, в носителе, пригодном для инъекции и/или инфильтрации, 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 капель, 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 серии 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-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), 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 адъюванты 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: димиристоилфосфатидилхоллин (DPMC), дипальмитоилфосфатидилхоллин (DPPC) и дистеароилфосфатидилхоллин (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 пред-

ставлять 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 № 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 № 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 табл. 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 неорфантными 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, общепотребительного для идентификации соединений, взаимодействующих с неорфантными GPCR при передаче сигналов посредством  $Ca^{++}$ . Три неорфантных 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 ис-

следований обобщен в табл. 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 фиг. 2, зарегистрированные активности соединений имеют такой же порядок ранжирования, что и порядок ранжирования концентрации, при которой флуоресцентный сигнал наблюдают в CRA. Как показано на фиг. 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 (фиг. 5B).

#### Пример 2.

Анализ 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 Gαs белков G стимулирует активность AC, в то время как члены Gαi1-3, Gαo и Gαz семейства Gαi 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 Gαs GPCR, увеличение уровней cAMP, как правило, измеряют через 15-60 мин после стимуляции агонистом (Williams, Nat. Rev. Drug. Discov. 3:125-35, 2004). Для измерения ингибирования AC посредством семейства Gαi белков G, клетки, как правило, обрабатывают форсколином, неспецифическим активатором AC, для увеличения уровней внутриклеточного cAMP. Активность семейства Gαi белков G определяют посредством измерения уменьшения уровней cAMP стимулированных форсколином клеток (Wang et al., Assay Drug. Dev. Technol. 9:522-31, 2011).

Семейство Gαq белков G (Gαq, Gα11, Gα14 и Gα15/16), активирует β изоформы фосфолипазы C (PLCP) для образования вторичных мессенджеров DAG и IP<sub>3</sub>. IP<sub>3</sub> является растворимым и диффундирует через цитоплазму и взаимодействует с рецепторами IP<sub>3</sub> 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<sub>3</sub> и кальция. Анализы для измерения накопления инозитолфосфата, как правило, детектируют инозитолмонофосфат (IP<sub>1</sub>), поскольку IP<sub>3</sub> и IP<sub>2</sub> 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 Gαq 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<sup>2+</sup> 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 (Gα12 и Gα13) 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 Gα12/13 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 Gαs и Gαi, стимуляцию PLC-β посредством Gαq и активацию RhoA киназы посредством Gα12/13, каскад передачи сигналов активированной митогеном протеинкиназы (MARK) активируется посредством белков G (Siehler, Biotechnology 3:471-83, 2008 и ссылки в этом документе). Активация каскада передачи сигналов MARK может происходить через Gαq посред-

вом опосредованной  $\text{Ca}^{2+}$  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  $\text{G}\alpha\text{q}$  каскада передачи сигналов MaRK, субъединицы  $\beta\gamma$ , высвобожденные из сопряженных с Gi GPCR, активируют либо рецепторные тирозинкиназы (RTK), либо нерецепторные тирозинкиназы (Src), что приводит к активации каскада Ras и MARK (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 пути(пути) 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, нейротрансмиттеры 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 с AMP. 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 (табл. 3). Алгоритм также показан схематически на фиг. 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 IP<sub>3</sub>. DAG и IP<sub>3</sub> 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 Т-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 MaRK, RhoA и пути передачи сигналов Gs. Репортерные конструкции для путей передачи сигналов MaRK, 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 (табл. 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 Gαq заменены на последние пять аминокислот из либо Gαi, либо Gαo для формирования химерных белков G с Gq15 или Gqo5 (Coward et al., *Anal. Biochem.* 270:242-8, 1999; Molecular Devices, CA). Химерные белки G с Gq15 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 Gαq. Подобным образом, получены химерные белки G для Gs, в которых последние тринадцать карбокси-концевых аминокислот Gαs заменены на последние тринадцать карбокси-концевых аминокислот любого из Gαt, Gαi, Gαo или Gαz для формирования химерных белков G Gαs-t, Gαs-i, Gαs-o и Gαs-z. Химерные белки G Gαs-t, Gαs-i, Gαs-o и Gαs-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 Gαs. 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 Gα15 и Gα16 сопрягают широкое множество GPCR с PLCβ (Offermanns et al., *J. Biol. Chem.* 270:15175-80, 1995). Gα15/16, 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 MARK посредством субъе-

диниц  $\beta\gamma$ , авторы настоящего изобретения не наблюдают активации зависимой от MARK репортерной конструкции SRE-Luc или любой из репортерных конструкций после активации Gi посредством GPCR (табл. 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  $G\alpha 16$ , репортерные конструкции CRE, SRE, NFAT, AP1 и SRF стимулируют посредством активации PLC $\beta$  посредством химерных белков G с Gq или  $G\alpha 16$  (табл. 3).

Семейство G12/13 белков G ( $G\alpha 12$  и  $G\alpha 13$ ) 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  $G\alpha 12/13$  передачи сигналов посредством GPCR (табл. 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 прогнозированного исходного сигнала, посредством сверхэкспрессированного GPCR, и таким образом, подтверждать профиль передачи сигналов GPCR, первоначально прогнозированный, 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,  $\beta$ -2-адренергический (ADBR2) GPCR и несколько соединений, взаимодействующих с этим рецептором, чтобы проиллюстрировать ожидаемые эффекты на передачу сигналов (фиг. 4A).

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  $\beta$ -2-адренергический (ADBR2) GPCR, класса A, стимулирует активность аденилатциклазы посредством активации пути передачи сигналов Gs (Wenzel-Seifert, K. et al., *Biochem Pharmacol.* 64: 9-20 (2002)). Соединение (IC118551), 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 TK-renilla в качестве внутреннего контроля (0,3 нг) (Promega) с липофектамино 2000 (2 мкг) (Invitrogen, CA), в соответствии с инструкциями производителя. Смесь ДНК/липофектамина 2000 (100 мкл) инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин 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 ч 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. Буфер для лизиса (100 мкл) добавляли к клеткам и инкубировали при комнатной температуре в течение 20-30 мин 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).

Анализ соединений.

Анализ соединений проводили посредством временной трансфекции конструкции ADBR2 pCMV6-XL4-ADBR2 (SC107904, Origene, MD), pNFAT-Luc, pGL4.30 или pGL4.29 (3000 нг), и TK-renilla в качестве внутреннего контроля (10 нг; Promega) с липофектамино 2000 (60 мкг) (Invitrogen, CA), в соответствии с инструкциями производителя. Смесь ДНК/липофектамина 2000 (3000 мкл) инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин 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 ч 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 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. 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 мин, 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).

Сверхэкспрессия ADBR2 в анализе репортера приводила к сильной стимуляции репортер CRE-Luc от Stratagene (pGL4.29), как ожидали (фиг. 4B). Однако, репортеры NFAT-Luc также были стимулированы, хотя и до меньшей степени (фиг. 4C). Когда соединение ICI 118551, как известно, действующее как обратный агонист на ADBR2, добавляли к клеткам, трансфицированным ADBR2 и CRE-Luc, определили, что ICI118551 специфически ингибировало активность ADBR2 с использованием репортера CRE-Luc, по сравнению с неспецифическим контрольным соединением (пирензепином), как показано на фиг. 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 (фиг. 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 фиг. 3.

Анализ репортеров проводили посредством временной трансфекции увеличивающимися количе-

ствами 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 TK-renilla в качестве внутреннего контроля (0,3 нг, (Promega) с липофектамином 2000 (2 мкг, Invitrogen CA), в соответствии с инструкциями производителя. Смесь ДНК/липофектамина 2000 (100 мкл) инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин 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 ч 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 мин, 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).

Сверхэкспрессия GPR174 сильно активировала две репортерные конструкции Cre-luc (табл. 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 G<sub>as</sub>-t, G<sub>as</sub>-i, G<sub>as</sub>-o или G<sub>as</sub>-z, pCRE-Luc или pGL4.29 (100 нг) и TK-renilla в качестве внутреннего контроля (0,3 нг) с липофектамином 2000 (2 мкг) (Invitrogen, CA), в соответствии с спецификациями производителя.

Смесь ДНК/липофектамина 2000 (100 мкл) инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин 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 мин, 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 TK-renilla в качестве внутреннего контроля (0,3 нг, Promega) с липофектамином 2000 (2 мкг) (Invitrogen, CA), в соответствии с инструкциями производителя. Смесь ДНК/липофектамина 2000 (100 мкл) инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин 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 мин чтобы позволить лизис клеток. В лизате (10 мкл) измеряли активность люциферазы и renilla с ис-



пользованием 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 табл. 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, Gαs-t, Gαs-i, Gαs-o или Gαs-z дополнительно не активировало репортер Cre, по сравнению с отсутствием химерного с Gs G белка (табл. 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 Gqi5, либо Gqo5

GPR174 (нг ДНК)	AP1-Gqi5	AP1-Gqo5	AP1-контроль	NFAT-Gqi5	NFAT-Gqo5	NFAT-контроль	Sre-Gqi5	Sre-Gqo5	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.

Анализ репортеров, описанных выше, в примере 3 показывает, что GPR174 стимулирует путь передачи сигналов Gs. Репрезентативные соединения из каждой из химических групп I-VI (показанных в табл. 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-*genilla* в качестве внутреннего контроля (10 нг) с липофектамом 2000 (60 мкг) (Invitrogen, CA), в соответствии с инструкциями производителя.

Смесь ДНК/липофектамина 2000 (3000 мкл) инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин 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 ч 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 *genilla* 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 мин, 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).

Каждое из соединений 1-59 взаимодействующих с GPR174, как показано в табл. 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 табл. 1, представлены в табл. 1 (значения

ЕС50 и кратность эффекта). Как показано в табл. 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 фиг. 6-20.

Как показано на фиг. 6A, соединение 1 (группа I) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174, но не ингибировало путь Gs в присутствии ADBR2 (фиг. 6B), показывая, что соединение 1 представляет собой специфический обратный агонист GPR174.

Как показано на фиг. 7A, соединение 2 (группа I) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174, но не ингибировало путь Gs в присутствии ADBR2 (фиг. 7B), показывая, что соединение 2 представляет собой специфический обратный агонист GPR174.

Как показано на фиг. 5A и в табл. 1, для соединения 4 показана кривая зависимости ответа от дозы против GPR174 в анализе CRA. Как показано на фиг. 8A, соединение 4 (группа I) не модулировало путь Gs в присутствии GPR174 и не модулировало путь Gs в присутствии ADBR2 (фиг. 8B), таким образом соединение 4 охарактеризовано как антагонист GPR174.

Как показано на фиг. 9A, соединение 6 (группа I) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174, но не ингибировало путь Gs в присутствии ADBR2 (фиг. 9B), показывая, что соединение 6 представляет собой специфический обратный агонист GPR174.

Как показано на фиг. 10A, соединение 7 (группа I) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174, но не ингибировало путь Gs в присутствии ADBR2 (фиг. 10B), показывая, что соединение 7 представляет собой специфический обратный агонист GPR174.

Как показано на фиг. 11A, соединение 10 (группа I) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174, но не ингибировало путь Gs в присутствии ADBR2 (фиг. 11B), показывая, что соединение 10 представляет собой специфический обратный агонист GPR174.

Как показано на фиг. 12A, соединение 11 (группа I) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174 но не ингибировало путь Gs в присутствии ADBR2 (фиг. 12B), показывая, что соединение 11 представляет собой специфический обратный агонист GPR174.

Как показано в табл. 1, соединение 19 имеет активность в анализе CRA. Как показано на фиг. 13A, соединение 19 (группа II) не модулировало путь Gs в присутствии GPR174 и не модулировало путь Gs в присутствии ADBR2 (фиг. 13B), таким образом, соединение 19 охарактеризовано как антагонист или аллостерический модулятор GPR174.

Как показано в табл. 1, соединение 21 имеет активность в анализе CRA. Как показано на фиг. 14A, соединение 21 (группа III) не модулировало путь Gs в присутствии GPR174 и не модулировало путь Gs в присутствии ADBR2 (фиг. 14B), таким образом, соединение 21 охарактеризовано как антагонист или аллостерический модулятор GPR174.

Как показано на фиг. 15A, соединение 22 (группа IV) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174, но не ингибировало путь Gs в присутствии ADBR2 (фиг. 15B), показывая, что соединение 22 представляет собой специфический обратный агонист GPR174.

Как показано на фиг. 16A, соединение 23 (группа IV) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174, но не ингибировало путь Gs в присутствии ADBR2 (фиг. 16B), показывая, что соединение 23 представляет собой специфический обратный агонист GPR174.

Как показано на фиг. 17A, соединение 31 (группа IV) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174, но не ингибировало путь Gs в присутствии ADBR2 (фиг. 17B), показывая, что соединение 31 представляет собой специфический обратный агонист GPR174.

Как показано на фиг. 18A, соединение 33 (группа IV) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174, но не ингибировало путь Gs в присутствии ADBR2 (фиг. 18B), показывая, что соединение 33 представляет собой специфический обратный агонист GPR174.

Как показано на фиг. 19A, соединение 36 (группа IV) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174, но не ингибировало путь Gs в присутствии ADBR2 (фиг. 19B), показывая, что соединение 36 представляет собой специфический обратный агонист GPR174.

Как показано на фиг. 20A, соединение 42 (группа IV) ингибировало путь Gs в присутствии GPR174, но не ингибировало путь Gs в присутствии ADBR2 (фиг. 20B), 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 липофектамино 2000 (60 мкг) (Invitrogen, CA), в соответствии с инструкциями производителя. Смесь ДНК/липофектамина 2000 (3000 мкл) инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин 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 ч 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 соединения, считывали немедленно после добавления соединения и в различные моменты времени, вплоть до 30 мин 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 фиг. 21A, соединение 4 не модулирует путь Gs в присутствии GPR174, но конкурирует с агонистом GPR174 LysoPS. Как показано на фиг. 21B, 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 закупают 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. Фиг. 22 графически иллюстрирует относительное содержание транскрипта GPR174 в тканях человека, как измерено посредством qПЦР. Как показано на фиг. 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<sup>+</sup> Т-клетки и CD8<sup>+</sup> Т-клетки человека закупают из Astarte Biologies. 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. Фиг. 23 графически иллюстрирует относительное содержание транскрипта GPR174 в лимфоидных клетках человека, как измерено посредством qПЦР. Как показано на фиг. 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<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup>) 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 103:6659-6664, 2006, содержание которого приведено в настоящем описании в качестве

ссылки.

В кратком описании, РВМС человека, полученные от донора-добровольца, доводили до плотности  $2 \times 10^6$  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 табл. 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 (nT-рег) клеток (FoxP3<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup>), РВМС 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- $\gamma$  в РВМС человека определяли следующим образом. РВМС от одного донора доводили до плотности  $2 \times 10^6$  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- $\gamma$  определяли посредством анализа ELISA с использованием наборов для ELISA Ready-SET-Go от Affimetrix Ebioscience, в соответствии с инструкциями производителя.

Фиг. 24А графически иллюстрирует процент FoxP3<sup>+</sup>Helios<sup>-</sup> клеток в CD4<sup>+</sup> 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). Фиг. 24В графически иллюстрирует процент FoxP3<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup> клеток в CD4<sup>+</sup> 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 фиг. 24А, обратный агонист GPR174 соединение 10 значительно увеличивало долю обычных (FoxP3<sup>+</sup>Helios<sup>-</sup>) Т-клеток; в то время как на сутки 7, соединение 10 значительно уменьшало содержание дважды положительных (FoxP3<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup>) nT-рег клеток (фиг. 24В).

Фиг. 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, 3 или 10 мкМ). Фиг. 26 графически иллюстрирует количество IFN- $\gamma$  в культуральных супернатантах (кратность по сравнению с уровнями для носителя) на сутки 2 после стимуляции в культурах РВМС, обработанных носителем или соединением 10 (1, 3 или 10 мкМ). Как показано на фиг. 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 фиг. 26, соединение 10 увеличивало количество интерферона гамма (IFN- $\gamma$ ) 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<sup>+</sup>Helios<sup>-</sup>) Т-клетках, с образованием FoxP3<sup>+</sup> Helios<sup>+</sup> популяции на сутки 3, которая уменьшается или отсутствует на сутки 7. В отличие от этого, предсуществующая естественная Т-рег (nT-рег) популяция, определенная как FoxP3<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup>, персистирует в течение этих временных рамок и все еще представляет 1-5% CD4<sup>+</sup> Т-клеток на сутки 7. Поскольку nT-рег клетки не подвергаются пролиферации так быстро, как обычные Т-клетки, после активации Т-клетки, относительное содержание nT-рег может уменьшаться в течение этих временных рамок, в зависимости от силы стимуляции Т-клетки.

Как показано на фиг. 24А, обратный агонист GPR174 соединение 10 значительно увеличивало долю обычных (FoxP3<sup>+</sup>Helios<sup>-</sup>) Т-клеток; в то время как на сутки 7, соединение 10 значительно уменьшало содержание дважды положительных (FoxP3<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup>) nT-рег клетки (фиг. 24В). Эти результаты показывают, что в РВМС человека, ингибирование GPR174 усиливает активацию иммунной системы, в то время как уменьшает также содержание nT-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 значительно 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 фиг. 25, соединение 10 увеличивало уровни IL-2 зависимым от дозы образом и при концентрации, настолько низкой, как 1 мкМ. Подобным образом, как показано на фиг. 26, соединение 10 увеличивало интерферон гамма (IFN- $\gamma$ ) 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- $\beta$  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, меланома, 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 (KO) 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 селезенки индивидуальных мышей осаждали посредством центрифугирования, ресуспендировали в буфере для лизиса RBC для удаления эритроцитов, снова осаждали центрифугированием и ресуспендировали в среде для Т-клеток (RPMI-1640, 10% FBS, 6 мМ L-глутамин, 12,5 мМ HEPES, 50 мкМ 2-меркаптоэтанол, пен./стреп.). Таким образом, подготовленные спленоциты рассеивали в 96-луночные планшеты при плотности  $3 \times 10^6$  клеток/мл, 250 мкл/луночку 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 ч в супернатантах клеток анализировали уровни цитокина с использованием набора для детекции Th-цитокинов мыши LEGENDplex (BioLegend). Анализировали четыре селезенки GPR174 KO и четыре селезенки WT, каждая в трех репликах.

Фиг. 27 графически иллюстрирует количество IL-2 (пг/мл) в культуральных супернатантах через 48 ч после стимуляции в культурах спленоцитов от мышей WT или GPR174 KO, обработанных носителем или соединением 10 (10 мкМ). Как показано на фиг. 27, уровень IL-2 увеличен посредством обработки ингибирующим GPR174 соединением 10 в спленоцитах WT, но не GPR174 KO, где IL-2 является высо-

ким без обработки. Значение  $p$  для различия между КО и WT в обработанных носителем спленocyтocyтах составляет  $p=0,02$ . Не присутствует значимого различия между КО и WT в обработанной соединением 10 группе, или между обработанными соединением 10 клетками и обработанными носителем клетками КО.

Эти результаты показывают, что эффект соединения 10 на продукцию IL-2 (описанный в примере 6 и показанный на фиг. 25) опосредован ингибированием GPR174.

Пример 8.

Этот пример показывает, что репрезентативное ингибирующее GPR174 соединение 10 уменьшает долю иммуносупрессивных T-рег (FoxP3<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup>) 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, доводили до плотности  $2 \times 10^6$  клеток/мл, стимулировали с использованием 100 нг/мл антитела против CD3 и 100 нг/мл антитела против CD28, и обрабатывали с использованием 3, 10 или 30 мкМ обратного агониста GPR174 соединения 10 (показанного в табл. 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 T-рег (nT-рег) клеток (FoxP3<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup>), 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 три раза.

Эффект соединения 10 на продукцию IL-2 в PBMC человека определяли следующим образом. PBMC от одного донора доводили до плотности  $2 \times 10^6$  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.

Фиг. 28 графически иллюстрирует процент FoxP3<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup> клеток в CD4<sup>+</sup> популяции клеток на сутки 7 после стимуляции в культурах PBMC, обработанных носителем или соединением 10 (3, 10 или 30 мкМ) ( $n=3$ , \* $p<0,05$ ; \*\* $p<0,01$ ). Как показано на фиг. 28, на сутки 7 после стимуляции, обратный агонист GPR174 соединение 10 значительно уменьшало содержание дважды положительных (FoxP3<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup>) nT-рег клеток зависимым от дозы образом, результат согласуется с результатами, описанными в примере 6.

Фиг. 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, 10, 30 или 60 мкМ). Как показано на фиг. 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 T-клеток для эффекторных T-клеток, T-клеток памяти и регуляторных T-клеток.

Пример 9.

В этом примере описан анализ эффекта репрезентативного ингибирующего GPR174 соединения 10 на T-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 T-рег, IL-2 и другие цитокины анализировали в культивированных культурах PBMC полученных от множества доноров-добровольцев.

Кратко, PBMC человека, полученный от восьми доноров-добровольцев, доводили до плотности  $2 \times 10^6$  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 табл. 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<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup>), 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 доводили до плотности  $2 \times 10^6$  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 доводили до плотности  $2 \times 10^6$  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.

Фиг. 30 графически иллюстрирует долю от значения для носителя FoxP3<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup> клеток в CD4<sup>+</sup> популяции клеток на сутки 7 после стимуляции в культурах PBMC от восьми различных доноров, обработанных носителем или соединением 10 (30 мкМ). Как показано на фиг. 30, на сутки 7 после стимуляции, обратный агонист GPR174 соединение 10 значительно уменьшало содержание дважды положительных (FoxP3<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup>) Т-рег клеток в культурах PBMC от всех восьми доноров, результат согласуется с результатами, описанными в примерах 6 и 8.

Фиг. 31 графически иллюстрирует количество IL-2 (кратность по сравнению с носителем) в культуральных супернатантах на сутки 2 после стимуляции в культурах PBMC от восьми различных доноров, обработанных носителем или соединением 10 (30 мкМ). Как показано на фиг. 31, соединение 10 увеличивало уровни IL-2 в каждой из культур PBMC от восьми доноров, со средним приблизительно 5 раз, что согласуется с результатами, описанными в примерах 6 и 8.

Фиг. 32 графически иллюстрирует количество различных цитокинов (кратность по сравнению с носителем) в культуральных супернатантах на сутки 2 после стимуляции для PBMC человека, полученных от восьми доноров, обработанных носителем или соединением 10 (30 мкМ). Как показано на фиг. 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 фиг. 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 PBMC 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, значительно уменьшал популяцию Т-рег в каждой из культур PBMC человека от восьми различных доноров. Дополнительно показано в пулированных PBMC 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 активизирует 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, продуцируемые 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 табл. 7.

Таблица 7. Совместная культура спленоцитов C57BL/6+DBA1

цитокин	Сутки 2 (пг/мл)	Сутки 4 (пг/мл)	Сутки 6 (пг/мл)
IFN- $\gamma$	871	36030	8648
IL-5	18	18	20
TNF- $\alpha$	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 табл. 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- $\gamma$ , IL-5, TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6, IL-4, IL-10, IL-9, IL-17A, IL-17F, 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- $\gamma$ , IL-5, TNF- $\alpha$ , 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.

Фиг. 33 графически иллюстрирует кратность индукции посредством соединения 10 (30 мкМ) в панели цитокинов в совместно культивированных спленоцитах C57BL/6+DBA1 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. Эти результаты показывают, что соединение 10 вызывает сильное изменение количеств цитокинов, продуцированных в ходе аллогенной стимуляции спленоцитов, показывая, что ингибирование GPR174 значительно модулирует иммунный ответ. Отмечено, что кажущееся различие между группами цитокинов, индуцированных в PBMC человека (как описано в примере 9), по сравнению с спленоцитами 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 ч 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<sup>+</sup> и CD8<sup>+</sup> 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 ч 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- $\gamma$  (все антитела против цитокинов являлись APC-мечеными). Клетки анализировали посредством проточной цитометрии. Долю клеток с внутриклеточным IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-10 и TNF- $\alpha$  затем определяли в различных популяциях клеток.

Результаты первого эксперимента для одного из двух доноров показаны на фиг. 34А-34С. Сходные результаты наблюдали также для второго донора (данные не представлены).

