

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392951 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.12.15

(51) Int. Cl. C07K 14/705 (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.04.22

(54) СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ НИКОТИНОВОГО АЦЕТИЛХОЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/178,813

(72) Изобретатель:

(32) 2021.04.23

Бредт Дэвид С., Гу Шэньянь,
О'Кэрролл Миньлэй (US)

(33) US

(86) PCT/EP2022/060744

(74) Представитель:

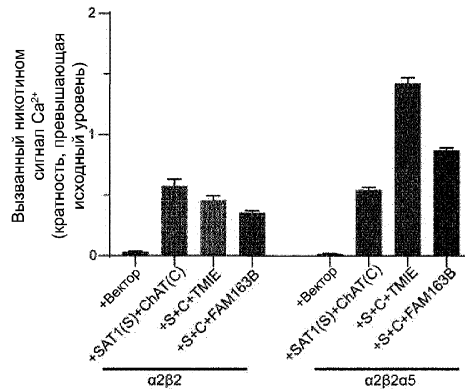
(87) WO 2022/223806 2022.10.27

Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)

(71) Заявитель:

ЯНССЕН ФАРМАЦЕВТИКА НВ (BE)

(57) В настоящем документе описаны выделенные рекомбинантные клетки для экспрессии никотинового ацетилхолинового рецептора $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ (nAChR) и их способов применения.



202392951 A1

202392951 A1

СИСТЕМЫ ЭКСПРЕССИИ НИКОТИНОВОГО АЦЕТИЛХОЛИНОВОГО РЕЦЕПТОРА АЛЬФА2АЛЬФА5БЕТА2 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

5

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

Данная заявка испрашивает преимущество предварительной заявки на патент США № 63/178,813, поданной 23 апреля 2021 г., которая полностью включена в настоящий документ путем ссылки.

10

ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к выделенным рекомбинантным клеткам для экспрессии $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ никотинового ацетилхолинового рецептора (nAChR) и способам их применения.

15

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ, ПОДАННЫЙ В ЭЛЕКТРОННОМ ВИДЕ

Рассматриваемая в данный момент заявка содержит перечень последовательностей, представленный в электронном виде в формате ASCII и в полном объеме включенный в настоящий документ путем ссылки. Копия указанного перечня в формате ASCII, созданная 28 февраля 2022 г., называется PRD4128WOPCT1_SL.txt и имеет размер 24 576 байт.

20

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR) играют роль в ряде неврологических и психиатрических состояний, включая никотиновую зависимость, боль и психотические расстройства (Gotti et al., Neuronal nicotinic receptors: from structure to pathology, Prog Neurobiol. 2004 Dec;74(6):363-96). Никотиновая зависимость, связанная с курением, является основной причиной рака легких. Полногеномные поиски ассоциаций показывают, что нуклеотидный полиморфизм (SNP) *rs16969968*, который кодирует изменение (D398N) в последовательности $\alpha 5$ -субъединицы nAChR, увеличивает восприимчивость к никотиновой зависимости. Хабенуло-интерпедункулярный путь, который специфически обогащен $\alpha 5$ nAChR, представляет собой ключевую нейросхему, контролирующую потребление никотина. По этим

30

причинам $\alpha 5$ nAChR была предложена в качестве ценной мишени для лекарственных средств (Fowler et al., Habenular nicotinic receptors containing the $\alpha 5^*$ subunit controls nicotine intake, Nature. 2011 Mar 31; 471(7340): 597–601; Maskos, The nicotinic receptor alpha5 coding polymorphism *rs16969968* as a major target in disease: Functional dissection and remaining challenges, Journal of Neurochemistry. 2020:154-241-250). Однако
5 идентификация соединений, которые модулируют $\alpha 5$ -содержащие nAChR (такие как $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR), оказалась невозможной, поскольку данный рецептор функционально не экспрессируется в рекомбинантных клеточных линиях, как правило, используемых для поиска новых лекарственных средств.

10 По-прежнему существует необходимость в разработке линии клеток, которая бы активно экспрессировала $\alpha 5$ -субъединицу nAChR и могла бы быть использована для поиска новых лекарственных средств.