На фиг. 34А показаны популяции CD4<sup>+</sup> (46,2%), CD8<sup>+</sup> (17,1%) и не-Т-клеток (33,9%), присутст-



вующие в репрезентативной культуре РВМС через четыре ч после стимуляции антителом против CD3 и антителом против CD28 в присутствии соединения 10 (10 мкМ).

Фиг. 34В графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием IL-2 в популяции CD4<sup>+</sup> Т-клеток, показанной на фиг. 34А, обработанной соединением 10 (10 мкМ), по сравнению с контрольным носителем; и

Фиг. 34С графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием IL-2 в популяции CD8<sup>+</sup> Т-клеток, показанной на фиг. 34А, обработанной соединением 10 (10 мкМ), по сравнению с контрольным носителем.

Результаты второго эксперимента для одного из двух доноров показаны на фиг. 35А-35М. Сходные результаты наблюдали также для второго донора (данные не представлены).

На фиг. 35А показаны популяции CD4<sup>+</sup> (31,8%), CD8<sup>+</sup> (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.

Фиг. 35В графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием IL-2 в популяции CD4<sup>+</sup> Т-клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0 или 3,0 мкМ), репрезентативные для которых показаны на фиг. 35А.

Фиг. 35С графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием IL-2 в популяции CD8<sup>+</sup> Т-клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0 или 3,0 мкМ), репрезентативные для которых показаны на фиг. 35А.

Фиг. 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 фиг. 35А.

Фиг. 35Е графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием IL-10 в популяции CD4<sup>+</sup> Т-клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0 или 3,0 мкМ), репрезентативные для которых показаны на фиг. 35А.

Фиг. 35F графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием IL-10 в популяциях CD8<sup>+</sup> Т-клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0 или 3,0 мкМ), репрезентативные для которых показаны на фиг. 35А; и

Фиг. 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 фиг. 35А.

Фиг. 35H графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием IFN-γ в популяции CD4<sup>+</sup> Т-клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0 или 3,0 мкМ), репрезентативные для которых показаны на фиг. 35А.

Фиг. 35I графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием IFN-γ в популяции CD8<sup>+</sup> Т-клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0 или 3,0 мкМ), репрезентативные для которых показаны на фиг. 35А.

Фиг. 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 фиг. 35А.

Фиг. 35K графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием TNF-α в популяции CD4<sup>+</sup> 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 фиг. 35А.

Фиг. 35L графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием TNF-α в популяции CD8<sup>+</sup> 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 фиг. 35А.

Фиг. 35M 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 фиг. 35А.

Результаты дополнительной характеристики экспрессии IFNγ и TNF-α в не-Т-клетках (из фиг. 35А, 35J и 35M) показаны на фиг. 36А-36Е. Эти результаты получены для одного донора. Сходные результаты наблюдали также для второго донора (данные не представлены).

На Фиг. 36А показана популяция не-Т-клеток из Фиг. 35А, сортированной на популяции CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> (2,27%), CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> (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.

Фиг. 36В графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием IFN-γ в популяциях Не-Т-CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0 или 3,0 мкМ), репрезентативные для которых показаны на фиг. 36А, и

фиг. 36С графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием IFN-γ в популяциях Не-Т-CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> клеток в культурах РВМС, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0 или

3,0 мкМ), репрезентативные для которых показаны на фиг. 36А.

Фиг. 36D графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием TNF- $\alpha$  в популяциях He-T-CD56<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> клеток в культурах PBMC, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 или 10 мкМ), репрезентативные для которых показаны на фиг. 36А, и

фиг. 36Е графически иллюстрирует долю клеток с внутриклеточным окрашиванием TNF- $\alpha$  в популяциях He-T-CD56<sup>+</sup>CD16<sup>-</sup> клеток в культурах PBMC, обработанных соединением 10 (0, 0,1, 0,3, 1,0, 3,0 или 10 мкМ), репрезентативные для которых показаны на фиг. 36А.

Результаты, показанные на фиг. 35А-М и фиг. 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- $\gamma$  и TNF- $\alpha$  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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> Т-клеток, узнающих этот антиген в комплексе с представляющими молекулами МНС класса I. Через пять суток, количество CD8<sup>+</sup> клеток, экспонирующих Т-клеточный рецептор (TCR), узнающий комплекс МНС-пептид вируса гриппа, оценивали посредством окрашивания спленоцитов с использованием антител против CD8 и декстримеров МНС-ASNENMETM (Immudex, Denmark). Флуоресцентно меченные декстримеры 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 декстримером без предшествующей инкубации *in vitro*.

Результаты первого эксперимента показаны на фиг. 37.

Фиг. 37 графически иллюстрирует количество окрашенных декстримером клеток (антигенспецифических Т-клеток) как процент от тотальных CD8<sup>+</sup> клеток в культурах спленоцитов, полученных от мышей WT и GPR174 КО 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 фиг. 37. Как показано на фиг. 37, культура спленоцитов от мышей GPR174 КО имеет более высокий процент окрашенных декстримером CD8<sup>+</sup> клеток (антигенспецифических Т-клеток) по сравнению с процентом окрашенных декстримером CD8<sup>+</sup> клеток в культурах спленоцитов, полученных от наивных мышей и мышей WT.

Результаты второго эксперимента показаны на фиг. 38. Фиг. 38 графически иллюстрирует количество окрашенных декстримером клеток (антигенспецифических Т-клеток) как процент от тотальных CD8<sup>+</sup> клеток в спленоцитах, полученных от мышей WT и GPR174 КО, 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 фиг. 38. Как показано на фиг. 38, спленоциты от мышей GPR174 КО имеют более высокий процент окрашенных декстримером CD8<sup>+</sup> клеток (антигенспецифических Т-

клеток) по сравнению с количеством окрашенных декстрамером CD8<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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 опухолям, и таким образом, предоставляет способ иммунотерапии для пациентов с злокачественными опухолями (см., например, Baumeister 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 (APC) 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 ч. Клетки анализировали посредством проточной цитометрии по экспрессии FOXP3, CTLA-4, CD4, CD3, CD45RA и CD25.

Фиг. 39А графически иллюстрирует долю наивных регуляторных Т-клеток (Т-рег) с положительным по CTLA-4 окрашиванием (процент от наивных Т-рег клеток (CD45RA+FOXP3<sup>+</sup>) 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.

Фиг. 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<sup>-</sup>) 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.

Фиг. 40А графически иллюстрирует долю Т-рег памяти с положительным по CTLA-4 окрашиванием (процент от Т-рег памяти (CD45RA-FOXP3<sup>+</sup>) 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.

Фиг. 40В графически иллюстрирует долю не-Т-рег клеток памяти с положительным по CTLA-4 окрашиванием (процент от не-Т-рег памяти (CD45RA-FOXP3<sup>-</sup>) 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 разра-

ботке 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.

T-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM (TIGIT) экспрессируется активированными цитотоксическими T-клетками и регуляторными T-клетками и, как показано также, подвергается повышающей регуляции на T-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 T-клетки, TIGIT может подпитывать иммуносупрессивное микроокружение посредством своего влияния на другие иммунocyты. Например, посредством связывания с CD155 на поверхности дендритных клеток, TIGIT увеличивает секрецию иммуносупрессивного цитокина интерлейкина-10, и привлечение TIGIT на регуляторных T-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 T-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 T-рег клетках. Кроме того, рестрицированная по T-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 T-клеток к иммунному ответу или в количестве T-рег и эффекторных T-клеток. Эти наблюдения позволяют предполагать новый "неиммунный" способ действия для внутриопухолевых T-рег и эффекторных T-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 (UCHT1), 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.

Фиг. 41 графически иллюстрирует долю CD4+ T-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+ T-клетках, обработанных соединением 10, зависимым от дозы образом, по сравнению с обработанными контрольным носителем клетками.

Фиг. 42 графически иллюстрирует долю CD8+ T-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+ T-клетках, обработанных соединением 10, зависимым от дозы образом, по сравнению с обработанными контрольным носителем клетками.

Фиг. 43 графически иллюстрирует долю CD4+ T-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 AREG экспрессия AREG уменьшена в CD4+ T-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 T-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 T-клетки против злокачественных клеток. Кроме того, продуцируемый T-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 2a (A2aR) приводит к синергической индукции продукции IFN- $\gamma$  в PBMC человека.

РВМС человека, полученные от добровольного донора-человека, распределяли при плотности  $1 \times 10^6$  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 ч после стимуляции, и уровни IFN- $\gamma$  определяли посредством анализа ELISA. Статистический анализ проводили с использованием однофакторного ANOVA с апостериорной коррекцией множественного сравнения Тьюки.

Фиг. 44 графически иллюстрирует количество IFN- $\gamma$  в культуральных супернатантах через 24 ч 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 фиг. 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 табл. 8 ниже, статистический анализ (однофакторного ANOVA с апостериорной коррекцией множественного сравнения Тьюки) показывает, что только комбинация ингибиторов приводила к значимому увеличению продукции IFN- $\gamma$ , по сравнению с каждым ингибитором отдельно или контрольным носителем.

Таблица 8. Статистический анализ результатов, показанных на фиг. 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 фиг. 44 и в табл. 8, показывают, что комбинированное ингибирование GPR174 и A2aR стимулирует синергическую индукцию продукции IFN- $\gamma$ . Поскольку IFN- $\gamma$  является центральным медиатором противоопухолевых иммунных ответов, этот результат показывает, что комбинированное ингибирование GPR174 и ингибирование A2aR значимо усиливает тип функции иммунocyта - 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 $\alpha$ S/циклического АМР, 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. табл. 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, иммунocyты 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 AMP 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 (Tуго3, Axl, MerTK), которые узнают PS в комплексе с сывороточными белками GAS6 или PROS1; белки TEM (молекулу, содержащую домен Т-клеточного иммуноглобулина и муцина), CD300, и BAI1, 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 Stoorvogel 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 являются 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 мкм с использованием миниэкструдера (Avanti). Лизофосфатидилсерин (Lyso-PS) является растворимым.

Клетки HEK293 выращивали в 6-луночных планшетах и трансфицировали с использованием липо-

фектамина 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 ч 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 ч при комнатной температуре и измеряли в люцинометре для получения значения до добавления соединения. Липосомы из фосфатидилсерина (PS) в диапазоне концентраций от 10 до 10000 нМ или лизофосфатидилсерина (Lyso-PS) в диапазоне концентраций от 10 до 10000 нМ добавляли в лунки и инкубировали в течение 15 мин при комнатной температуре. Планшеты измеряли в люцинометре для получения значения после добавления соединения. Определяли соотношение измерений после добавления соединения и до добавления соединения (т.е. степени индукции сигнала GloSensor посредством агониста).

Фиг. 45А графически иллюстрирует кратность индукции активности передачи сигналов Gs в клетках HEK293, трансфицированных экспрессирующей GPR174 дикого типа плазмидой и экспрессирующей биосенсор сAMP плазмидой pGlo22F, в присутствии увеличивающихся концентраций липосом из фосфатидилсерина (PS) или лизофосфатидилсерина (Lyso-PS). Как показано на фиг. 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).

Фиг. 45В графически иллюстрирует, с использованием увеличенного окна сигнала, по сравнению с фиг. 45А, кратность индукции активности передачи сигналов Gs в клетках HEK293, трансфицированных экспрессирующей мутант GPR174-v38 плазмидой и экспрессирующей биосенсор сAMP плазмидой pGlo22F в присутствии увеличивающихся концентраций липосом из фосфатидилсерина (PS) или лизофосфатидилсерина (Lyso-PS). Как показано на фиг. 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 мкм 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 фиг. 45, но вместо временной трансфекции, использовали пул клеток HEK293, стабильно трансфицированных с использованием GPR174 WT и биосенсора сAMP GloSensor.

Фиг. 46 графически иллюстрирует уровень активности передачи через GPR174 сигналов Gs в клетках HEK293, трансфицированных экспрессирующей GPR174 плазмидой и экспрессирующей биосенсор сAMP плазмидой pGlo22F (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 фиг. 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 фиг. 45, но вместо временной трансфекции, использовали пул клеток HEK293, стабильно трансфицированных либо GPR174 WT (для соединения 10, как показано на фиг. 47А) или GPR174-v38 для остальных тестируемых соединений, как показано на фиг. 47В-47Г) и биосенсором сAMP 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 мин инкубации. Соотношение люминесценции после добавления PS и предварительно считанного значения люминесценции использовали в качестве показателя опосредованной рецептором передачи сигналов.

Фиг. 47А графически иллюстрирует ингибирование индуцированной PS передачи через GPR174 сигналов Gs посредством ингибирующего GPR174 соединения 10 (группа I) зависимым от дозы образом, с кажущейся  $IC_{50}$  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.

Фиг. 47В 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.

Фиг. 47С 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.

Фиг. 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.

Фиг. 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.

Фиг. 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 фиг. 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 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 эффероцитоза (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 K562 посредством обработки в течение ночи с использованием 0,8 мМ  $H_2O_2$ . Присутствие высокого процента апоптотических клеток после обработки  $H_2O_2$  подтверждали посредством проточной цитометрии после окрашивания аннексина V (данные не представлены).

Клетки HEK293, 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  $10 \times 10^6$ /мл суспензии необработанных клеток K562, или клеток K562, обработанных в течение ночи с использованием 0,8 мМ  $H_2O_2$  или среды для клеток. Изменение люминесценции измеряли через 15 минут. Клетки HEK293, стабильно трансфицированные только экспрессирующей GloSensor плазмидой, не отвечали на апоптотические клетки (данные не представлены).

Фиг. 48А графически иллюстрирует соотношение люминесценции после добавления к предварительно считанной люминесценции для экспрессирующих GPR174 и GloSensor клеток HEK293, подвергнутых воздействию культуральной среды, или небоработанных (неапоптотических) клеток K562, или апоптотических клеток K562 (обработанных с использованием  $H_2O_2$  в течение 20 ч). Как показано на фиг. 48А, передача сигналов GPR174 в клетках HEK293, подвергнутых воздействию апоптотических клеток K562, являлась значимо более высокой, чем в клетках HEK293, подвергнутых воздействию необработанных клеток K562 ( $p < 10^{-4}$ ) или клетки HEK293, подвергнутых воздействию только среды.

Передача сигналов GPR174 в клетках HEK293 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 HEK293, 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  $10 \times 10^6$  клеток/мл суспензии свежeweделенных от донора нейтрофилов, или нейтрофилов, инкубированных в течение ночи с антителами против Fas или средой для клеток.

Фиг. 48В графически иллюстрирует соотношение люминесценции после добавления к предварительно считанной люминесценции для экспрессирующих GPR174 и GloSensor клеток HEK293, подвергнутых воздействию культуральной среды или свежeweделенных нейтрофилов, или апоптотических нейтрофилов (обработанных с использованием антитела против Fas). Как показано на фиг. 48В, передача сигналов GPR174 в клетках HEK293, подвергнутых воздействию апоптотических нейтрофилов, была значимо выше, чем в клетках HEK293, подвергнутых воздействию свежeweделенных нейтрофилов ( $p = 0,0006$ ) или клетках HEK293, подвергнутых воздействию только среды.

Передача сигналов GPR174 в клетках HEK293 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 HEK293, 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  $5 \times 10^8$  клеток/мл тромбоцитов (обозначено как "P1" на фиг. 48С) или супернатантов тромбоцитов (обозначено как "суп." на фиг. 48С).

Фиг. 48С графически иллюстрирует соотношение люминесценции после добавления к предварительно считанной люминесценции для экспрессирующих GPR174 и GloSensor клеток HEK293, подвергнутых воздействию культурального супернатанта (суп.) или тромбоцитов (P1). Как показано на фиг. 48С, передача сигналов GPR174 в клетках HEK293, подвергнутых воздействию активированных тромбоцитов, была значимо выше, чем в клетках HEK293, подвергнутых воздействию культуральных супернатантов ( $p = 0,03$ ) или клеток HEK293.

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 ускользнуть 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 2a (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 2a (A2aR) ZM-241385 приводила к синергической индукции продукции IFN- $\gamma$  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  $1 \times 10^6$  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, 0,6 или 2 мкМ);

ингибирующего GPR174 соединения 10 (2 мкМ) плюс ингибирующего A2aR соединения (SCH-58261, 0,2, 0,6 или 2 мкМ); или

контрольного носителя (DMSO).

Супернатанты из этих клеток собирали через 24 ч после стимуляции, и уровни IFN- $\gamma$ , IL-2 и TNF определяли посредством анализов ELISA.

Фиг. 49А графически иллюстрирует количество IFN- $\gamma$  (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 ч 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 фиг. 49А, и обобщено в табл. 9, более низкие концентрации ингибитора A2aR (0,2 мкМ и 0,6 мкМ SCH-58261) увеличивали уровни IFN- $\gamma$  менее чем в 2 раза, и ингибирующее GPR174 соединение 10 (2 мкМ) увеличивало уровни IFN- $\gamma$  в 4,9 раз. В отличие от этого, комбинация ингибиторов увеличивала уровни IFN- $\gamma$  в 11-12 раз, показывая синергическую активность между A2aR<sub>i</sub> и GPR174<sub>i</sub>, поскольку эти значения превышали сумму увеличений, полученных для каждого ингибитора отдельно.

Фиг. 49В графически иллюстрирует количество IL-2 (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 ч 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 фиг. 49В, и обобщено в табл. 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 A2aR<sub>i</sub> и GPR174<sub>i</sub>, поскольку эти значения превышали сумму увеличений, полученных для каждого ингибитора отдельно.

Фиг. 49С графически иллюстрирует количество TNF (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 ч 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 фиг. 49С и обобщено в табл. 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 фиг. 49A-C

		Носитель <sup>1</sup>	0,2 мкМ SCH <sup>1</sup>	0,6 мкМ SCH <sup>1</sup>	2 мкМ SCH <sup>1</sup>
IFN- $\gamma$	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*

Значения 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  $1 \times 10^6$  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 (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 ч после стимуляции, и уровни IFN- $\gamma$ , IL-2 и TNF определяли посредством анализов ELISA.

Фиг. 50A графически иллюстрирует количество IFN- $\gamma$  (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 ч 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 фиг. 50A, и обобщено в табл. 10, высокую степень индукции IFN- $\gamma$  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- $\gamma$  в 1,8 раз и 1,4 раз, соответственно. Соединение 10 отдельно индуцировало IFN- $\gamma$  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.

Фиг. 50B графически иллюстрирует количество IL-2 (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 ч 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 фиг. 50B и обобщено в табл. 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.

Фиг. 50C графически иллюстрирует количество TNF (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 ч 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 фиг. 50С и обобщено в табл. 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.

Фиг. 51А графически иллюстрирует количество IFN- $\gamma$  (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 ч 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 фиг. 51А и обобщено в табл. 10, значимую индукцию IFN- $\gamma$  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- $\gamma$  в 1,3 и 1,2 раз, соответственно. Соединение 10 отдельно индуцировало IFN- $\gamma$  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.

Фиг. 51В графически иллюстрирует количество of IL-2 (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 ч 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 фиг. 51В и обобщено в табл. 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.

Фиг. 51С графически иллюстрирует количество TNF (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 ч 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 фиг. 51С и обобщено в табл. 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 фиг. 50А-С и 51А-С

Донор	Цитокин		Носитель <sup>1</sup>	ZM <sup>1</sup>	PBF <sup>1</sup>
2	IFN- $\gamma$	носитель	1,0	1,8*	1,4*
2	IFN- $\gamma$	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- $\gamma$	носитель	1,0	1,2	0,9
3	IFN- $\gamma$	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*

Значения 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- $\gamma$  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- $\gamma$  с использованием трех ингибиторов A2aR: ZM-241385, SCH-58261 и PBF-509 в комбинации с ингибирующим GPR174 соединением 10, как показано на фиг. 49А, 50А и 51А. Во всех случаях, для ингибиторов A2aR показана более сильная индукция IFN- $\gamma$  в присутствии ингибирующего GPR174 соединения 10, и сходным образом, соединение 10 являлось наиболее эффективным при комбинации с ингибитором A2aR. Как дополнительно показано на фиг. 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 фиг. 49С, 50С и 51С, 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- $\gamma$ , 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 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. табл. 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 PBMC, выделенных от 12 здоровых доноров.

Уровень техники.

Как описано выше в примерах 15 и 18, синергическую индукцию IFN- $\gamma$  наблюдали в PBMC, 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- $\gamma$ , в которой всего 44 индивидуальных теста ZM-241385 и соединения 10 анализировали отдельно и вместе в PBMC, выделенных от 12 здоровых доноров.

Способы.

PBMC человека, полученные от двенадцати индивидуальных добровольных доноров-людей распределяли при плотности  $1 \times 10^6$  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, 2 мкМ);  
ингибирующего A2aR соединения (ZM-241385, 0,2, 1 мкМ);  
ингибирующего GPR174 соединения 10 (1, 2 мкМ) плюс ингибирующего A2aR соединения (ZM-241385, 0,2 мкМ, 1 мкМ); или контрольного носителя (DMSO).

Всего тестировали 44 эксперимента с использованием PBMC от 12 здоровых доноров (9 доноров для GM-CSF), где каждого донора тестировали в 1-8 отдельных экспериментах, в зависимости от донора (1-4 эксперимента 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 фиг. 52А-52Е. Процент доноров, для которых показана синергическая ак-

тивность 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.

Фиг. 52A графически иллюстрирует кратность изменения, по сравнению с носителем, для количества IFN- $\gamma$  в культуральных супернатантах через 24 ч 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 фиг. 52A и обобщено в табл. 11, высокую степень индукции IFN- $\gamma$  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- $\gamma$  в 2,1 раз. Самостоятельно, соединение 10 являлось немного более эффективным, чем ZM, со средней индукцией IFN- $\gamma$  в 2,8 раз ( $p=0,06$ ), как показано в табл. 11. Среди индивидуальных доноров, для 75% (9/12) показана синергическая индукция IFN- $\gamma$ , поскольку значения, полученные с использованием обоих ингибиторов, превышали сумму увеличений, полученных с использованием каждого ингибитора отдельно.

Фиг. 52B графически иллюстрирует кратность изменения, по сравнению с носителем, количества IL-2 в культуральных супернатантах через 24 ч 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 фиг. 52B и обобщено в табл. 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.

Фиг. 52C графически иллюстрирует кратность изменения, по сравнению с носителем, количества TNF в культуральных супернатантах через 24 ч 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 фиг. 52C и обобщено в табл. 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.

Фиг. 52D графически иллюстрирует кратность изменения, по сравнению с носителем, количества GM-CSF в культуральных супернатантах через 24 ч 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 фиг. 52D и обобщено в табл. 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 фиг. 52A-52D

	IFN- $\gamma$		IL-2		TNF		GM-CSF	
	FC <sup>1</sup>	P <sup>2</sup>	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

<sup>1</sup>Кратность изменения для указанного сравнения соединений.

<sup>2</sup>значение 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- $\gamma$  (в среднем в 2,1 и в 2,8 раз, соответственно), в то время как их комбинация вызывала среднюю индукцию IFN- $\gamma$  в 8,8 раз, лежащую в диапазоне вплоть до 25 раз, по сравнению с контрольным носителем (см. фиг. 52A). Для 75% доноров (9/12), количество IFN- $\gamma$ , индуцированное комбинированными ингибиторами, превышало сумму количеств IFN- $\gamma$ , индуцированных каждым ингибитором отдельно, показывая, что ингибитор GPR174 и ингибитор A2aR действовали синергически в одном и том же пути, регулирующем продукцию IFN- $\gamma$  в PBMC человека. Сходные синергические эффекты наблюдали для индукции IL-2 (фиг. 52B, 92% доноров), TNF (фиг. 52C, 67% доноров) и GM-CSF (фиг. 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, L-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. табл. 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 ре-

шили 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<sub>50</sub> определяли следующим образом: клетки HEK293 временно совместно трансфицировали экспрессирующими A2aR или A2bR конструкциями (Origene, MD), Сглюцифераза, и ТК-renilla в качестве внутреннего контроля (Promega) с использованием липофектамина 2000 (Invitrogen, CA), в соответствии с инструкциями производителя. Трансфицированные клетки инкубировали в течение 4-6 ч 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 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 мин 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). Результаты показаны в табл. 12 ниже.

Таблица 12. Специфичность различных ингибиторов A2aR и A2bR

	A2A (IC <sub>50</sub> нМ)	A2B (IC <sub>50</sub> 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<sup>6</sup> 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 табл. 13 ниже.

Супернатанты из этих клеток собирали через 24 ч после стимуляции, и уровни IFN-γ, IL-2 и TNF определяли с использованием платформы MSD (MesoScale Discovery).

Фиг. 53А графически иллюстрирует количество IFN-γ (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 ч 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 фиг. 53А и обобщено в табл. 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.



нации. Совместно, эти обнаружения показывают, что синергическая активность между ингибированием GPR174 и ингибированием A2aR/A2bR для продукции IFN- $\gamma$  в PBMC от донора 3 основана на ингибировании A2aR без вовлечения A2bR.

Фиг. 53B графически иллюстрирует количество IL-2 (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 ч 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 фиг. 53B и обобщено в табл. 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.

Фиг. 53C графически иллюстрирует количество TNF (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 ч 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 фиг. 53C и обобщено в табл. 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.

Фиг. 54A графически иллюстрирует количество IFN- $\gamma$  (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 ч 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 фиг. 54A и обобщено в табл. 13, наивысшую степень индукции IFN- $\gamma$  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 значимо не увеличивало уровни IFN- $\gamma$ . Подобным образом, ингибиторы A2aR и A2bR, и ADA самостоятельно не оказывали значимого эффекта. Умеренный эффект всех соединений на уровни IFN- $\gamma$  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- $\gamma$  (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- $\gamma$  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- $\gamma$ , 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- $\gamma$ .

Фиг. 54B графически иллюстрирует количество IL-2 (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 ч 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 фиг. 54B и обобщено в табл. 13, наивысшую степень индукции IL-2 наблюдали, ко-

гда 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.

Фиг. 54С графически иллюстрирует количество TNF (пг/мл) в культуральных супернатантах через 24 ч после стимуляции культур PBMC человека от одного донора (донора 6), культивируемых 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 фиг. 54С и обобщено в табл. 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 фиг. 53А-С и 54А-С

		Донор 3			донор 6		
		Нос. <sup>1</sup>	MRS <sup>1</sup>	MRS/Нос. <sup>2</sup>	Нос. <sup>1</sup>	MRS <sup>1</sup>	MRS/Нос. <sup>2</sup>
IFN- $\gamma$	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*

Соотношение значений концентрации цитокина для указанной комбинации соединений, по сравнению с контрольным носителем.

Соотношение 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- $\gamma$ , 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<sup>+</sup> посредством оси, сфокусированной на метаболизирующей NAD<sup>+</sup> CD38, образующей аденозиндифосфатрибозу (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 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.

Поскольку в данных, представленных к настоящему времени в анализах высвобождения цитокинов из PBMC, 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<sub>50</sub>, полученных с использованием этих соединений в анализе передачи сигналов (см. пример 16, фиг. 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 PBMC.

PBMC человека ( $1 \times 10^6$  клеток/лунку в 96-луночном плоскодонном планшете), полученные от донора 7, 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 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 ч после стимуляции, и уровни IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF и GM-CSF определяли с использованием платформы MSD (MesoScale Discovery).

Результаты.

Фиг. 55A графически иллюстрирует количество IFN- $\gamma$  (пг/мл) в супернатантах через 24 ч 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 фиг. 55A и обобщено в табл. 14, все четыре ингибирующие GPR174 соединения 6, 10, 11 и 20 проявляли синергизм с ZM для увеличения количества IFN- $\gamma$  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.

Фиг. 55B графически иллюстрирует количество IL-2 (пг/мл) в супернатантах через 24 ч 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 фиг. 55B и обобщено в табл. 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, фиг. 47).

Фиг. 55C графически иллюстрирует количество TNF (пг/мл) в супернатантах через 24 ч после сти-

муляции PBMC человека (донор 7) в присутствии ингибирующих GPR174 соединений 6, 10, 11 или 20, каждого в присутствии или в отсутствие ZM.

Как показано на фиг. 55C и обобщено в табл. 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, фиг. 47).

Фиг. 55D графически иллюстрирует количество GM-CSF (пг/мл) в супернатантах через 24 ч 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 фиг. 55D и обобщено в табл. 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, фиг. 47).

Таблица 14. Обобщение результатов, показанных на фиг. 55A-D

		Нос.	Соединение 10		Соединение 6		Соединение 11		Соединение 20	
			1 мкМ <sup>1</sup>	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*

<sup>1</sup> 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, Vigano 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 ч 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 фиг. 56А-С. Примечание: GPR174i=Соединение 10.

Фиг. 56А графически иллюстрирует кратность изменения, по сравнению с носителем, количества IFN- $\gamma$  в культуральных супернатантах через 24 ч 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).

Фиг. 56В графически иллюстрирует кратность изменения, по сравнению с носителем, количества IL-2 в культуральных супернатантах через 24 ч 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).

Фиг. 56С графически иллюстрирует кратность изменения, по сравнению с носителем, количества TNF в культуральных супернатантах через 24 ч 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.

Фиг. 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 ингибитор 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 иммунocyтах (Т, В и NK-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.

Фиг. 58 представляет собой схематическую диаграмму, иллюстрирующую, каким образом как GPR174, так и рецепторы аденозина отвечают на продукты стресса и гибели клеток. Как проиллюстрировано на фиг. 58, как GPR174, так и рецепторы аденозина отвечают на продукты стресса и гибели клеток. Как показано на фиг. 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 фиг. 58, в пути аденозина, повреждение/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 фиг. 58, путь аденозина можно ингибировать по-

средством 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 табл. 15 ниже. GPR174 и рецепторы A2A/A2B разделяют определенные признаки. Во-первых, каждый из них увеличивает количество внутриклеточного циклического аденозинмонофосфата (cAMP), 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- $\gamma$ ), 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- $\gamma$ , 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- $\gamma$  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- $\gamma$  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. табл. 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 обоих вместе, можно заметно усилить 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-Т-клеточная и адоптивная Т-клеточная терапия. Ингибиторы контрольных точек являются эффективными только у незначительной части пациентов, и высокие уровни образующих аденозин молекул наблюдали у неотвечающих 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 cAMP иммунитета против опухолей и, для обеспечения более эффективной активности уничтожения опухолей, как GPR174, так и путь аденозина, необходимо ингибировать, как проиллюстрировано на фиг. 58.

Таблица 15. Ингибиторы пути аденозина в исследованиях иммунотерапии злокачественных опухолей<sup>1</sup>

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 кейтруда®	Солидные злокачественные новообразования на поздних стадиях	Novartis
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
TTX-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

			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 <sup>T790M</sup> 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

<sup>1</sup>Vigano 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.c125 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 эктаназию 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.c125 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 спленцитов 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 опухоли мышей может стимулировать как стимулирующие опухоль Т-рег, так и уничтожающие опухоли 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 EL-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- $\gamma$ , 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-KO предпочтительно действовать на уничтожающие опухоль иммунocyты, 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 стимулирует противоопухолевые ответы в других Т-клетках (см. Coe 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-KO. 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-KO, 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.c125 происходит из линии мышей BALB/c. 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 BALB/c-толерантной иммунной системой посредством скрещивания самок 129S GPR174-KO с самцами BALB/c. Однопометным самцам F1 мышей WT или GPR174-KO (n=15) [BALB/c $\times$ 129S] инокулировали подкожно 500000 клеток CT26.c125 на сутки 0. В первом эксперименте, на сутки 7 и 9 (фиг. 59A и B), или во втором эксперименте на сутки 7, 9 и 14 (фиг. 61A и B), всем мышам вводили внутрибрюшинные инъекции 200 мкг антитела против GITR (клон DTA-1; Bio-X-Cell). Объем опухоли рассчитывали посредством уравнения (длина  $\times$  ширина<sup>2</sup>)/2), и мышей с опухолями с измерениями >1500 мм<sup>3</sup> подвергали эвтаназии.

#### Результаты.

Фиг. 59A и 59B графически иллюстрируют рост опухолей CT26 у индивидуальных мышей WT (фиг. 59A) и GPR174-KO (фиг. 59B), подвергнутых инокуляции клеток мышинной карциномы ободочной кишки CT26.c125 на сутки 0 и обработке антителом против GITR на сутки 7 и 9.

Как показано на фиг. 59B, рост опухоли в среднем замедлялся у мышей GPR174-KO, по сравнению с мышами WT (фиг. 59A).

Фиг. 60 графически иллюстрирует процент выживаемости несущих опухоль мышей WT и GPR174-KO, подвергнутых инокуляции клеток мышинной карциномы ободочной кишки CT26.c125 на сутки 0 и обработке антителом против GITR на сутки 7 и 9. Как показано на фиг. 60, мыши GPR174-KO имели более высокий процент выживаемости (т.е. были подвергнуты эвтаназии значительно позже) чем мыши WT ( $p=0,03$ , логарифмический ранговый критерий).

Фиг. 61A и 61B графически иллюстрируют рост опухолей у индивидуальных мышей WT (фиг. 61A) и GPR174-KO (фиг. 61B), подвергнутых инокуляции клеток мышинной карциномы ободочной кишки CT26.c125 на сутки 0 и обработке антителом против GITR на сутки 7, 9 и 14.

Как показано на фиг. 61B, рост опухоли в среднем был замедлен у мышей GPR174-KO, по сравнению с мышами WT (фиг. 61A).

Фиг. 62 графически иллюстрирует процент выживаемости несущих опухоль мышей WT и GPR174-KO, подвергнутых инокуляции клеток мышинной карциномы ободочной кишки CT26.c125 на сутки 0 и обработке антителом против GITR на сутки 7, 9 и 14.

Как показано на фиг. 62, мыши GPR174-KO имели более высокий процент выживаемости (т.е. были подвергнуты эвтаназии значительно 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 фиг. 59А-62, рост опухоли мышшиной карциномы ободочной кишки СТ26.c125 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-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 C57Bb/6-толерантной иммунной системой посредством скрещивания самок 129S GPR174-КО с самцами C57BL/6. Одноплетным самцам WT или GPR174-КО (n=12) [C57BL/6×129S] F1 инокулировали внутрикожно 75000 клеток B16F10-Kb (клеток B16F10, трансфицированных с использованием H-2Kb для увеличения представления антигена CD8 Т-клеткам) на сутки 0. (см. Ohta A. et al., *PNAS* 103(35):13132-13137, 2006). На сутки 4 и 14, всем мышам вводили внутривенные инъекции 500 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.

Фиг. 63А и 63В графически иллюстрируют рост опухолей меланомы B16F10-Kb у индивидуальных мышей WT (фиг. 63А) и GPR174-КО (фиг. 63В), подвергнутых инокуляции клеток B16F10-Kb на сутки 0 и обработке антителом против GITR на сутки 4 и 14.

Как показано на фиг. 63В, недостаточность GPR174 замедляла рост опухоли по сравнению с ростом опухоли у мышей WT (фиг. 63А). Средние размеры опухолей были значимо меньше у мышей КО на сутки 14 (p=0,01) и 16 (p=0,00005).

Фиг. 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. Как показано на фиг. 63С, средние размеры опухолей были значимо меньше у мышей GPR174 КО на сутки 14 ("\*" обозначает: p=0,01) и 16 ("\*\*\*\*" обозначает: p=0,00005).

Фиг. 64 графически иллюстрирует процент выживаемости несущих опухоль меланому B16F10-Kb мышей WT и GPR174-КО, подвергнутых инокуляции клеток B16F10-Kb клетки на сутки 0 и обработке антителом против GITR на сутки 4 и 14. Как показано на фиг. 64, мыши GPR174-КО 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 Т-рег виды терапии (т.е. средства, которые истощают, ослабляют или иным образом повреждают Т-рег клетки), в настоящее время находятся в разработке в качестве иммуно-терапевтического 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 Т-рег или одновременно ослабляют Т-рег и усиливают активность уничтожения опухоли другими Т-клетки и/или NK-клетками, включают антитела или другие молекулы, привлекающие один или несколько из следующего: GITR, CTLA-4, CD25, LAG3, TIGIT, NRP1, TGF- $\beta$ , 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- $\beta$ , CCR2, CCR4, CCR8, TNFR2 и/или EZH2.

Иллюстративные ослабляющие T-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, DTA-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-PIT.

Связывающие TIGIT (Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ИТЕМ) 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 (нейропиплин 1) средства, которые можно использовать в комбинации с ингибиторами GPR174 в композициях, способах и применениях, описанных в настоящем описании включают антитела против NRP1 антитела и малые молекулы, которые связывают NRP1 например, такие как ASP1948 (Astellas Pharma).

Связывающие TGF- $\beta$  средства, которые можно использовать в комбинации с ингибиторами GPR174 в композициях, способах и применениях, описанных в настоящем описании, включают антитела против TGF- $\beta$  и малые молекулы, которые связывают TGF- $\beta$ , 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 (Tesar); IMP321 (Immutep); INCAGN02385 (Agenus); LAG525 (Novartis); и МК4280 (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 WO 2010/097395 и Публикации патента США № 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 US 10087259.

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-деазанепланоцин А (DZNcp), E11, 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 T-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 T-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 или 3 мкМ)

клетки культивировали в течение 24 часов и в супернатантах оценивали концентрации цитокинов (Legendplex, Biolegend).

Получение очищенных T-клеток мыши:

T-клетки мыши (набор для выделения необработанных пан-T-клеток Stemcell) от мышей WT или GPR174-KO 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 T-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 ч и в супернатантах оценивали концентрации цитокинов (LegendPlex, Biolegend).

Фиг. 65 графически иллюстрирует концентрации IL-2 в культурах стимулированных T-клеток человека в присутствии или в отсутствие PS-липосом (PSL) или ингибитор GPR174 (соединение 10, 3 мкМ).

Как показано на фиг. 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 ( $p=0,01$ ).

Фиг. 66A, B и C графически иллюстрируют концентрацию IL-2 (фиг. 66A), IFN- $\gamma$  (фиг. 66B) и TNF (фиг. 66C) в культурах стимулированных T-клеток человека в присутствии или в отсутствие PS-липосом,

экзосом опухолей, или ингибирующего GPR174 соединения (соединения 10, 0,5 мкМ). Как показано на фиг. 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- $\gamma$  (фиг. 66В) и TNF (фиг. 66С) в присутствии сред, PS-липосом или экзосом обобщено ниже в табл. 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- $\gamma$  и TNF в присутствии сред, PS-липосом или экзосом, как показано на фиг. 66А-С

Соединение 10 против носителя, в присутствии:	IL-2		IFN- $\gamma$		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.

Фиг. 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 фиг. 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 на 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 мм<sup>3</sup> 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 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 или 0,2 мкМ, или контрольный носитель DMSO)

Фиг. 68А и 68В графически иллюстрируют эффекты антагониста рецептора аденозина A2a/A2b ZM-241385 (0,1 мкМ), ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ), или обоих соединений (ZM-241385 плюс соединение 10) на уровне IL-2 в супернатантах культивированных спленоцитов, выделенных от  $n=3$  мышей WT (фиг. 68А) или  $n=3$  однопометных мышей GPR174-KO (фиг. 68В) после 2 суток стимуляции антителом против CD3 и антителом против CD28.

Как показано на фиг. 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-KO (фиг. 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 фенотипически копирует 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-KO ( $p<0,05$ ). 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.

Фиг. 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 уровне 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 фиг. 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 ( $p<0,01$ ).

Фиг. 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 уровне IL-2 в супернатантах культивированных спленоцитов, выделенных от 3 мышей WT (фиг. 70А) и 3 мышей GPR174-KO (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 фиг. 70А, в спленocyтaх WT с использованием ZM-241383 уровни IL-2 увеличивались 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 фиг. 70В, 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 спленocyтaх 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 спленocyтaх 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 фенотипически копирует 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 состояниях 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-й 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  $1 \times 10^6$  клеток/лунку в 96-луночном плоскодонном планшете и культивировали в четырех репликах в течение 3 ч в присутствии:

ингибирующего GPR174 соединения 10 (1 мкМ);

ингибирующего A2aR/A2bR соединения ZM-241385 (0,1 мкМ);

ингибирующего CD73 соединения: натриевой соли аденозин-5'-( $\alpha,\beta$ -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 ч после стимуляции, и уровни IL-2 определяли посредством ELISA.

Фиг. 71 графически иллюстрирует уровни IL-2 в супернатантах PBMC, стимулированных антителом против CD3 и антителом против CD28 в присутствии указанных соединений.

Как показано на фиг. 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 Biologies, Inc.; CD3+ Т-клетки на фигурах 72A и 72B, и CD8+ Т-клетки на фиг. 72C) 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 ч культивирования (44 ч для результатов, показанных на фиг. 72C), в культуральных средах анализировали цитокины (MesoScale Discovery).

Результаты.

Фиг. 72A и 72B графически иллюстрируют супрессию продукции IL-2 (фиг. 72A) и IFN- $\gamma$  (фиг. 72B) из очищенных Т-клеток посредством PS-липосом и NECA, отдельно или вместе. Для культур CD8 Т-клеток (фиг. 72C), включены указанные концентрации ZM-241385 и соединения 10.

Как показано на фиг. 72A, 72B и 72C, и обобщено ниже в табл. 17, как PS, так и NECA супрессиру-

ют цитокин почти до такой же степени, как супрессия, достигаемая с использованием обоих вместе.

Таблица 17. Обобщение продукции IL-2 и IFN- $\gamma$  в различных условиях, показанных на фиг. 72A и 72B

	IL-2		IFN- $\gamma$	
	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 сAMP 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 сAMP; или что их индивидуальные компартменты сAMP могут полностью привлекать опосредованную сAMP 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 G $\alpha$ s 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- $\gamma$  из CD8 Т-клеток человека требует синергической активности ZM и соединения 10; см. фиг. 72C). Как далее показано в настоящем описании, недостаточность GPR174 усиливает противоопухолевые иммунные ответы у мышей.

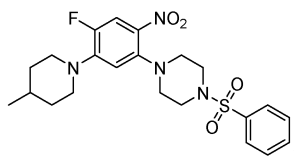
Как описано в настоящем описании, внеклеточный фосфатидилсерин (PS) является сильным модулятором иммунных ответов. Различные скрамблены фосфолипидов отвечают на различные клеточные процессы для экспонирования PS либо в ходе апоптоза, либо в ходе активации множества типов клеток, включая тромбоциты, лимфоциты, 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 $\alpha$ 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 сAMP, 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 сAMP, PS-липосомы супрессировали продукцию IL-2 Т-клетками человека и продукцию IL-2 у мышей из Т-клеток WT, но не GPR174-КО. 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-КО мыши. В модели сингенной опухоли на мышах, недостаточность GPR174 значительно 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 сAMP 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 аденозиндеаминазы, 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 сAMP иммуносупрессии в микроокружении опухолей.



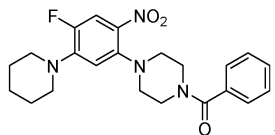
## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения злокачественной опухоли, включающий введение нуждающемуся в этом пациенту терапевтически эффективного количества ингибитора GPR174, выбранного из группы, состоящей из:

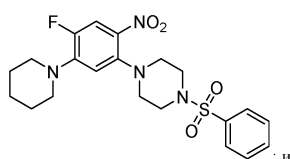
i. соединения 10, имеющего следующую структуру:



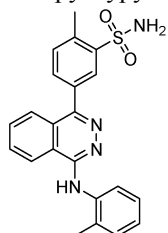
ii. соединения 6, имеющего следующую структуру:



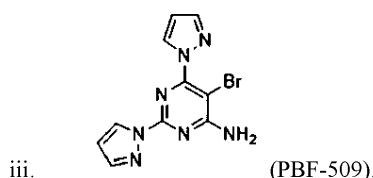
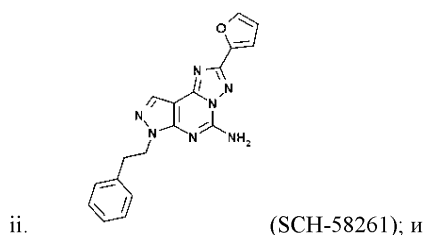
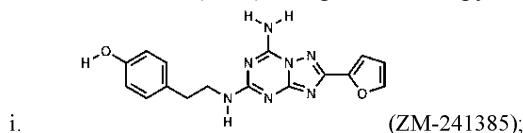
iii. соединения 11, имеющего следующую структуру:



iv. соединения 20, имеющего следующую структуру:



и антагониста рецептора аденозина-A2A (A2A), выбранного из группы, состоящей из



2. Способ по п.1, где ингибитор GPR174 ингибирует зависимую от PS или LysoPS активацию передачи сигналов GPR174 в клетке, экспрессирующей GPR174, по меньшей мере на 25%.

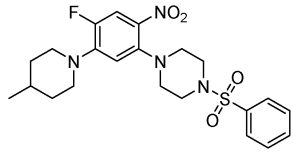
3. Способ по п.1, где ингибитор GPR174 стимулирует иммунный ответ у пациента посредством ингибирования передачи через GPR174 сигналов G-альфа-s.

4. Способ п.3, где стимулированный иммунный ответ включает опосредованный NK-клетками иммунный ответ и опосредованный противоопухолевыми цитотоксическими T-клетками иммунный ответ.

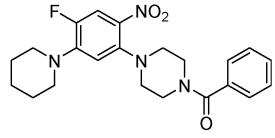
5. Способ увеличения уровня Th1-цитокинов в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) человека, включающий приведение в контакт PBMC человека с ингибитором GPR174, выбран-

ным из группы, состоящей из:

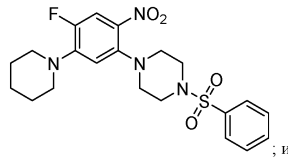
i. соединения 10, имеющего следующую структуру:



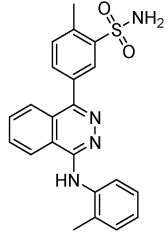
ii. соединения 6, имеющего следующую структуру:



iii. соединения 11, имеющего следующую структуру:



iv. соединения 20, имеющего следующую структуру:



и антагонистом рецептора аденозина-A2A (A2A), выбранным из группы, состоящей из:

- i. ZM-241385;
- ii. SCH-58261; и
- iii. PBF-509.

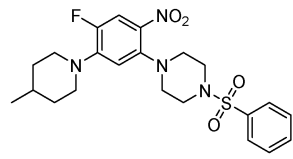
6. Способ по п.5, где приведение в контакт осуществляют *in vitro*.

7. Способ по п.5, где РВМС содержат Т-клетки или НК-клетки.

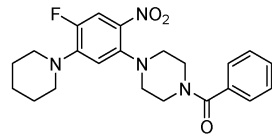
8. Способ по любому из пп.5-7, где уровень по меньшей мере одного из Th1-цитокинов IFN- $\gamma$ , IL-2, TNF или GM-CSF увеличен по меньшей мере на 20%.

9. Фармацевтическая композиция для лечения злокачественной опухоли, содержащая комбинацию ингибитора передачи сигналов GPR174, выбранного из группы, состоящей из:

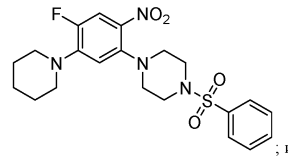
i. соединения 10, имеющего следующую структуру:



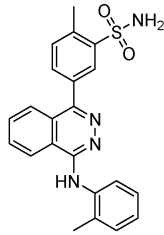
ii. соединения 6, имеющего следующую структуру:



iii. соединения 11, имеющего следующую структуру:



iv. соединения 20, имеющего следующую структуру:



и антагониста рецептора аденозина-A2A (A2A), выбранного из группы, состоящей из:

- i. ZM-241385;
- ii. SCH-58261; и
- iii. PBF-509;

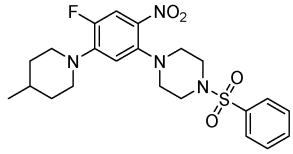
и фармацевтически приемлемый наполнитель.

10. Способ усиления противоопухолевого иммунного ответа у субъекта, которого в настоящее время подвергают лечению с использованием антагониста A2AR, выбранного из группы, состоящей из:

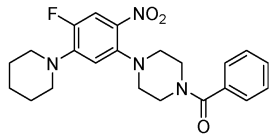
- i. ZM-241385;
- ii SCH-58261; и
- iii. PBF-509,

включающий введение эффективного количества ингибитора GPR174, выбранного из группы, состоящей из:

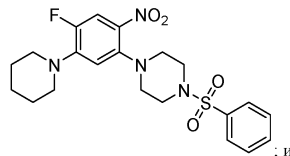
- i. соединения 10, имеющего следующую структуру:



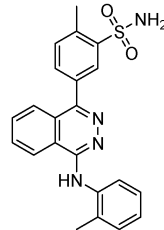
- ii. соединения 6, имеющего следующую структуру:



- iii. соединения 11, имеющего следующую структуру:



- iv. соединения 20, имеющего следующую структуру:



для стимуляции усиленного противоопухолевого ответа у субъекта.