КРАТКОЕ ИЗЛОЖЕНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

15 В данном документе предложены выделенные рекомбинантные клетки, содержащие: а) гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую $\alpha 5$ -субъединицу никотинового ацетилхолинового рецептора (nAChR), и б) гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую белок-шаперон, выбранный из трансмембранного экспрессируемого во внутреннем ухе белка TMIE и белка FAM163B.

20 В одном варианте осуществления выделенных рекомбинантных клеток, предложенных выше, клетки дополнительно содержат: с) гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую $\alpha 2$ -субъединицу nAChR; d) гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую $\beta 2$ -субъединицу nAChR; e) гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую диаминацетилтрансферазу 1 (SAT1); и f)
25 гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую холин-О-ацетилтрансферазу (CHAT), причем $\alpha 2$ -, $\alpha 5$ - и $\beta 2$ -субъединицы nAChR образуют $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR.

В дополнительном варианте осуществления выделенных рекомбинантных клеток рекомбинантные клетки представляют собой клетки млекопитающего.

30 В еще одном дополнительном варианте осуществления выделенных рекомбинантных клеток клетки млекопитающего выбраны из группы, состоящей из клетки эмбриональной почки человека 293T (HEK293T), клетки HEK293F, клетки HeLa, клетки яичника китайского хомячка (CHO), клетки NIH3T3, клетки MCF-7, клетки Hep G2, клетки почки новорожденного хомячка (ВНК) и клетки Cosm7.

В еще одном варианте осуществления выделенных рекомбинантных клеток $\alpha 2$ -субъединица nAChR $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

5 В еще одном варианте осуществления выделенных рекомбинантных клеток $\alpha 5$ -субъединица nAChR $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

10 В еще одном варианте осуществления выделенных рекомбинантных клеток $\beta 2$ -субъединица nAChR $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3.

15 В еще одном варианте осуществления выделенных рекомбинантных клеток TMIE содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4.

В еще одном варианте осуществления выделенных рекомбинантных клеток FAM163B содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5.

20 В еще одном варианте осуществления выделенных рекомбинантных клеток SAT1 содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6.

В еще одном варианте осуществления выделенных рекомбинантных клеток СНАТ содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7.

25 В данном документе дополнительно предложены способы идентификации агонистов, антагонистов или положительных аллостерических модуляторов $\alpha 5$ -содержащего nAChR, причем способ включает в себя: а) приведение в контакт выделенной рекомбинантной клетки по любому из пп. 1–11 с агентом и б) определение активности $\alpha 5$ -содержащего nAChR из выделенной рекомбинантной клетки, причем
30 агент идентифицирован как агонист или положительный аллостерический модулятор (РАМ), если агент усиливает активность $\alpha 5$ -содержащего nAChR, и агент идентифицирован как антагонист, если агент снижает активность $\alpha 5$ -содержащего nAChR по сравнению с активностью $\alpha 5$ -содержащего nAChR, когда выделенная рекомбинантная клетка не была приведена в контакт с агентом.

Кроме того, в данном документе предложены способы идентификации агонистов, антагонистов или положительных аллостерических модуляторов $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR, причем способ включает в себя: а) приведение в контакт выделенной рекомбинантной клетки по любому из пп. 2–11 с агентом и б) определение активности $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR выделенной рекомбинантной клетки, причем агент идентифицируется как агонист или положительный аллостерический модулятор (РАМ), если агент усиливает активность $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR, и агент идентифицируется как антагонист, если агент снижает активность $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR по сравнению с активностью $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR, когда выделенная рекомбинантная клетка не была приведена в контакт с агентом.

В одном варианте осуществления способа стадия б) включает в себя определение потока кальция выделенной рекомбинантной клетки, причем агент идентифицируется как агонист, если агент усиливает поток кальция по сравнению с потоком кальция, когда выделенная рекомбинантная клетка не была приведена в контакт с агентом.

В дополнительном варианте осуществления способа стадия б) включает в себя определение потока кальция и вызванного никотином потока кальция выделенной рекомбинантной клетки, причем агент идентифицируется как РАМ, если агент не усиливает поток кальция и усиливает вызванный никотином поток кальция по сравнению с потоком кальция и вызванным никотином потоком кальция, когда выделенная рекомбинантная клетка не была приведена в контакт с агентом

В еще одном варианте осуществления способа стадия б) включает определение вызванного никотином потока кальция выделенной рекомбинантной клетки, причем агент идентифицируется как антагонист, если агент снижает вызванный никотином поток кальция по сравнению с вызванным никотином потоком кальция, когда выделенная рекомбинантная клетка не контактирует с агентом.

В еще одном дополнительном варианте осуществления способа выделенную рекомбинантную клетку инкубируют при температуре приблизительно 25–35 °С в течение приблизительно 20–50 часов до приведения в контакт с агентом.

В еще одном варианте осуществления способа агент представляет собой малую молекулу или пептид.

Кроме того, в данном документе предложены наборы, содержащие (i) выделенные рекомбинантные клетки, как предложено выше, и (ii) инструкции по применению.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 представлен график, на котором показана функциональная экспрессия $\alpha 2\beta 2$ nAChR и $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR при совместной экспрессии с различными белками-шаперонами.

5 На Фиг. 2 представлены кривые ответа в зависимости от концентрации для вызванной никотином активации $\alpha 2\beta 2$ nAChR и $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR при совместной экспрессии с различными белками-шаперонами.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

10 В разделе «Предпосылки создания изобретения» и в тексте настоящей заявки приведены цитаты или описания различных публикаций, статей и патентов; каждая из этих ссылок полностью включена в настоящее описание путем ссылки. Описание документов, актов, материалов, устройств, изделий и т. п., которые были включены в настоящее описание, приведено в качестве контекста для изобретения. Такое описание не является допущением того, что любой из таких источников или все такие источники являются частью предшествующего уровня техники в отношении каких-либо описываемых или заявленных изобретений.

15 Если не указано иное, все технические и научные термины в настоящем документе имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в области, к которой относится данное изобретение. В ином случае определенные термины в настоящем документе имеют значения, установленные в описании.

20 Необходимо отметить, что в настоящем документе и в приложенной формуле изобретения форма единственного числа включает в себя объекты и во множественном числе, если из контекста явно не следует иное.

25 Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные в настоящем документе, следует понимать как модифицированные во всех случаях термином «около». Таким образом, числовое значение, как правило, включает $\pm 10\%$ от указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает в себя от 0,9 мг/мл до 1,1 мг/мл. Аналогичным образом диапазон концентраций от 1% до 10% (масс./об.) включает в себя от 0,9% (масс./об.) до 30 11% (масс./об.). В настоящем документе применение числового диапазона явным образом включает все возможные поддиапазоны, все отдельные числовые значения в пределах этого диапазона, включая целые числа в пределах таких диапазонов и дробные значения, если из контекста явно не следует иное.

Если не указано иное, термин «по меньшей мере», предшествующий ряду элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в этом ряду. Специалисты в данной области смогут определять или с помощью лишь стандартных экспериментов смогут устанавливать множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления изобретения, описанного в настоящем документе. Подразумевается, что 5 такие эквиваленты включены в изобретение.

В настоящем документе термины «содержит», «содержащий», «включает», «включающий», «имеет», «имеющий», «содержит» или «содержащий» или любая 10 другая их вариация подразумевают включение указанного целого числа или группы целых чисел, но не исключение из него какого-либо другого целого числа или группы целых чисел, и они являются неисключающими или неограничивающими. Например, композиция, смесь, процесс, способ, изделие или устройство, которое содержит 15 перечень элементов, не обязательно ограничивается только этими элементами, но может включать другие элементы, не перечисленные прямо или присущие такой композиции, смеси, процессу, способу, изделию или устройству. Кроме того, если в явной форме не указано иное, союз «или» относится к включающему «или», а не к 20 исключающему «или». Например, условие А или В удовлетворяется любым из следующих условий: А истинно (или присутствует), и В ложно (или отсутствует), А ложно (или отсутствует), и В истинно (или присутствует), и оба А и В являются истинными (или присутствуют).