Белок GPR174 человека NP\_115942.1  
(SEQ ID NO:1)

```
MPANYTCTRPDGDNTDFRYFIYAVTYTVILVPLIGNILALWVFYGYMKETKRAVIFMINLAIADLLQVL
SLPLRIFYYLNHDWPFPGGLCMFCFYLYKYNMYASIYFLVCISVRRFWFLMYPFRFHDKQKYDLYISIA
GWLIIICLACVLP LLRTSDDTSGNRTKCFVDLPTNRVNLAQSVMMTIGELIGFVTPLLLIVLYCTWKTVL
SLQDKYPMADLGEKQKALKMILTCAGVFLICFAPYHFSFPLDFLVKSNEIKSCLARRVILIFHSVALCL
ASLNSCLDPVIYYFSTNEFRRRLSRQDLHDSIQLHAKSFSVSNHTASTMTPELC
```

Фиг. 1A

кДНК GPR174 человека NP\_115942.1 (NM\_032553.1), SEQ ID NO:2

CACCATTAGGCAAAGATAGTTTCTAGAGAGAATCATGCCTGCTAATTACACGTGTACCAGGCCAGATGG  
 AGACAATACAGATTTTCGATACTTTATTTATGCAGTGACATACACTGTCATTCTTGTGCCAGGTCTCATAG  
 GGAATATATTAGCCCTGTGGGTATTSTATGGTTATATGAAAGAAAACAAAACGAGCTGTGATATTTATGATA  
 AACTTAGCCATTGCTGACTTACTACAAGTTCTTCCCTTGCCACTGAGGATCTTCTACTACTTGAATCATGA  
 CTGGCCATTTGGGCCTGGTCTCTGCATGTTCTGTTTCTACCTGAAGTATGTCAACATGTATGCAAGCATCT  
 ACTTCTGGTCTGCATCAGTGTGCGACGATTTTGGTTTCTCATGTACCCCTTTGCTTCCATGACTGCAAA  
 CAGAAATATGACCTGTACATCAGCATTGCTGGCTGGCTGATCATCTGCCTTGCCTGTGTACTTTCCACT  
 CCTCAGAACCAGTGATGATACCTCTGGCAATAGGACCAAATGCTTTGTGGATCTTCTACCAGGAATGTCA  
 ACCTGGCCAGTCCGTTGTTATGATGACCATTGGCGAGTTGATTGGGTTTGTAACTCCGCTTCTGATTGTC  
 CTATATTGTACCTGGAAGACGGTTTTTACTGCAAGATAAATATCCCATGGCCCAAGATCTTGGAGAGAA  
 ACAGAAAGCCTTGAAGATGATTCTAACCTGTGCAGGGGATTCTTAATTTGCTTTGCACCTTATCATTTCA  
 GTTTTCTTTAGATTTCTGGTGAAGTCCAATGAAATTTAAAAGCTGCCTAGCCAGAAGGGTGATTCTAATA  
 TTTCACTGTGGCATTGTGCTTGTGCTAGTCTGAATTCATGTCTTGACCCAGTCATATACTACTTTTCCAC  
 TAATGAGTTCGGAAGACGGCTTTCAAGACAAGATTTGCATGACAGCATCCAACCTCCATGCAAAATCCTTTG  
 TGAGTAACCATACAGCTTCCACCATGACACCTGAATTATGCTAAAAACAAAAACAACTGAATGTGACCT  
 GAAATGCAAGTACATCAGAACATATCTGCAATACCCAAGCCACAGGGAAGAACTTGCAAAAACAACACAGCT  
 TTTCACTTCTGCTCTATCTTACTGCTATGGGGAATTCACCTTCTCAAGCAGGACCTATTTGGAGCATTAC  
 GATCCACGATTATTGATGTTGACATGTCCATGTAGTAATTTTTCTTCAAGT

Фиг. 1B

Белок GPR174 мыши NP\_001028423.1 (SEQ ID NO:3)

MTDNFTCNKTDGDNTDFRYFIYAVTYTVILVPLIGNILALWVFGYMKETKRAVVF  
 MINLAIADLLQILSLPLRIFYLNNHDWPFGLCMFCFYLYKVNMYASIYFLVCISV  
 RRFWFLMYPFRFNDCKQKYDLYISIIIGWLIICLACLLFLLRTNDDTPGNRTKCFVD  
 LPIRNVNLAQSVAMITIGEVVGFVPLMIVLYCTWKALSLQNKYPISQHLGEKKKA  
 LKMILTCAGVFLVCFVPHFSFPLDFLVKSNEIKSCFARRVILIFHSVALCLASLNS  
 CLDPVIYYFTTNEFRRLSRQDLPDNIQLHTKSYKIASNHATSTVAEELC

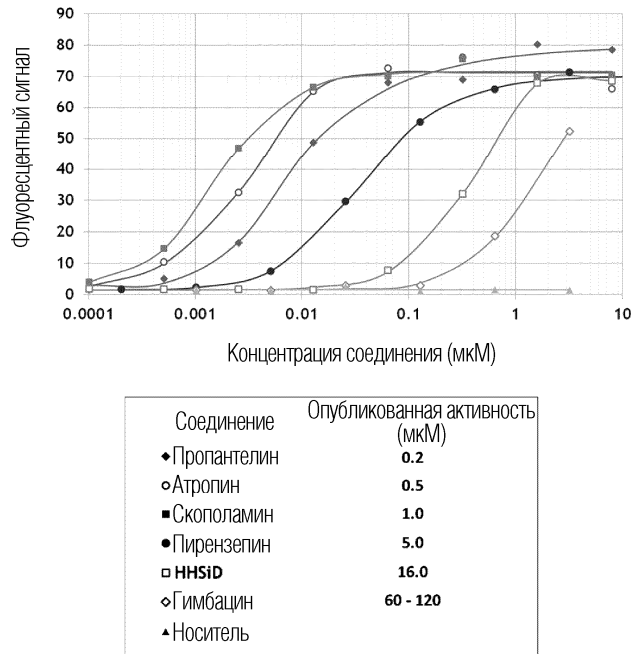
Фиг. 1C

Белок GPR174 крысы NP\_001100408.1 (SEQ ID NO:4)

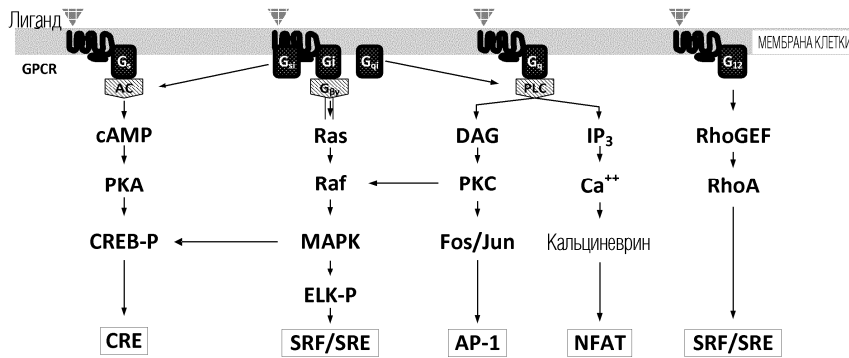
MTDNFTCNKTDGDNTDFRYFIYAVTYTVILVPLIGNILALWVFGYMKETKRAVVFMINLAIADLLQIL  
 SLPLRIFYLNNHDWPFGLCMFCFYLYKVNMYASIYFLVCISVRRFWFLMYPFRFNDCKQKYDLYISIV  
 GWLIICLACLLFLLRTNDDTPGNRTKCFVDLPIRNVNLAQSVAMITIGEVVGFITPLMIVLYCTWKAL  
 SLQNKYPISQHLGEKKKALRMILTCAAVFLICFAPYHFSFPLDFLVKSNEIKSCLARRVILIFHSVALCL  
 ASLNSCLDPVIYYFTTNEFRRLSRQELPDSIQLQTKSYKIVNNHGASPTAAELC

Фиг. 1D

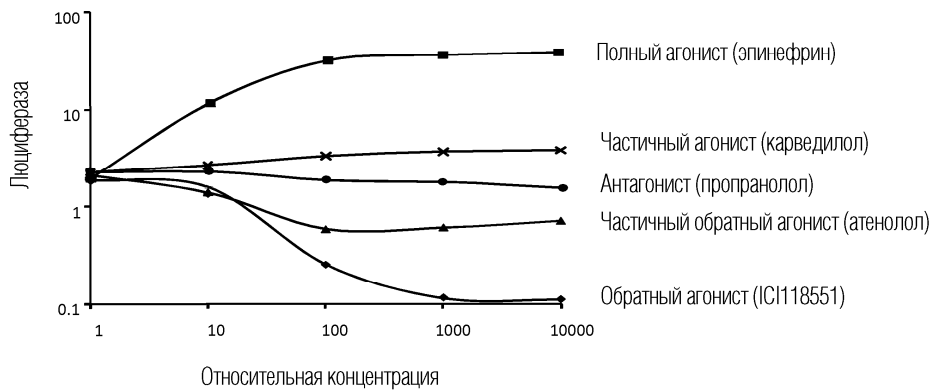
Кривые зависимости ответа от дозы для стандартных соединений против рецептора CHRМ1



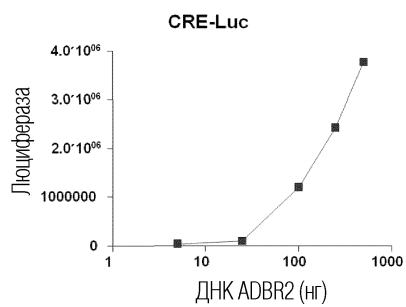
Алгоритм определения профиля передачи сигналов GPCR



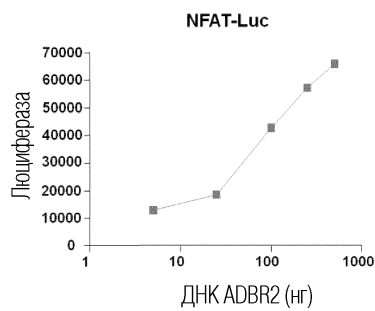
ADBR2 /CRE-Luc



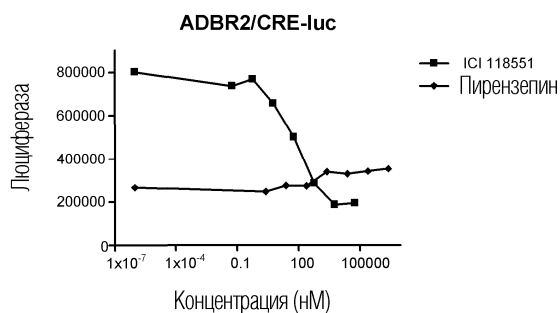
046439



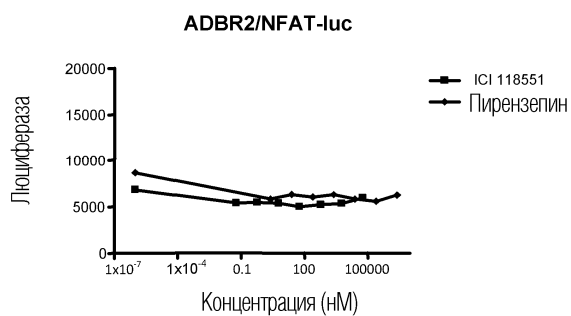
Фиг. 4B



Фиг. 4C

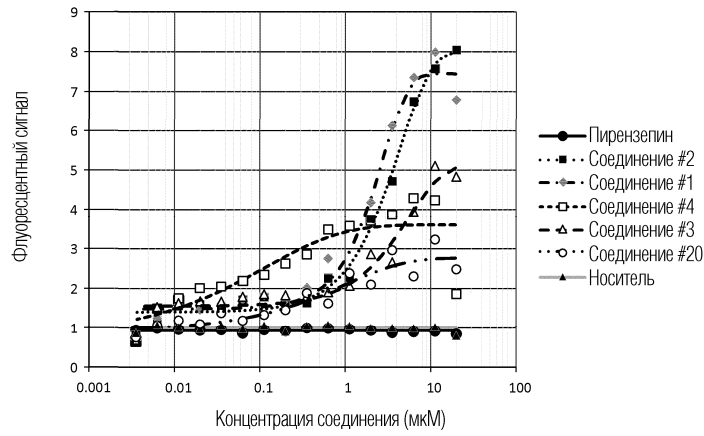


Фиг. 4D



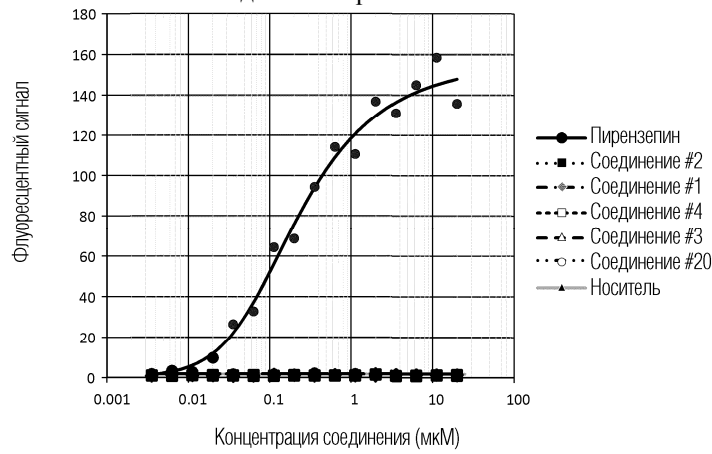
Фиг. 4E

Результаты анализа CRA репрезентативных взаимодействующих с GPR174 соединений  
Соединения против GPR174



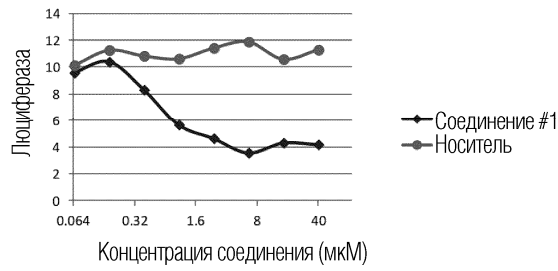
Фиг. 5А

Результаты анализа CRA репрезентативных взаимодействующих с GPR174 соединений  
Соединения против CHRМ1



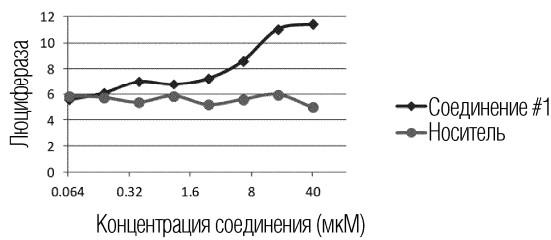
Фиг. 5В

GPR174/CRE-Luc

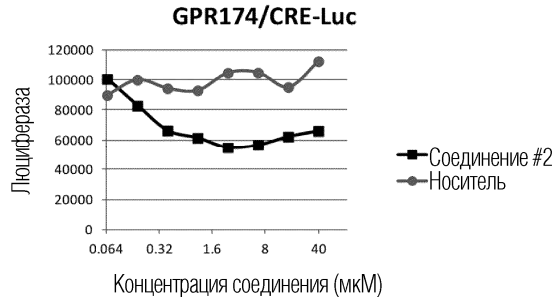


Фиг. 6А

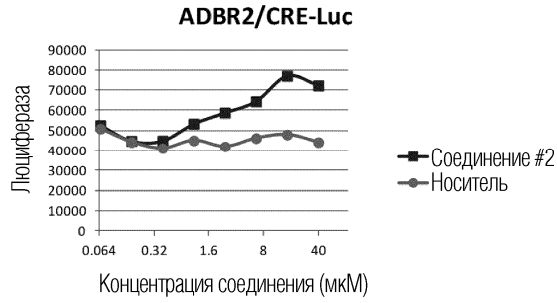
ADBR2/CRE-Luc



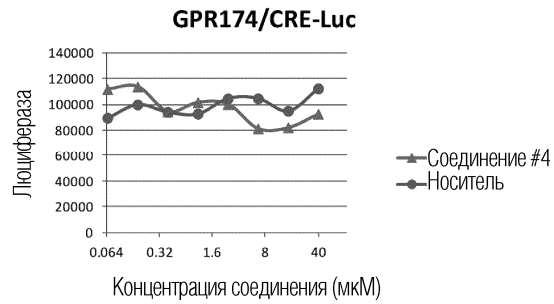
Фиг. 6В



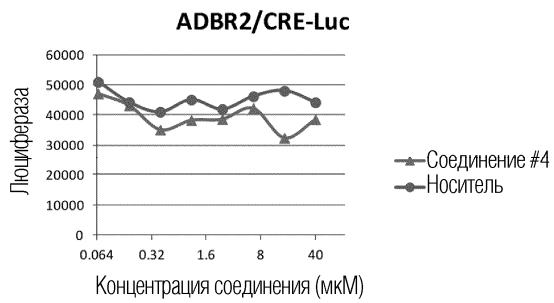
Фиг. 7А



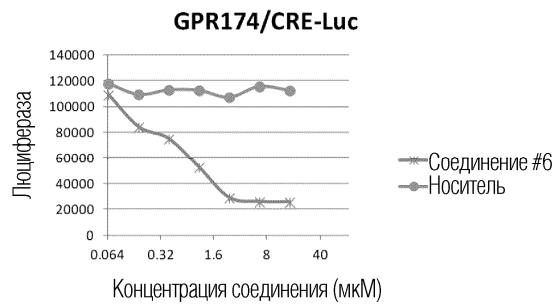
Фиг. 7В



Фиг. 8А

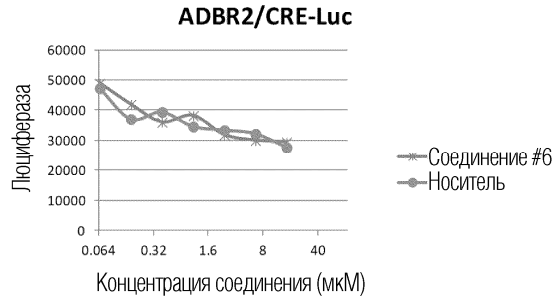


Фиг. 8В

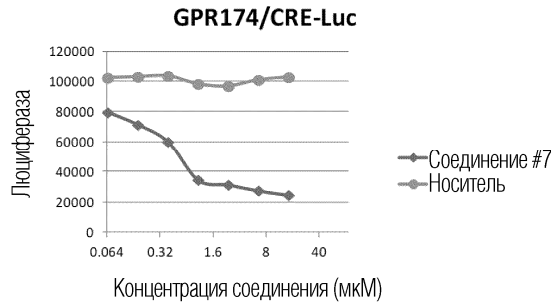


Фиг. 9А

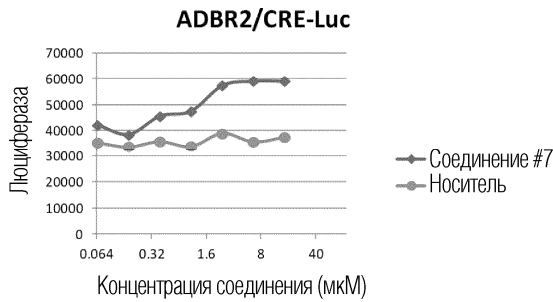




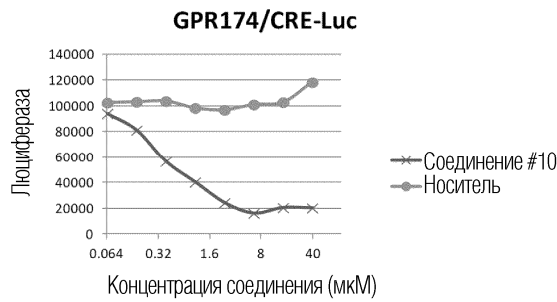
Фиг. 9B



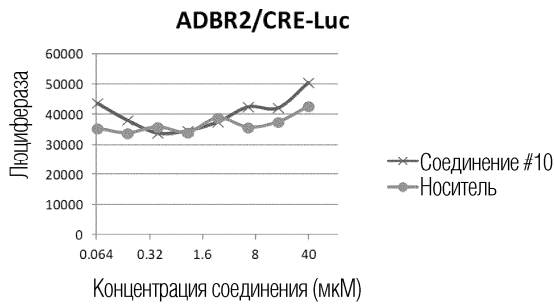
Фиг. 10A



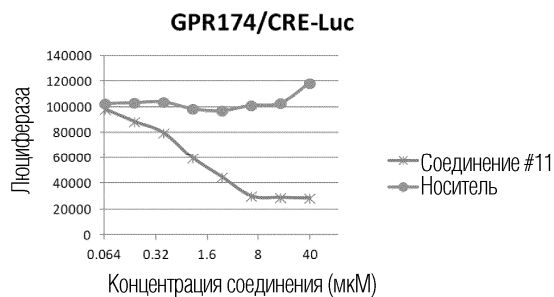
Фиг. 10B



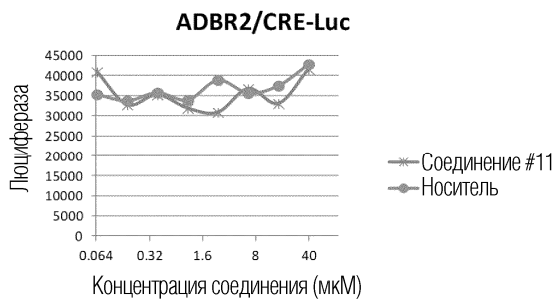
Фиг. 11A



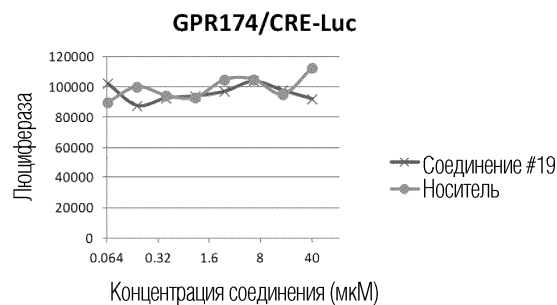
Фиг. 11B



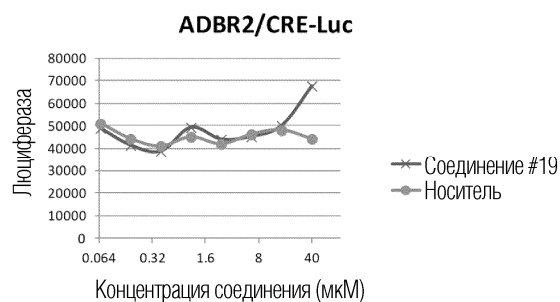
Фиг. 12А



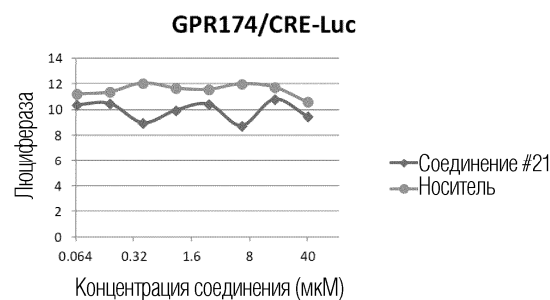
Фиг. 12В



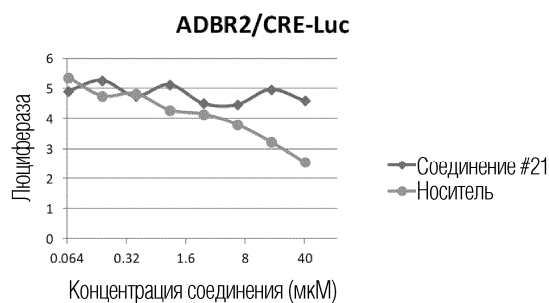
Фиг. 13А



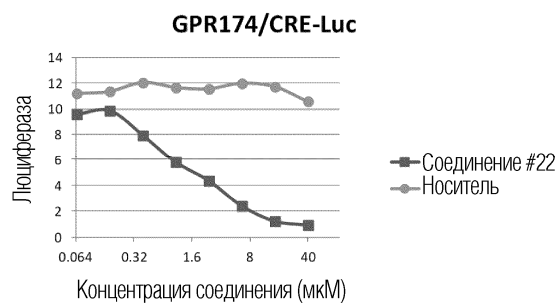
Фиг. 13В



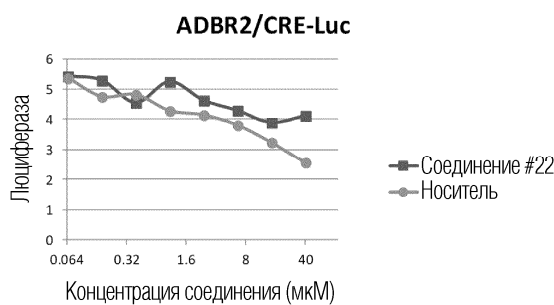
Фиг. 14А



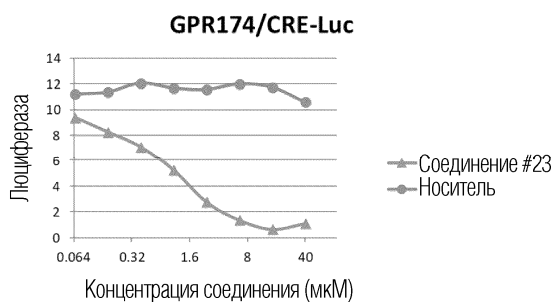
Фиг. 14В



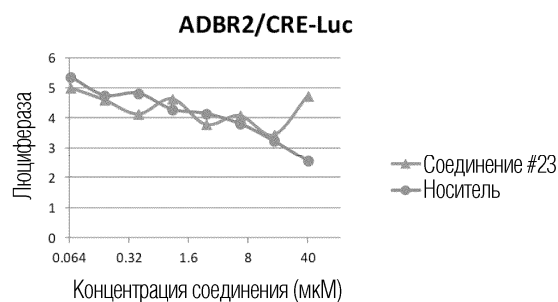
Фиг. 15А



Фиг. 15В

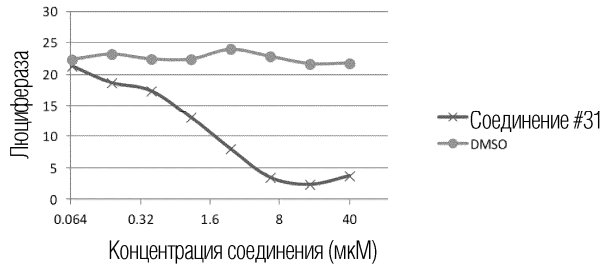


Фиг. 16А



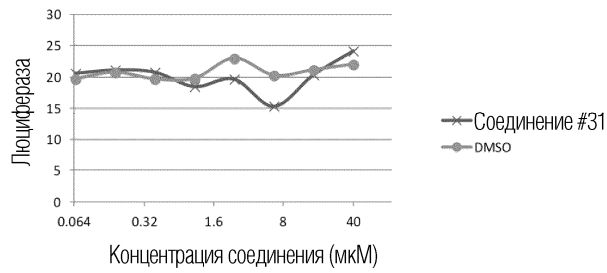
Фиг. 16В

**GPR174/CRE-Luc**



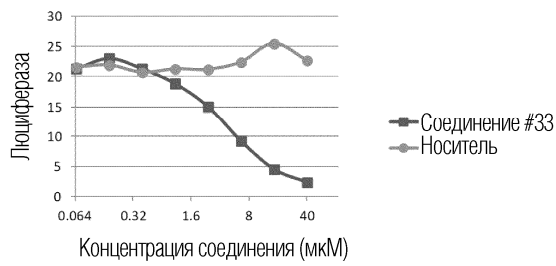
Фиг. 17А

**ADBR2/CRE-Luc**



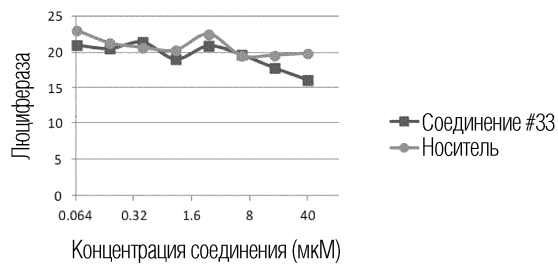
Фиг. 17В

**GPR174/CRE-Luc**



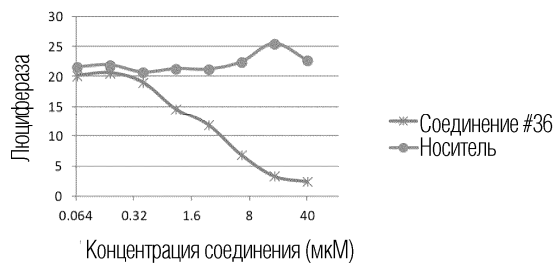
Фиг. 18А

**ADBR2/CRE-Luc**

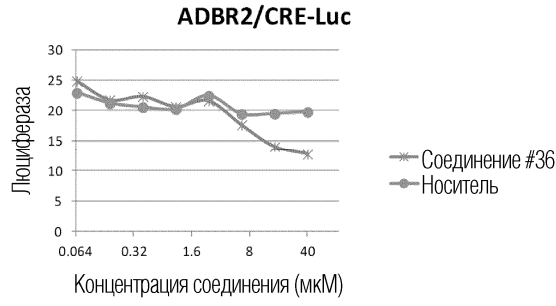


Фиг. 18В

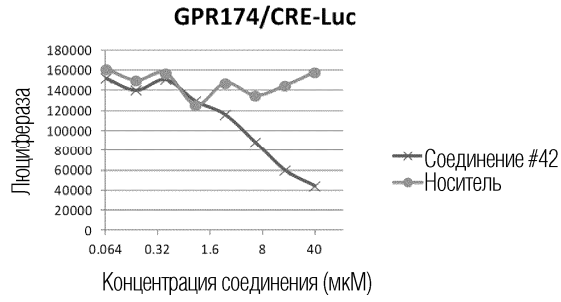
**GPR174/CRE-Luc**



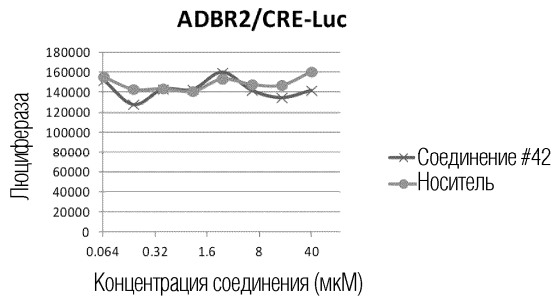
Фиг. 19А



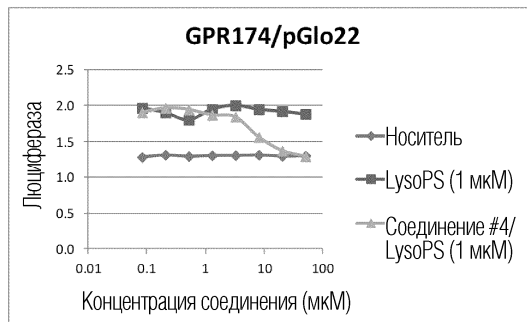
Фиг. 19В



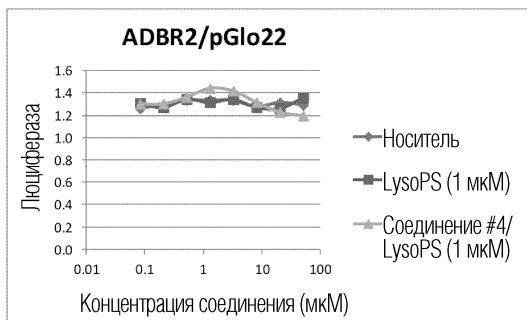
Фиг. 20А



Фиг. 20В

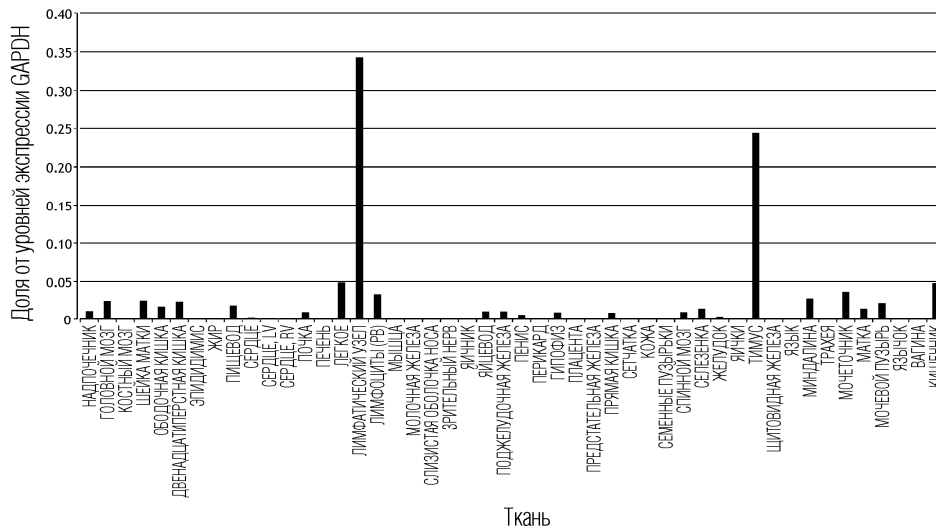


Фиг. 21А



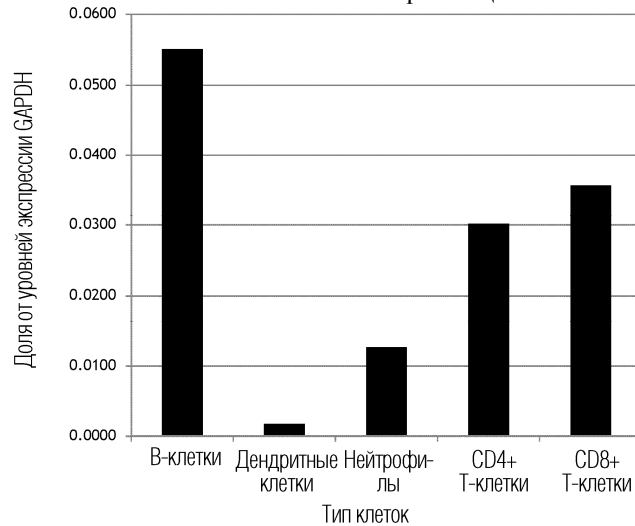
Фиг. 21В

Относительное содержание транскрипта GPR174 в тканях человека, как измерено посредством qRT-ПЦР



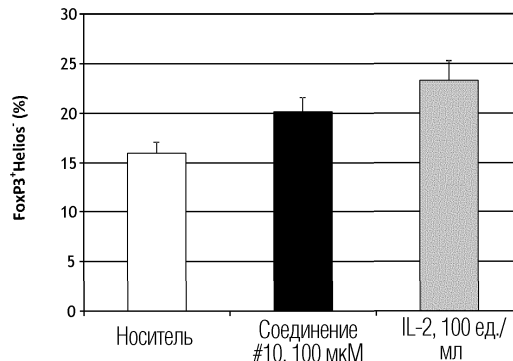
Фиг. 22

Относительное содержание транскрипта GPR174 в лимфоидных клетках человека, как измерено посредством qRT-ПЦР

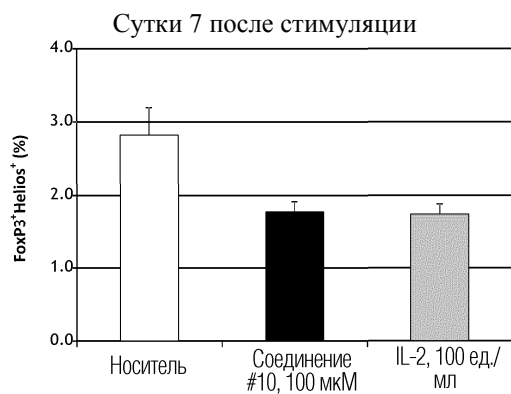


Фиг. 23

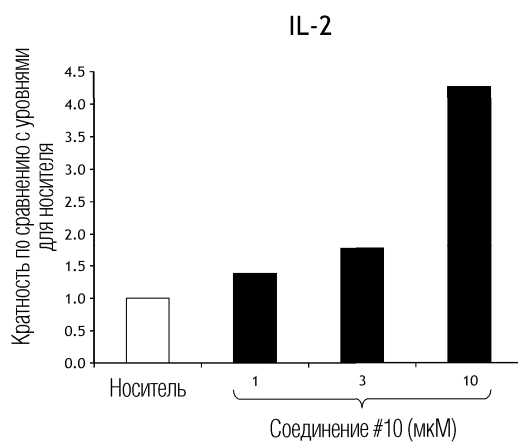
Сутки 3 после стимуляции



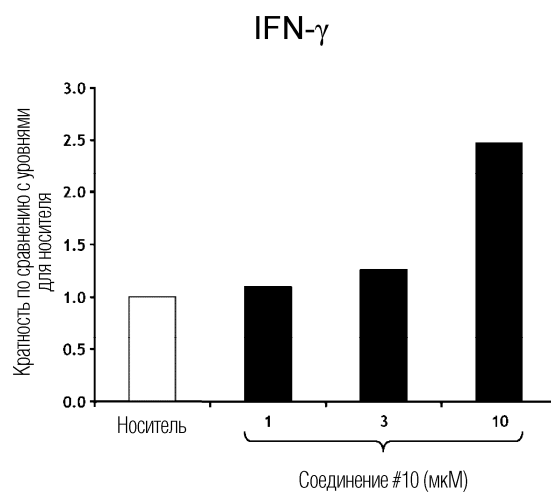
Фиг. 24А



Фиг. 24В

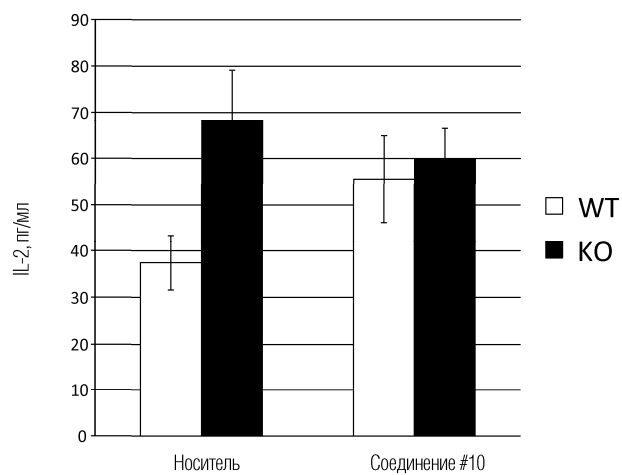


Фиг. 25



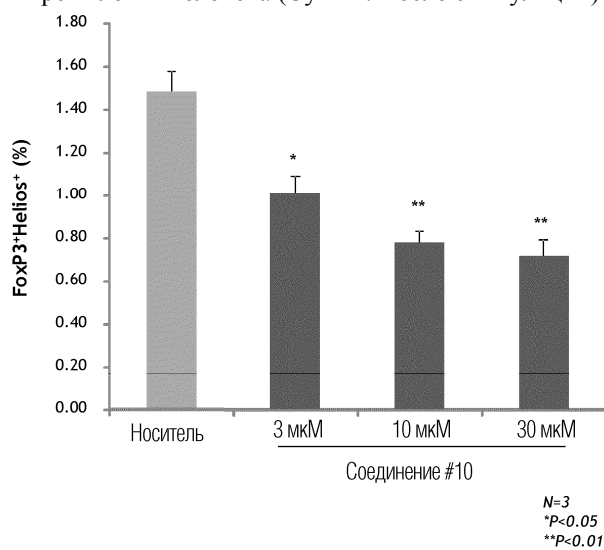
Фиг. 26

046439



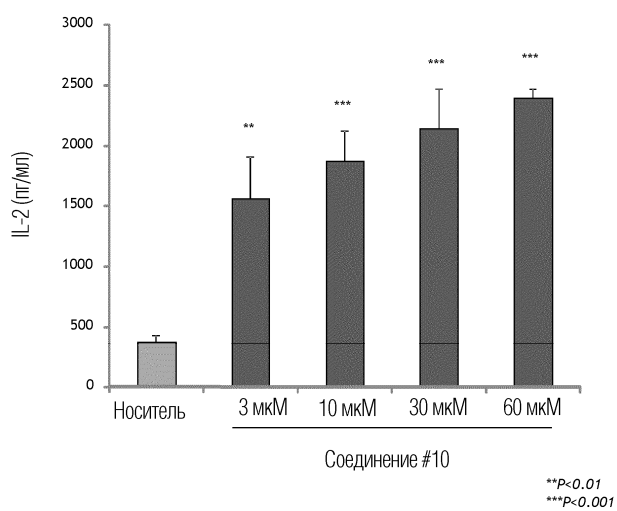
Фиг. 27

T-рег-клетки человека (Сутки 7 после стимуляции)



Фиг. 28

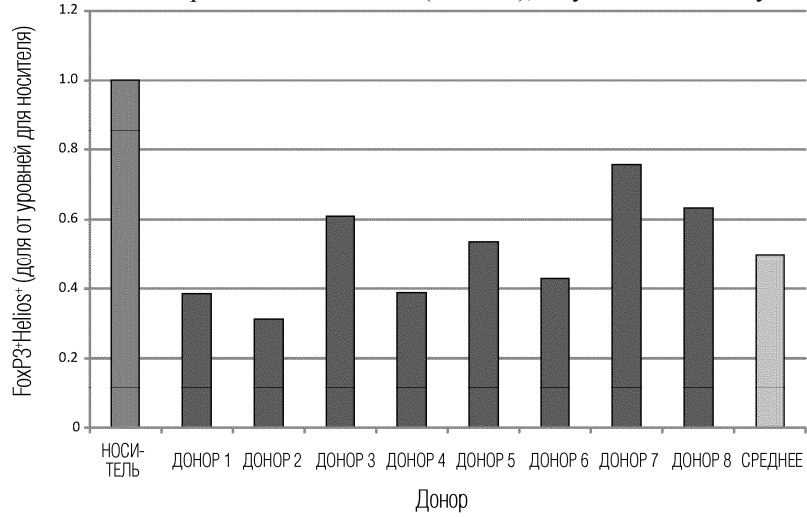
IL-2 (3 суток после стимуляции)



Фиг. 29

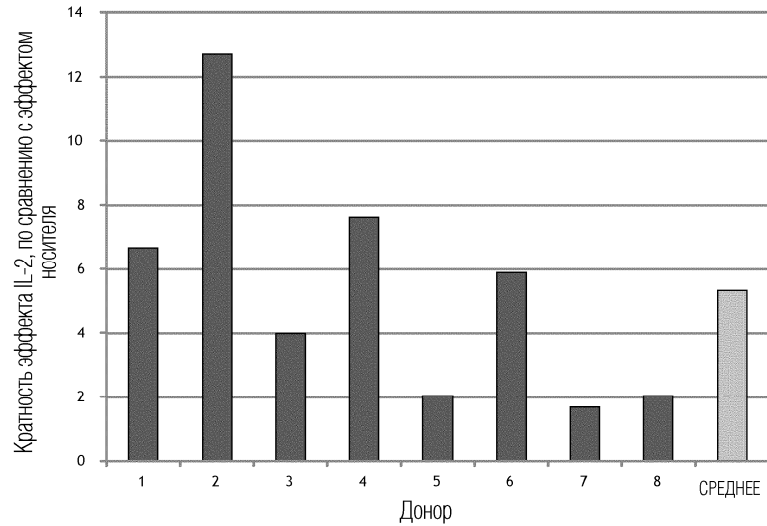


Множество доноров/соединение #10 (30 мкМ), 7 суток после стимуляции



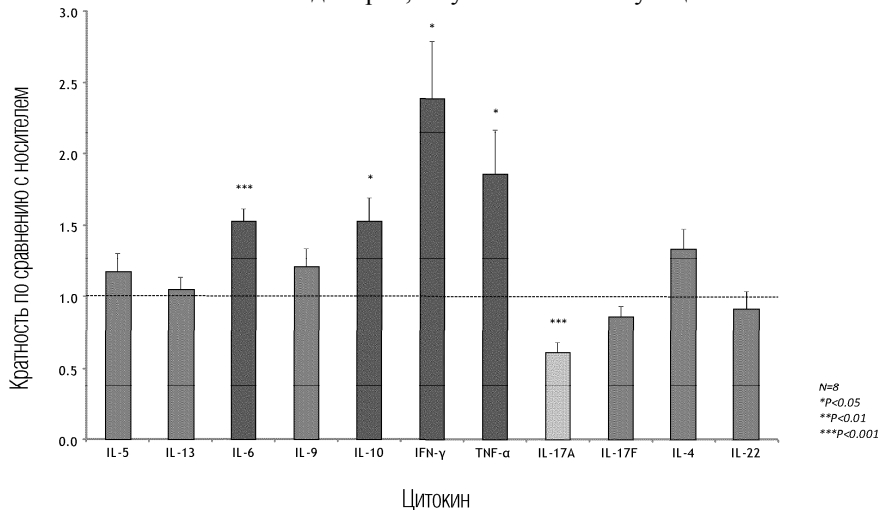
Фиг. 30

Эффект соединения #10 (30 мкМ) на IL-2, продуцируемый РВМС человека (множество доноров), 2 суток после стимуляции



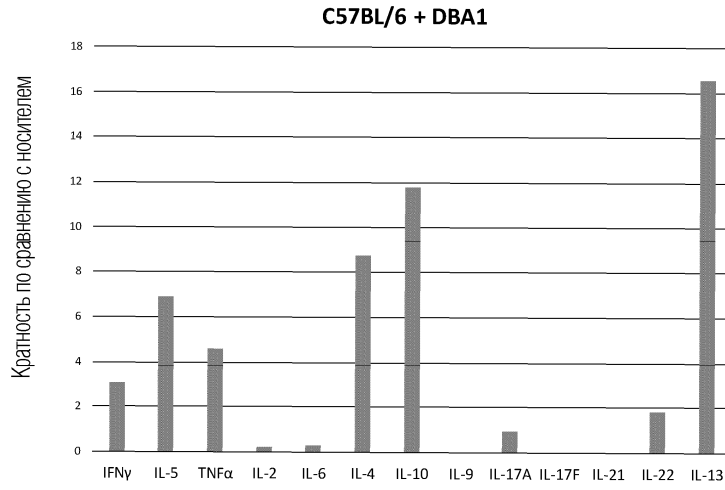
Фиг. 31

Эффект соединения #10 (30 мкМ) на цитокины, продуцируемые пулированными РВМС человека от множества доноров, 2 суток после стимуляции

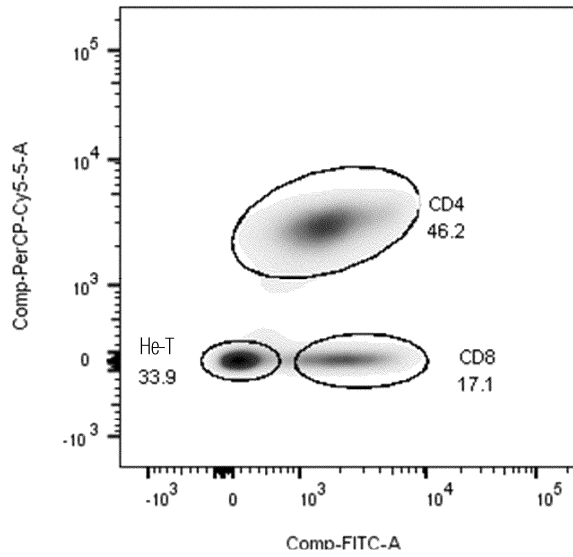


Фиг. 32

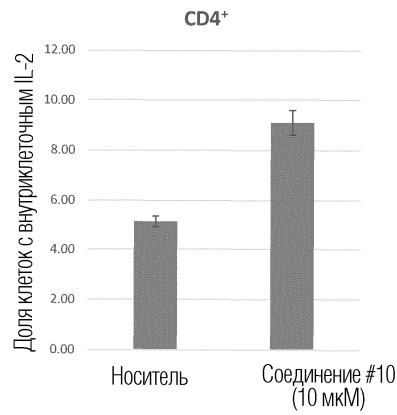
Эффект соединения #10 (30 мкМ) на уровни цитокинов, продуцированных в смешанных культурах спленоцитов из различных линий мышей (совместно культивированных в течение 6 суток)



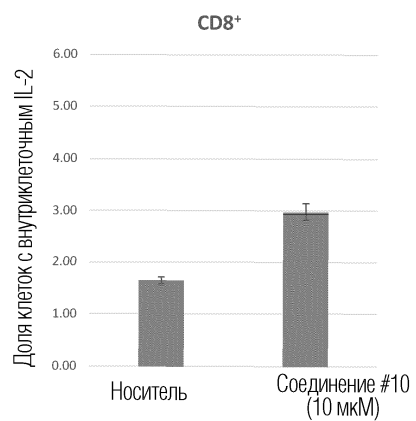
Фиг. 33



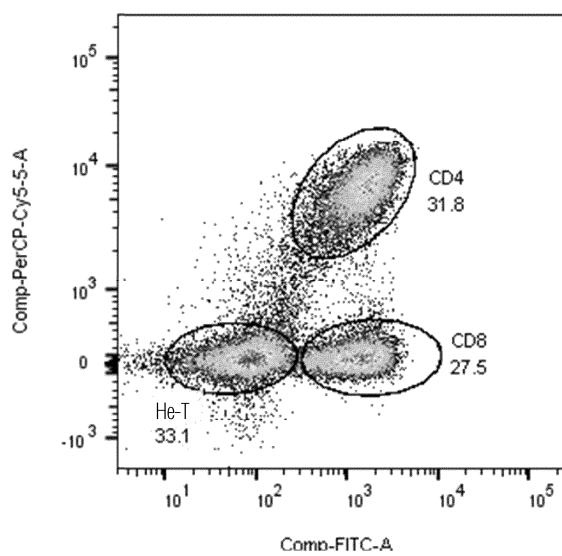
Фиг. 34А



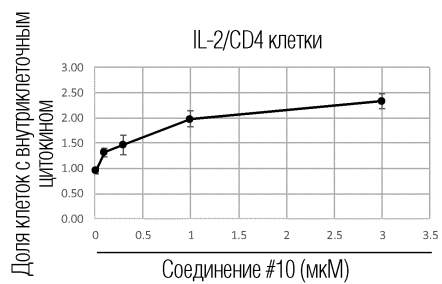
Фиг. 34В



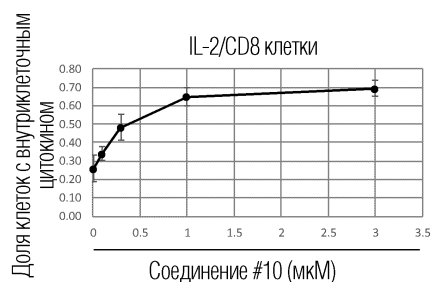
Фиг. 34С



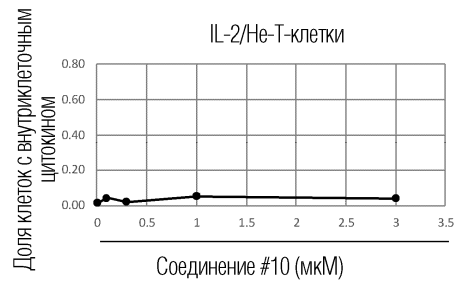
Фиг. 35А



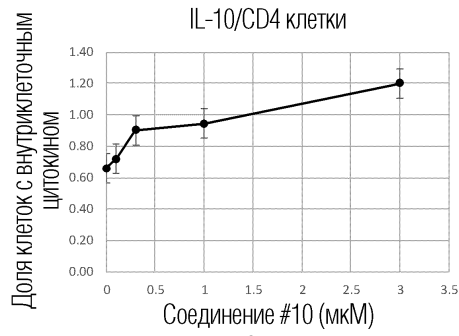
Фиг. 35В



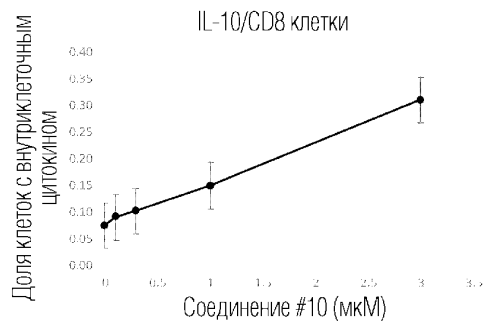
Фиг. 35С



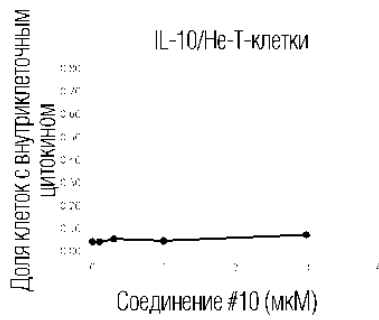
Фиг. 35D



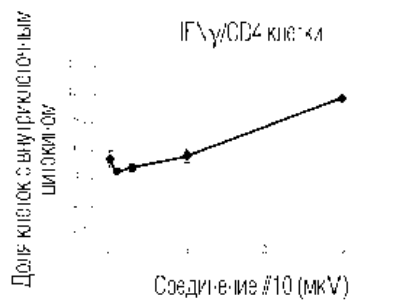
Фиг. 35E



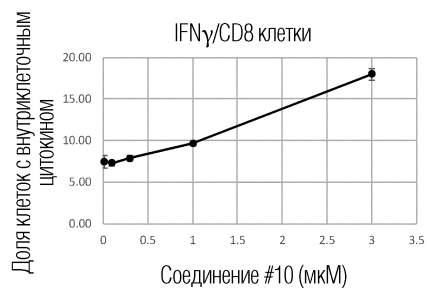
Фиг. 35F



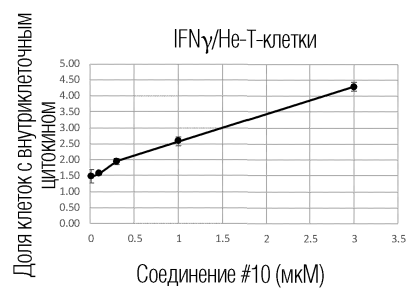
Фиг. 35G



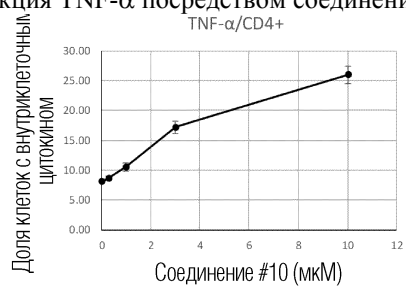
Фиг. 35H



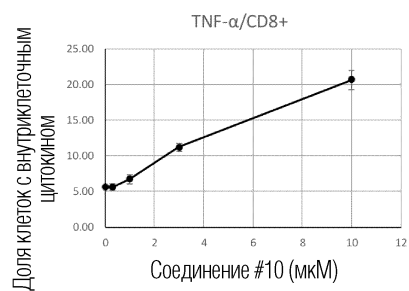
Фиг. 35I



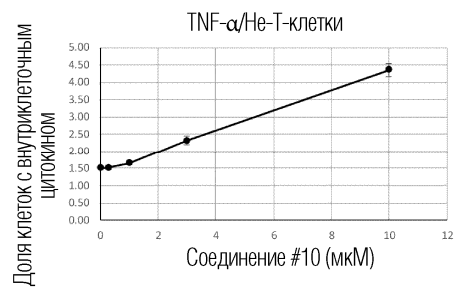
Фиг. 35J

Индукция TNF- $\alpha$  посредством соединения #10

Фиг. 35K

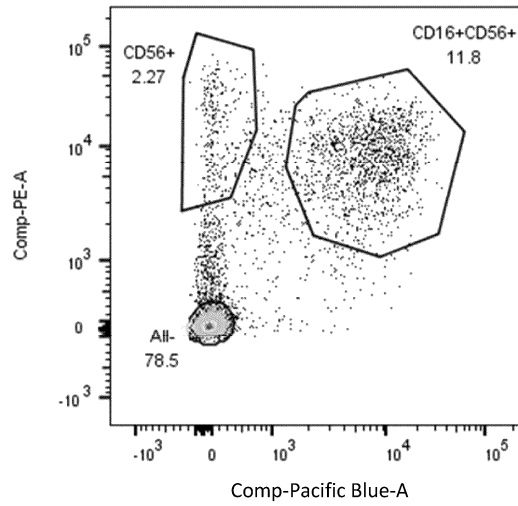


Фиг. 35L



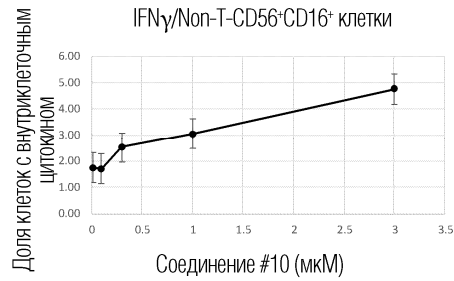
Фиг. 35M

Дополнительный анализ популяции не-Т-клеток из фиг. 35А

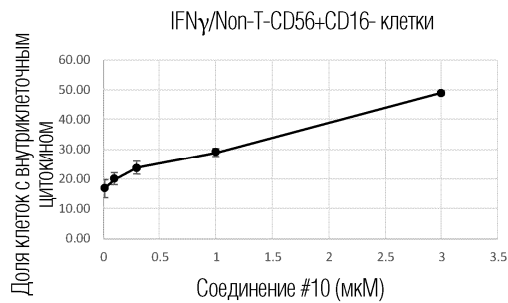


Фиг. 36А

Индукция IFN $\gamma$  посредством соединения #10 в клетках NK

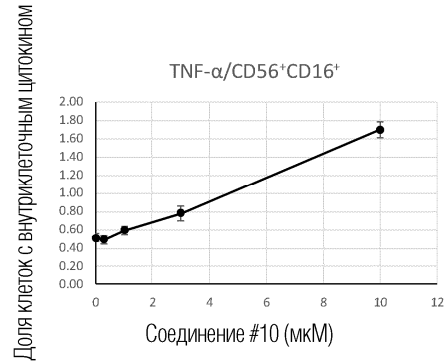


Фиг. 36В

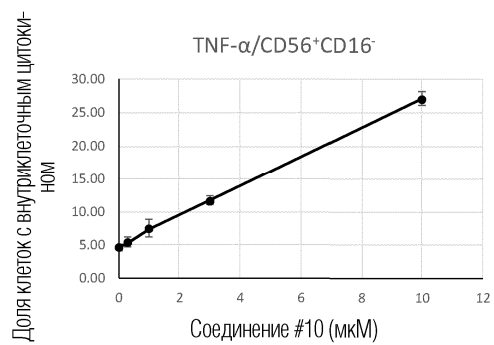


Фиг. 36С

Индукция TNF- $\alpha$  посредством соединения #10 в клетках NK

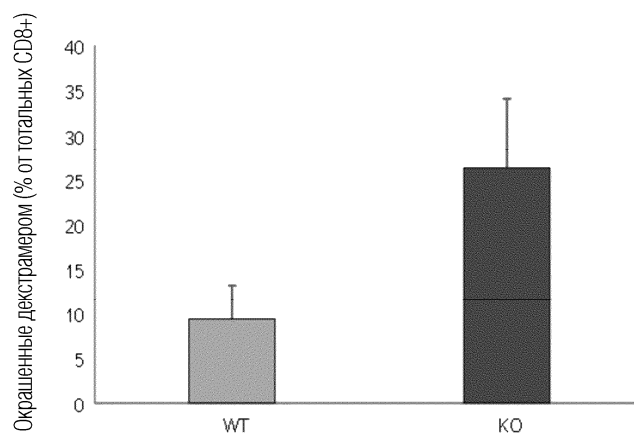


Фиг. 36D



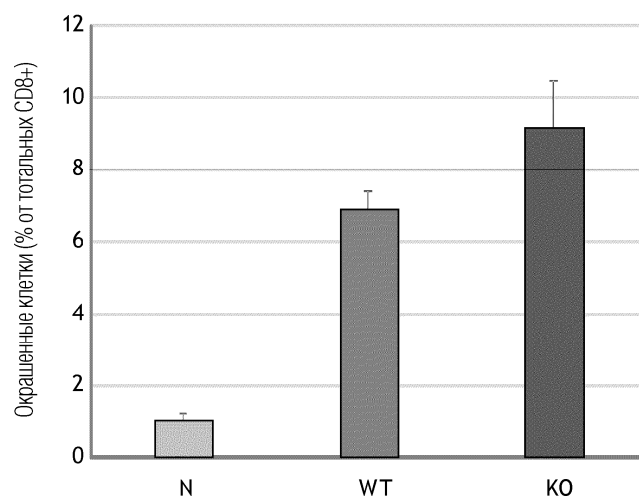
Фиг. 36Е

Эффект GPR174 на размноженные *in vivo* специфические для вируса гриппа CD8<sup>+</sup> клетки после инфекции мышей вирусом гриппа PR8



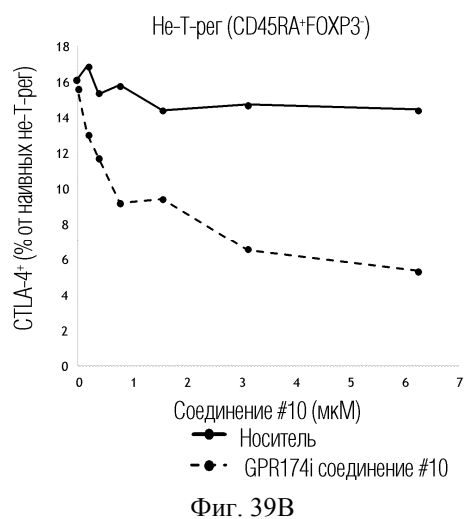
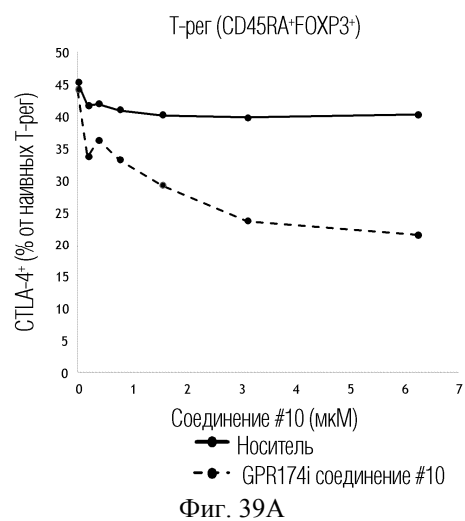
Фиг. 37

Окрашивание декстранером

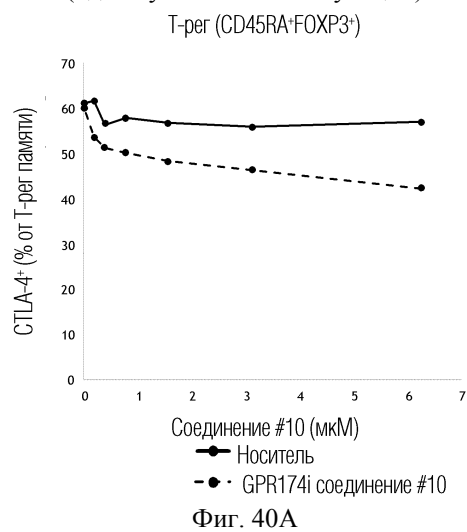


Фиг. 38

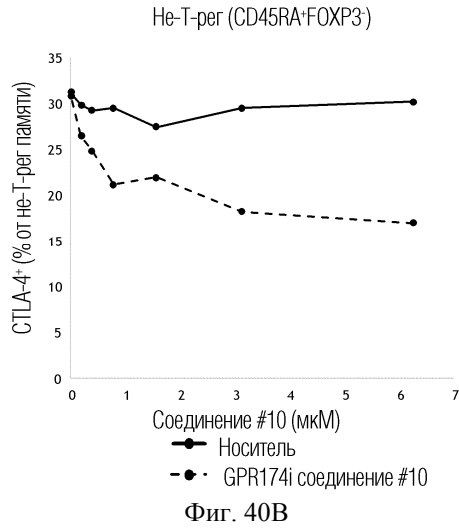
Эффект GPR174i на экспрессию CTLA-4 на наивных  
Т-клетках человека (одни сутки после стимуляции)



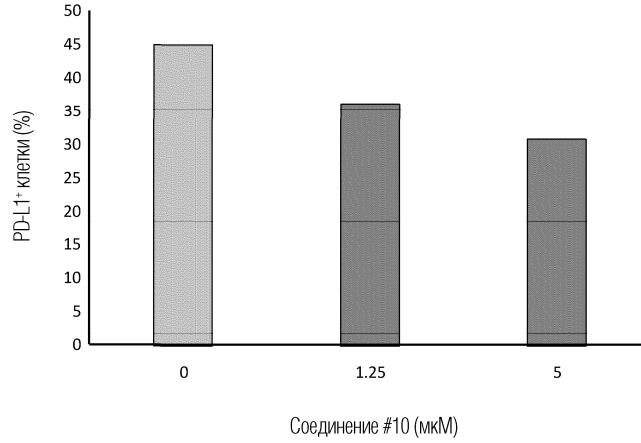
Эффект GPR174i на экспрессию CTLA-4 на Т-клетках памяти человека  
(одни сутки после стимуляции)



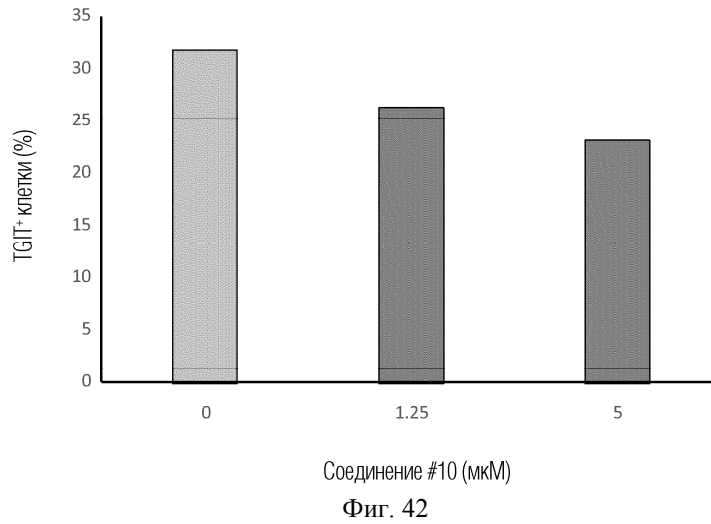




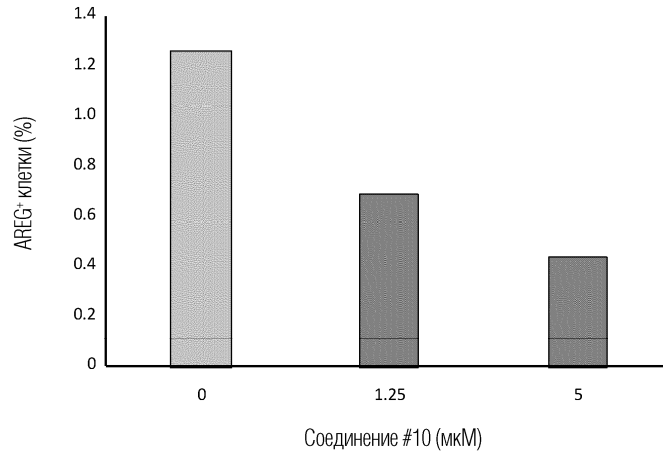
Эффект GPR174i на экспрессию PD-L1 на CD4 T-клетках человека (одни сутки после стимуляции)



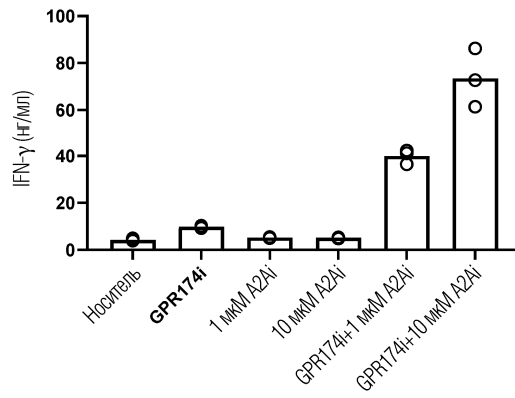
Эффект GPR174i на экспрессию TGIT на CD8 T-клетках человека (одни сутки после стимуляции)



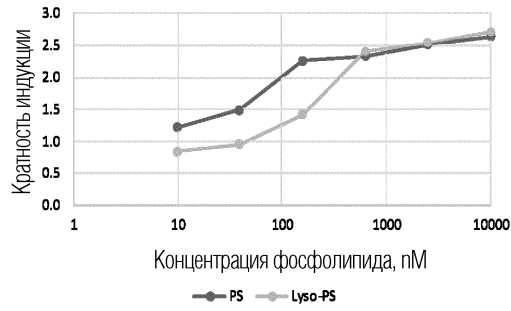
Эффект GPR174i на экспрессию AREG на CD4 T-клетках человека (одни суши после стимуляции)



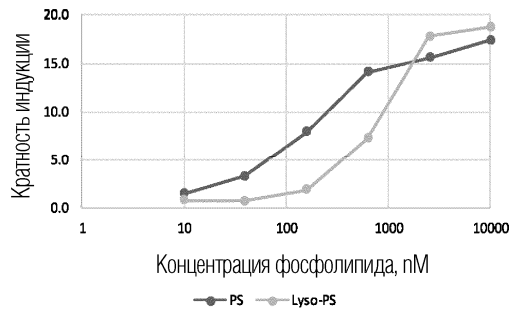
Фиг. 43



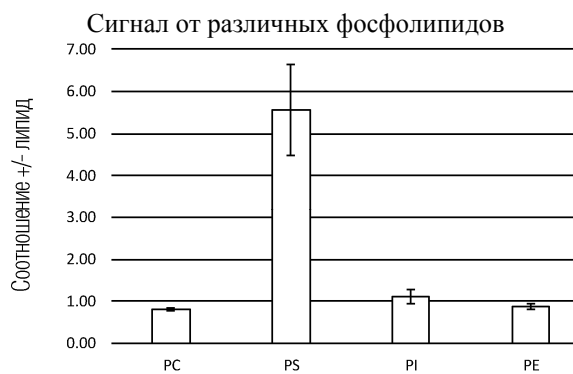
Фиг. 44



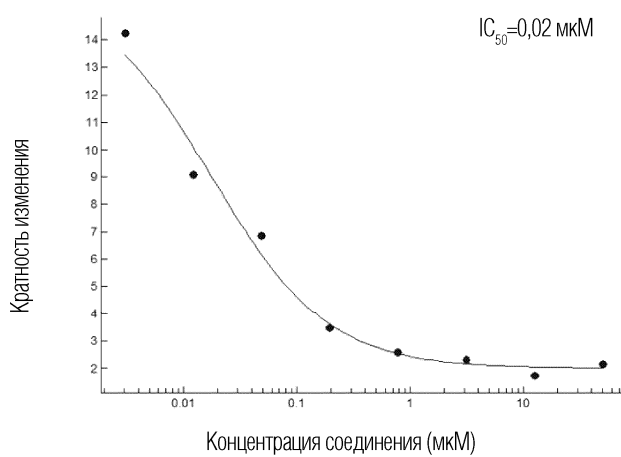
Фиг. 45А



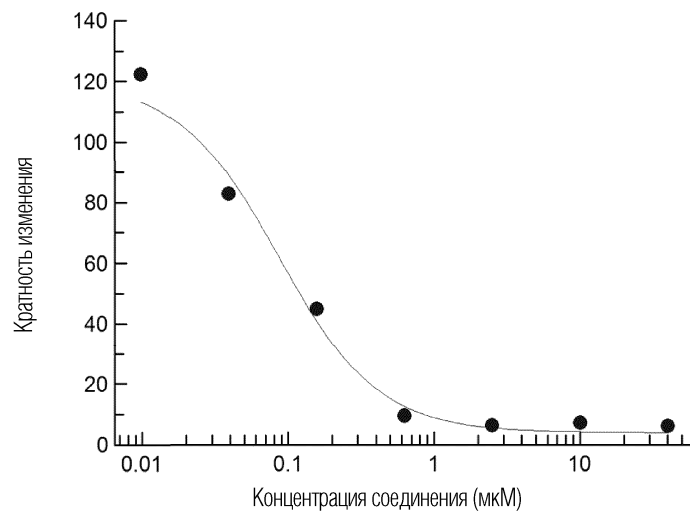
Фиг. 45В



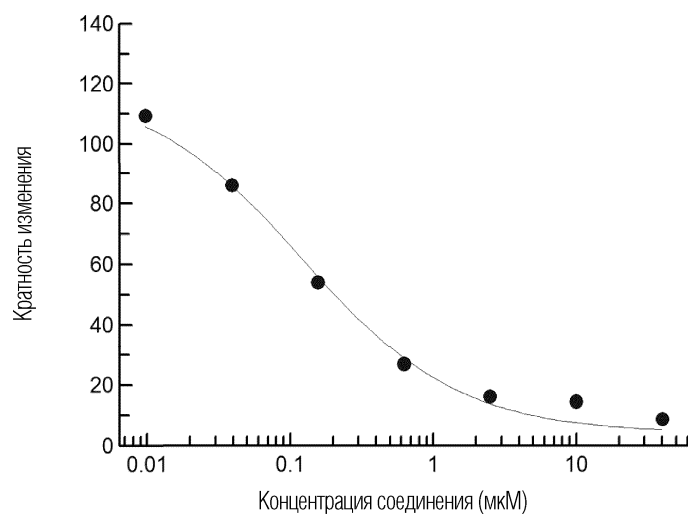
Фиг. 46



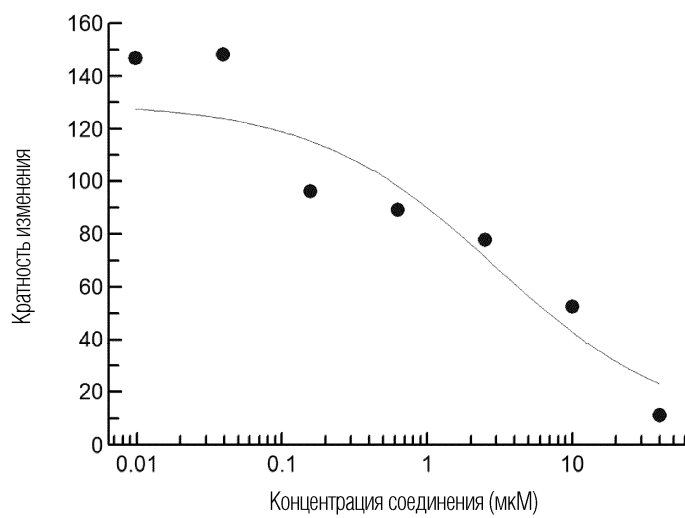
Фиг. 47А



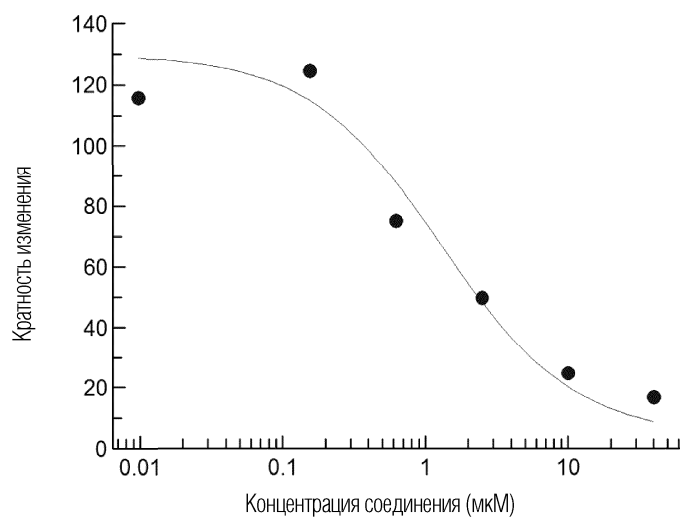
Фиг. 47В



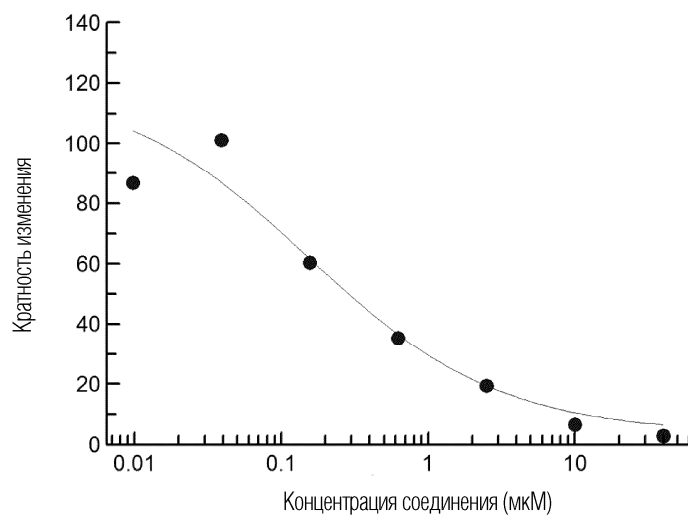
Фиг. 47С



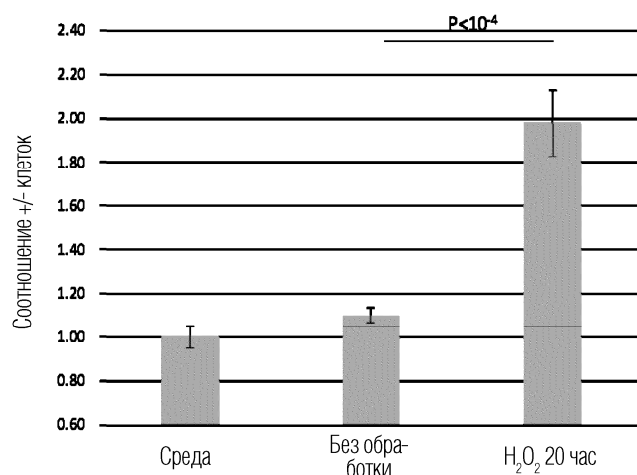
Фиг. 47D



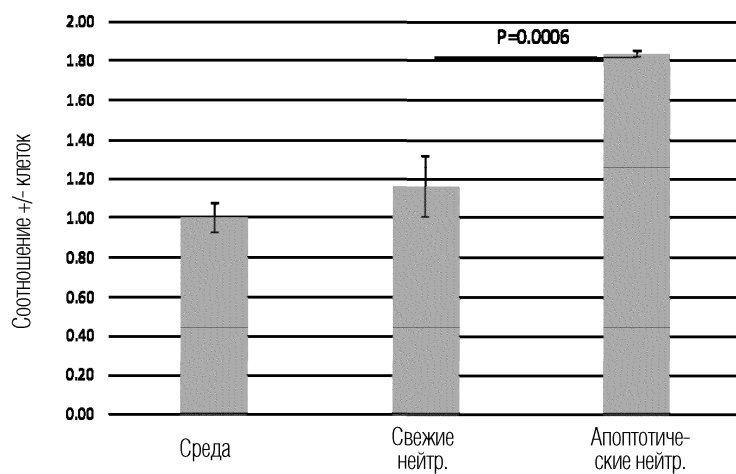
Фиг. 47E



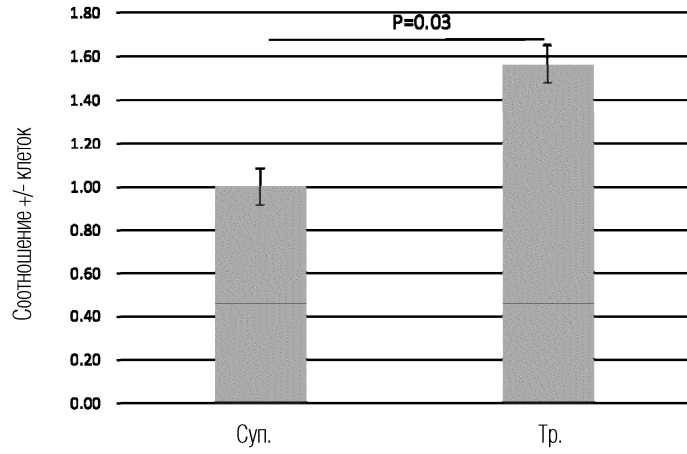
Фиг. 47F



Фиг. 48А

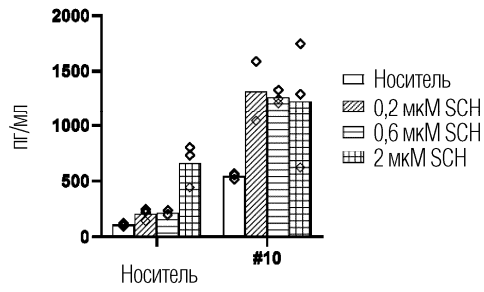


Фиг. 48В



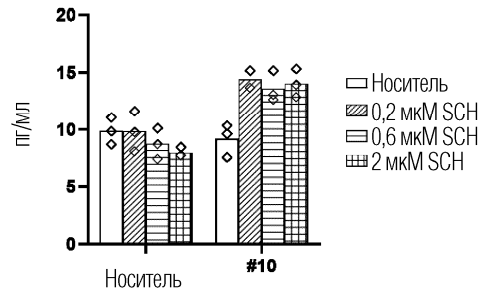
Фиг. 48С

IFN- $\gamma$



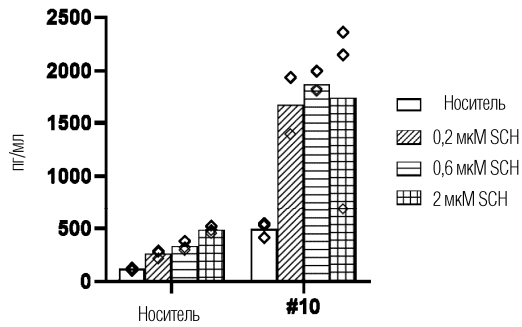
Фиг. 49А

IL-2

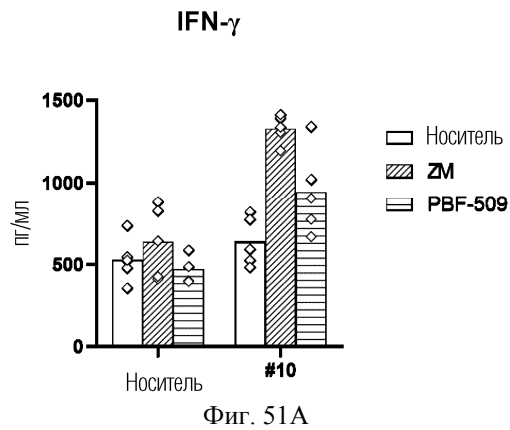
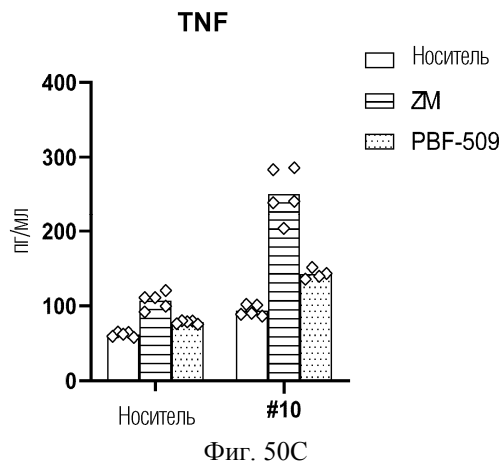
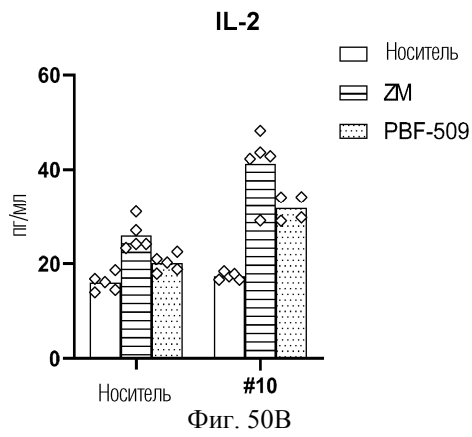
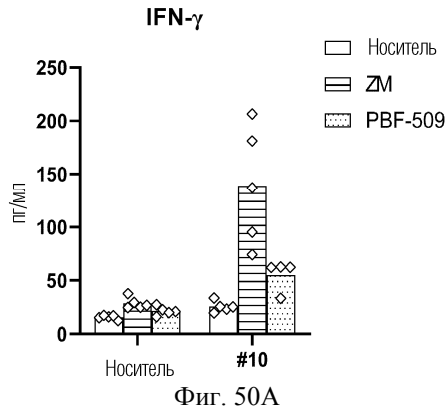


Фиг. 49В

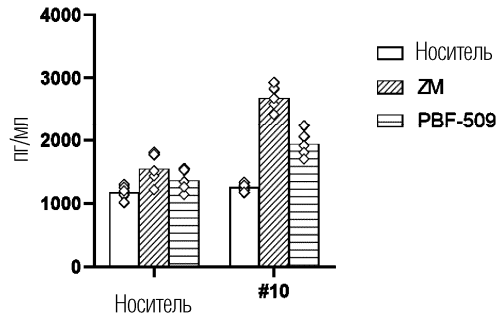
TNF



Фиг. 49С



IL-2



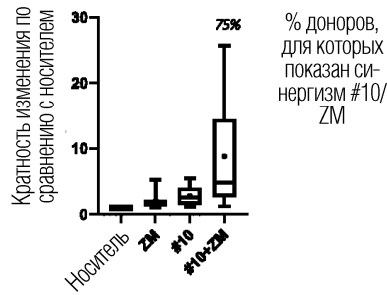
Фиг. 51В

TNF



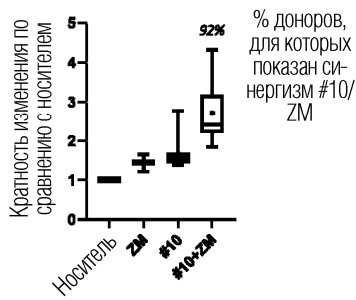
Фиг. 51С

IFN- $\gamma$



Фиг. 52А

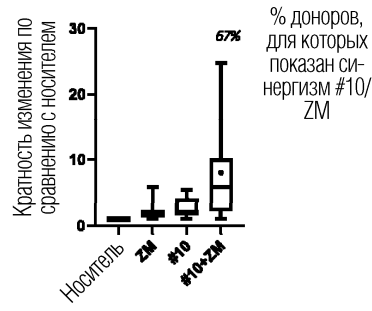
IL-2



Фиг. 52В

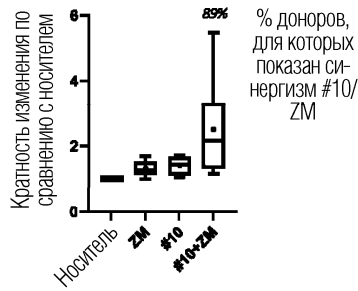


**TNF**



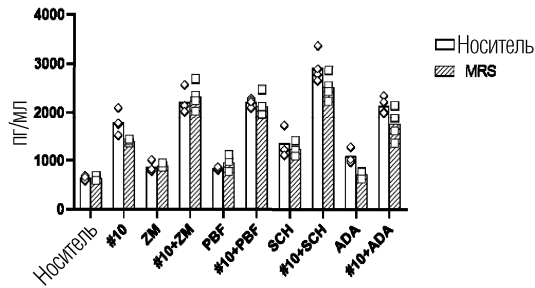
Фиг. 52С

**GM-CSF**



Фиг. 52D

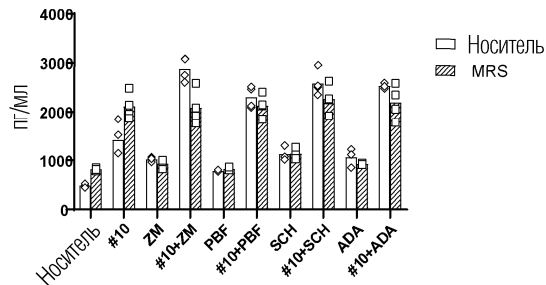
**IFN- $\gamma$**



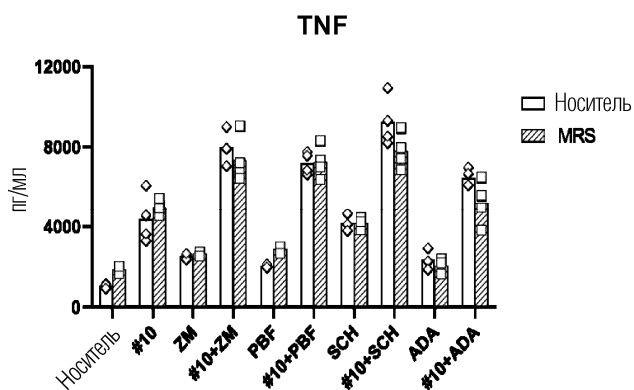
Фиг. 53А

**IL-2**

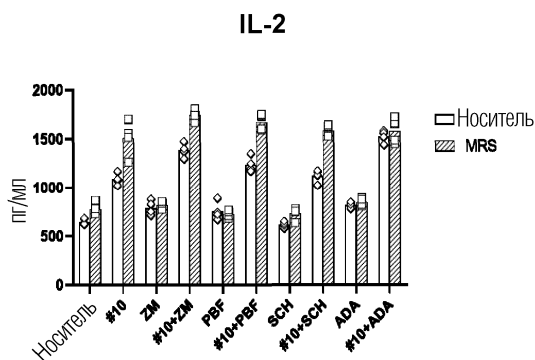
IL-2, донор 403



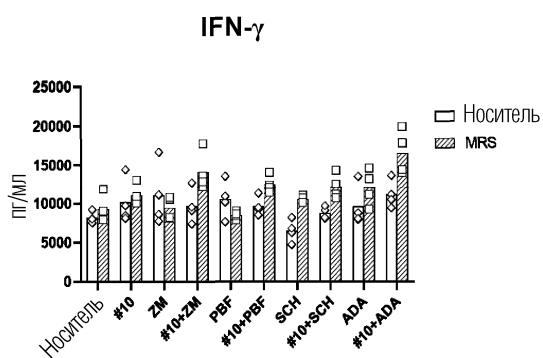
Фиг. 53В



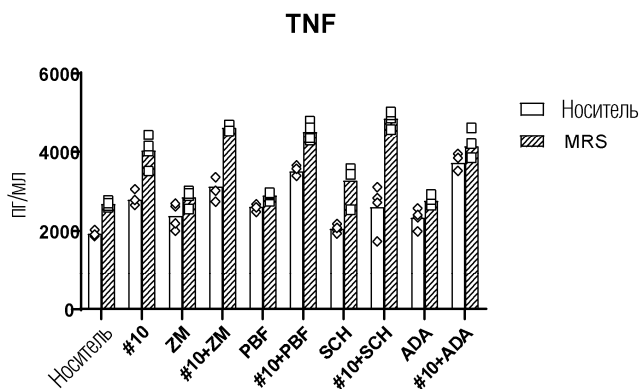
Фиг. 53С



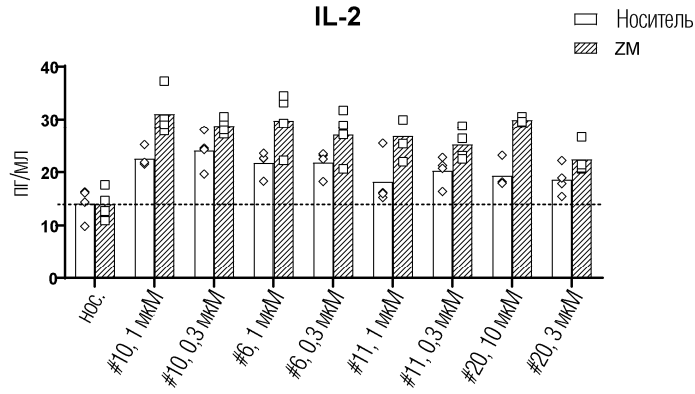
Фиг. 54А



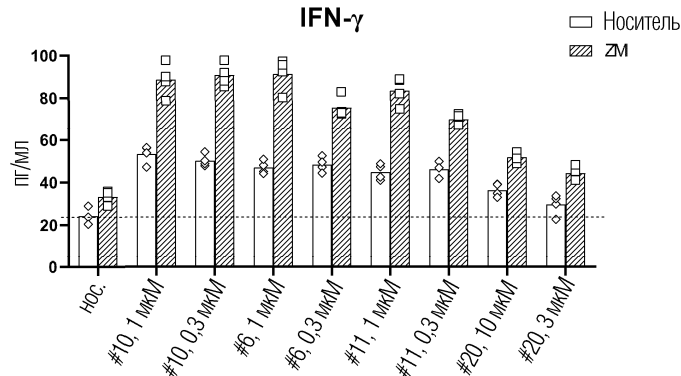
Фиг. 54В



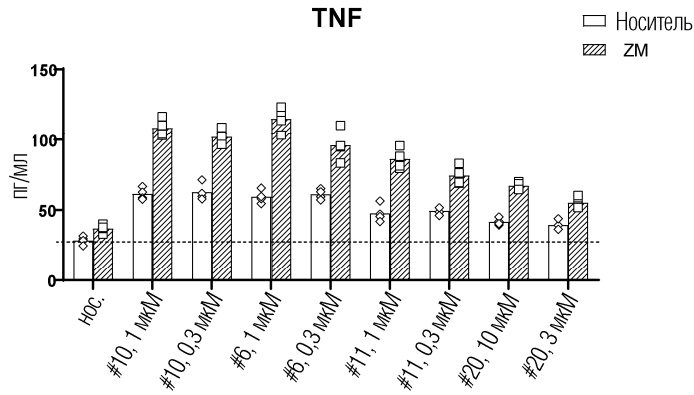
Фиг. 54С



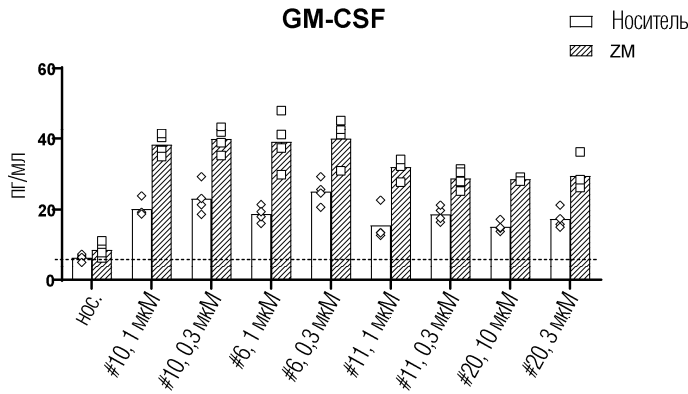
Фиг. 55А



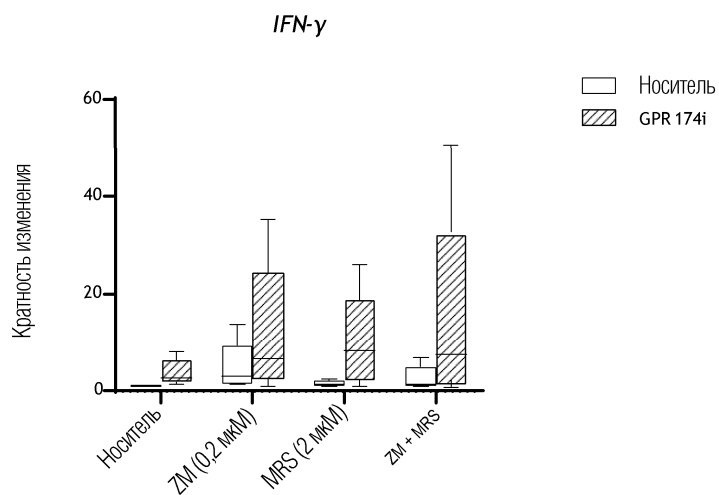
Фиг. 55В



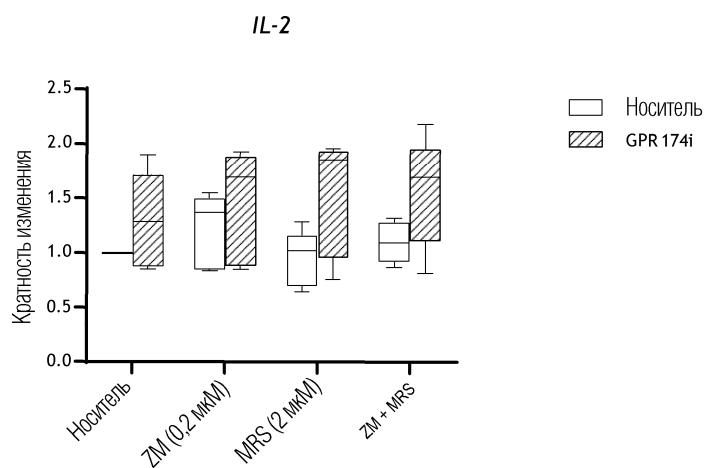
Фиг. 55С



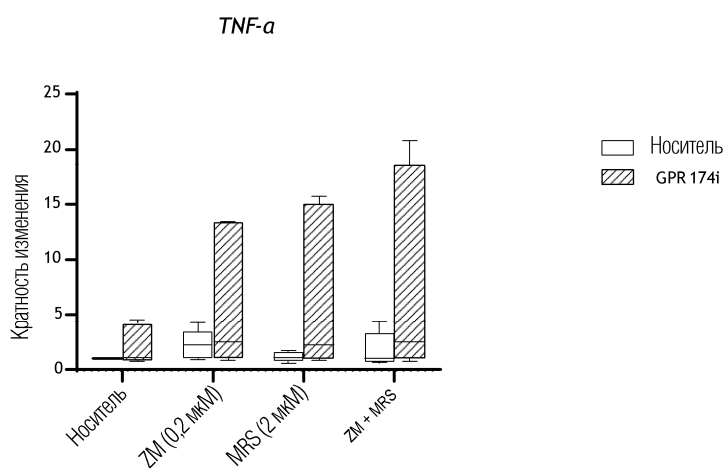
Фиг. 55D



Фиг. 56А

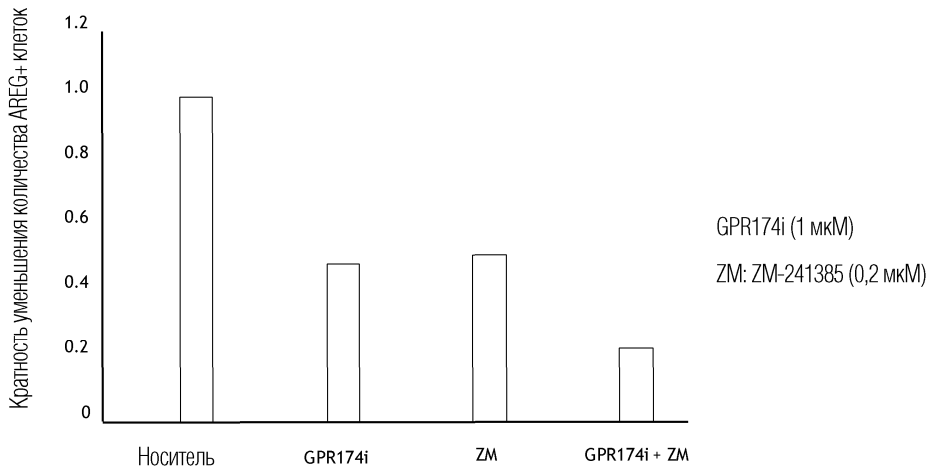


Фиг. 56В



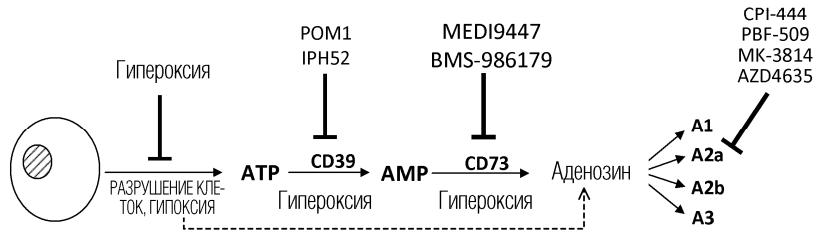
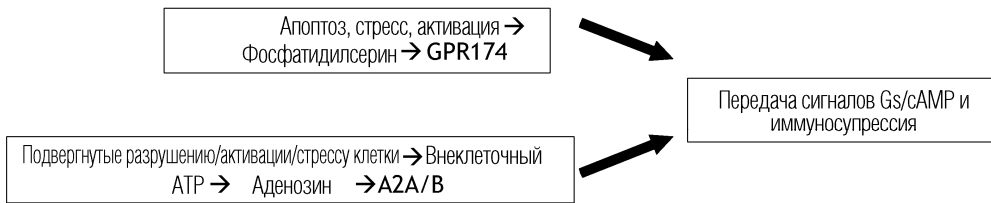
Фиг. 56С

Активированные CD4+ T-клетки



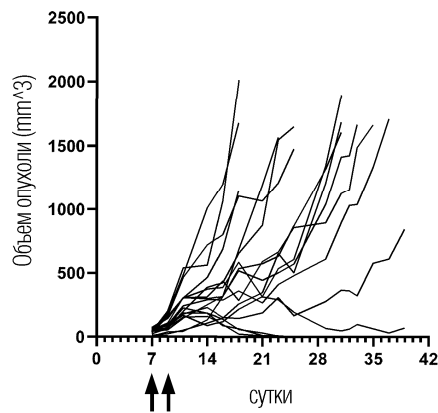
Фиг. 57

Как GPR174, так и рецепторы аденозина отвечают на продукты стресса и гибели клеток

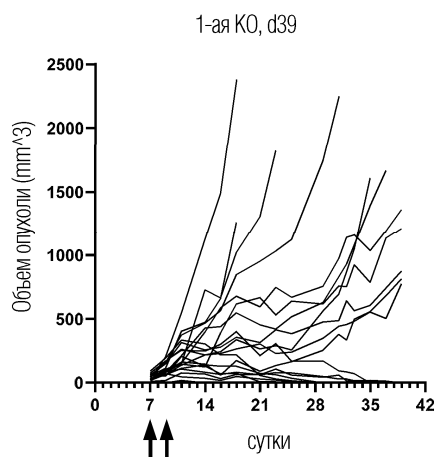


Фиг. 58

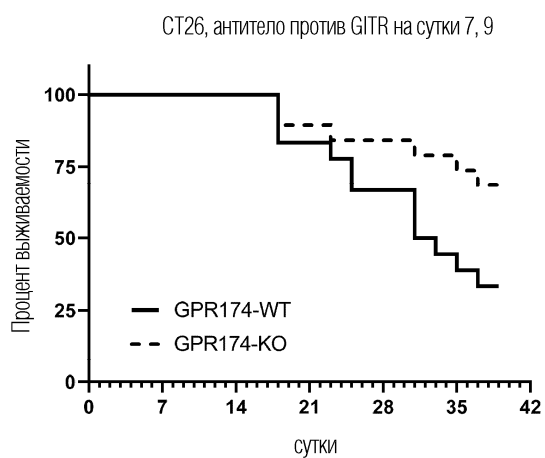
1-ая WT, d39



Фиг. 59А



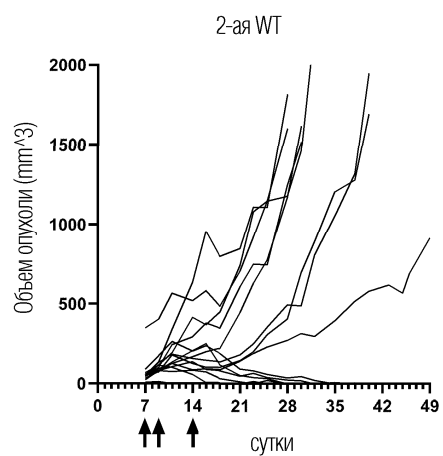
Фиг. 59В



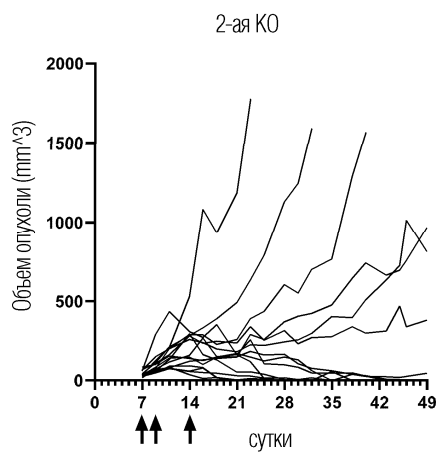
$p = 0.03$

Логарифмический ранговый критерий

Фиг. 60

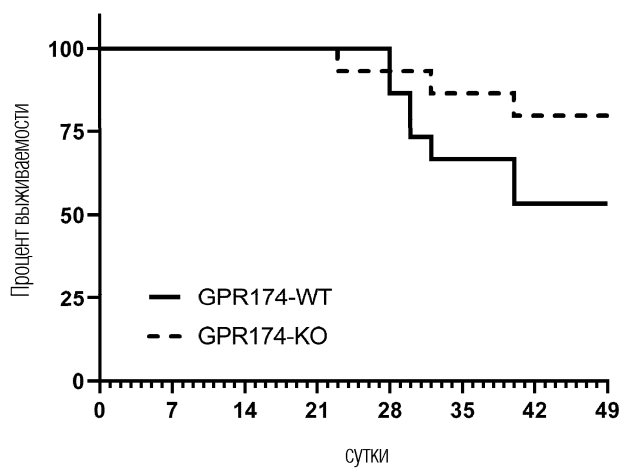


Фиг. 61А

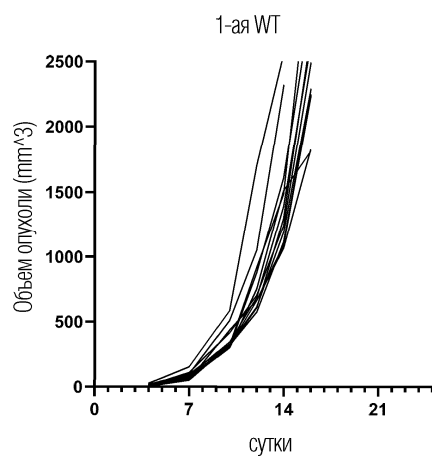


Фиг. 61В

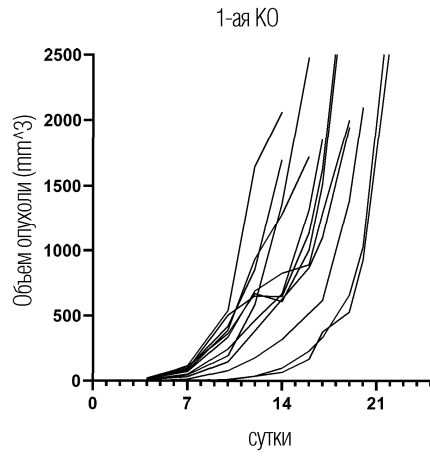
СТ26, антитело против G1TR на сутки 7, 9, 14



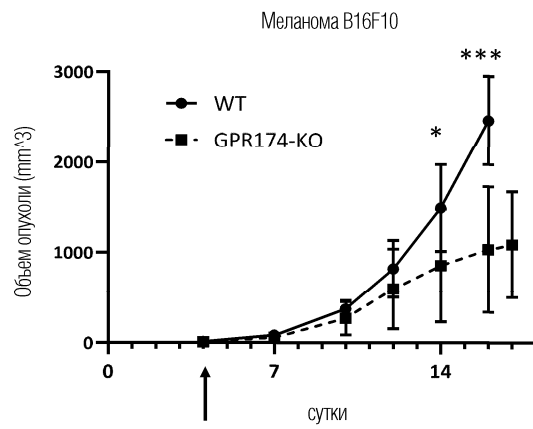
Фиг. 62



Фиг. 63А

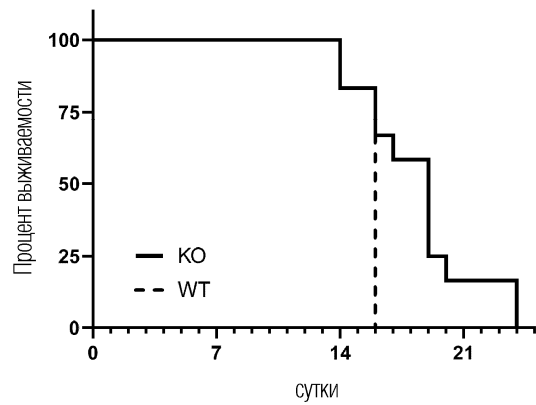


Фиг. 63В



Фиг. 63С

В16F10, антитело против GITR, d4

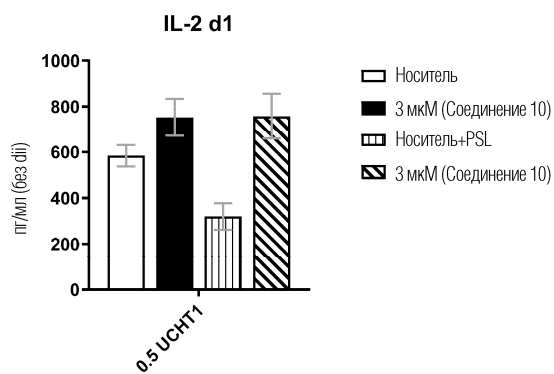


$p = 0.006$

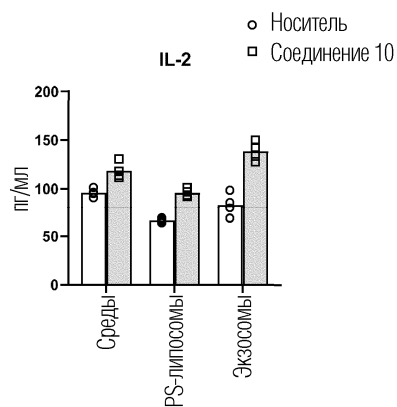
Логарифмический ранговый критерий

Фиг. 64

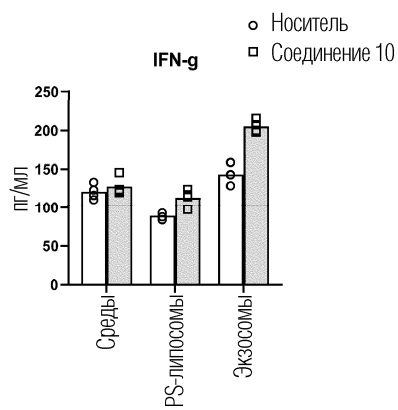




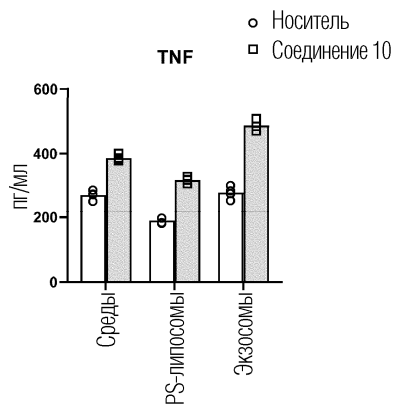
Фиг. 65



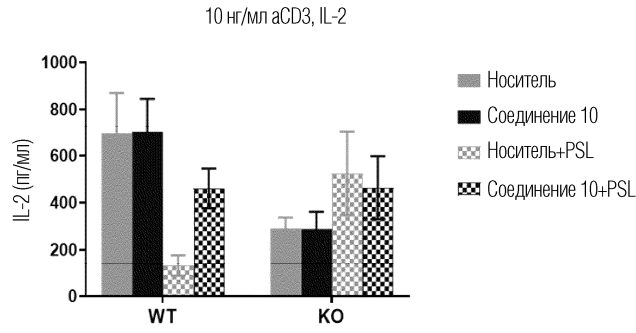
Фиг. 66А



Фиг. 66В

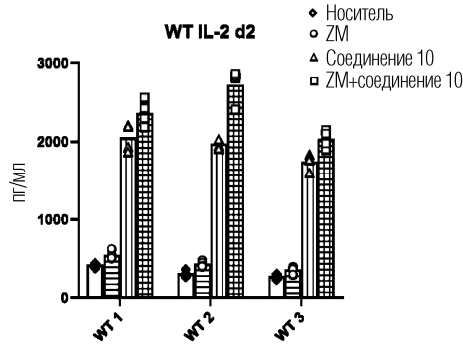


Фиг. 66С

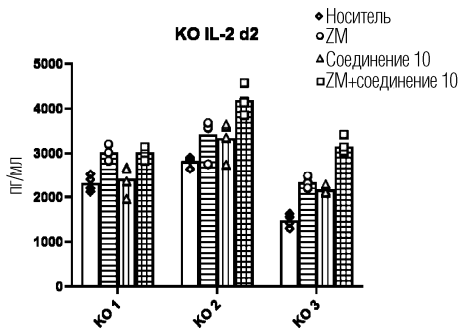


Очищенные Т-клетки, стимулированные связанными с планшетом CD3/28

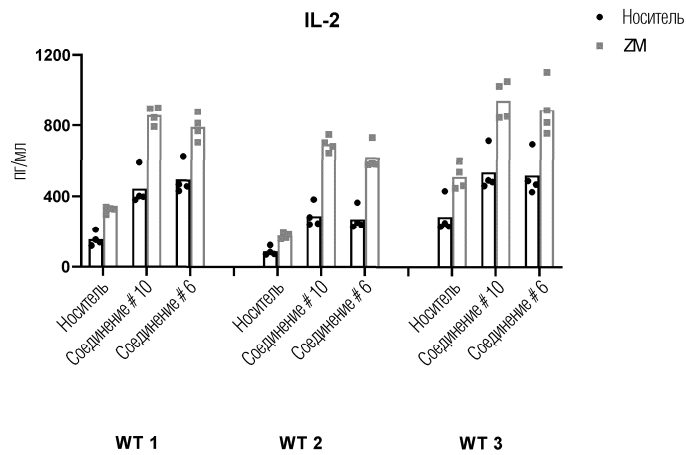
Фиг. 67



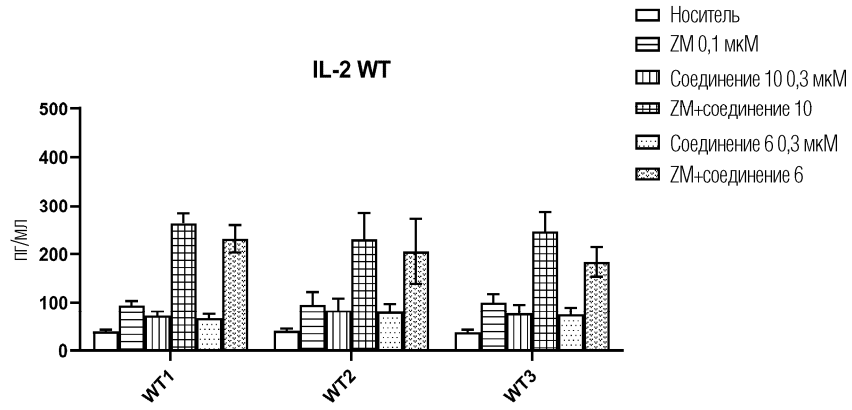
Фиг. 68А



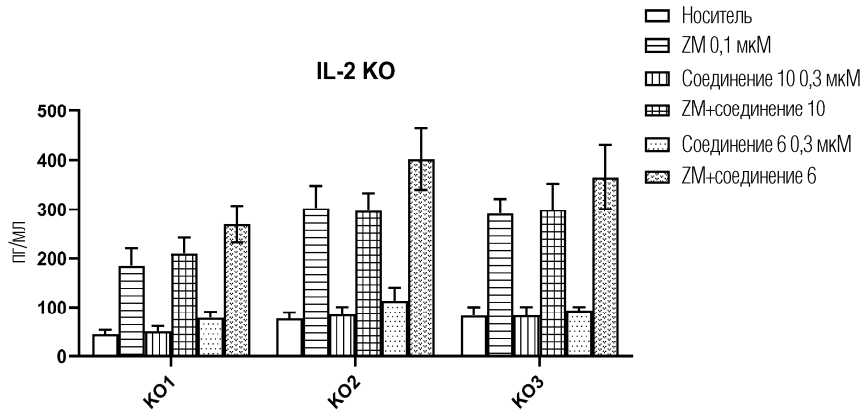
Фиг. 68В



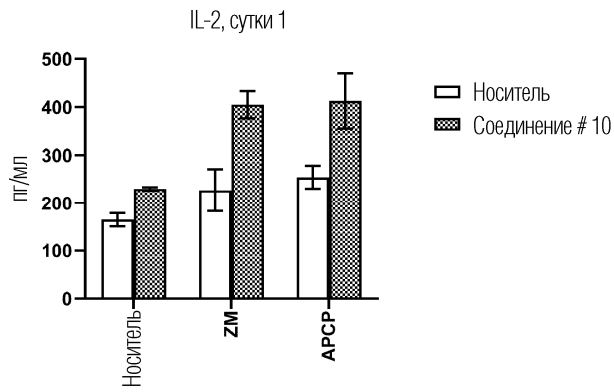
Фиг. 69



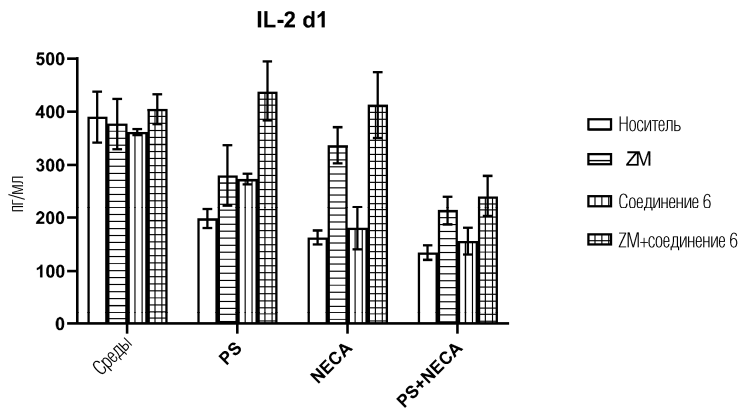
Фиг. 70А



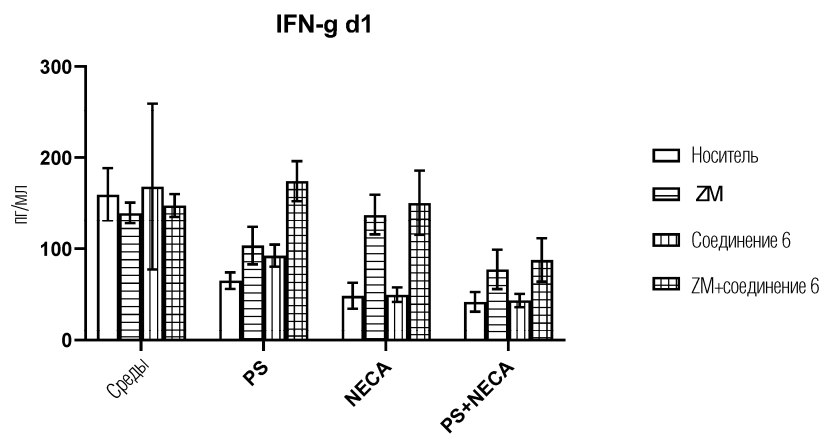
Фиг. 70В



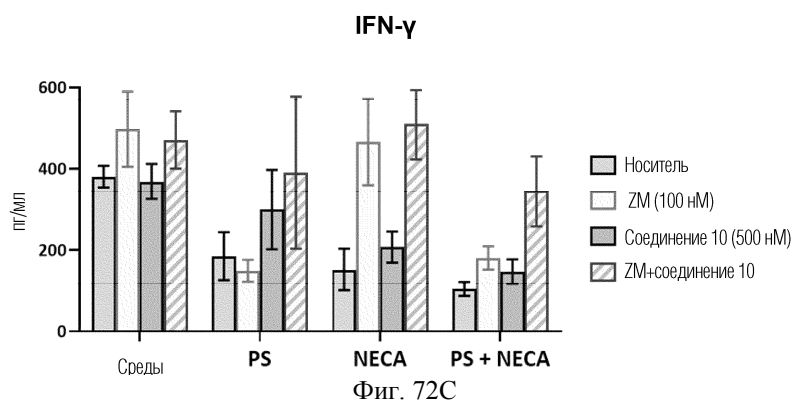
Фиг. 71



Фиг. 72А



Фиг. 72В



Фиг. 72С