В настоящем документе соединительный термин «и/или» между множеством 25 перечисляемых элементов следует понимать как включающий в себя как отдельные, так и комбинированные варианты. Например, если два элемента соединены «и/или», первый вариант относится к возможности применения первого элемента без второго. Второй вариант относится к возможности применения второго элемента без первого. Третий вариант относится к возможности одновременного применения первого и 30 второго элементов. Подразумевается, что любой из этих вариантов соответствует значению и, соответственно, удовлетворяет требованию термина «и/или» в контексте настоящего документа. Кроме того, подразумевается, что одновременное применение более одного из этих вариантов соответствует значению и, соответственно, 35 удовлетворяет требованию термина «и/или».

В настоящем документе термин «состоять из» или его варианты, такие как «состоит из» или «состоящий из», используемые в описании и формуле изобретения, указывают на включение любого указанного целого числа или группы целых чисел, но

при этом никакое дополнительное целое число или группа целых чисел не могут быть добавлены к указанному способу, структуре или композиции.

В настоящем документе термин «состоять по существу из» или варианты, такие как «состоит по существу из» или «состоящий по существу из», используемые в описании и формуле изобретения, указывают на включение любого указанного целого 5 числа или группы целых чисел, а также на необязательное включение любого перечисленного целого числа или группы целых чисел, которые существенно не изменяют основные или новые свойства указанного способа, структуры или композиции. См. М.Р.Е.Р. § 2 111.03.

10 Следует также понимать, что термины «около», «приблизительно», «по существу», «главным образом» и подобные термины, используемые в настоящем документе при упоминании размера или характеристики компонента предпочтительного изобретения, указывают на то, что описанный размер/характеристика не является строгой границей или параметром и не исключает 15 незначительных отклонений от них, которые функционально одинаковы или аналогичны, как будет понятно обычному специалисту в данной области. Как минимум такие ссылки, которые включают числовой параметр, будут включать отклонения, которые при использовании математических и промышленных принципов, принятых в данной области (например, округление, измерение или другие систематические ошибки, 20 производственные допуски и т. д.), не изменяют наименьшую значащую цифру.

Термины «идентичный» или процент «идентичности» в контексте двух или более нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются 25 одинаковыми или имеют определенный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми, при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, определяемого с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или путем визуального наблюдения. Для сравнения последовательностей, как правило, одна последовательность выступает в качестве эталонной последовательности, с которой сравнивают испытуемую 30 последовательность. При использовании алгоритма сравнения последовательностей в компьютер вводят испытуемую и эталонную последовательности, при необходимости определяют координаты подпоследовательности и определяют параметры программы алгоритма последовательности. Впоследствии алгоритм сравнения последовательностей рассчитывает процентную идентичность последовательности для

испытуемой (-ых) последовательности (-ей) по отношению к эталонной последовательности на основе заданных параметров программы.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, например, с помощью алгоритма локальной гомологии по Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), с использованием алгоритма выравнивания областей гомологии по Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), с помощью способа поиска подобия по Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), с помощью компьютеризированных реализаций этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., г. Мэдисон, штат Висконсин, США) или путем визуального контроля (см. в основном *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel et al., eds., *Current Protocols*, совместное предприятие компаний Greene Publishing Associates, Inc. и John Wiley & Sons, Inc., (Дополнение, 1995) (Ausubel)).

Примерами алгоритмов, приемлемых для определения процентной идентичности последовательности и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, описанные в работе Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389–3402 соответственно. Программное обеспечение для проведения BLAST-анализов общедоступно через Национальный центр биотехнологической информации. Данный алгоритм включает, во-первых, идентификацию пар высококачественных последовательностей (HSP) путем идентификации коротких слов длиной W в искомой последовательности, которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторому положительному пороговому показателю T при совмещении со словом той же длины в последовательности базы данных. « T » называют пороговым показателем сходства соседних слов (Altschul с соавт. выше). Эти начальные совпадения соседних слов действуют как образец для инициации поиска, чтобы найти более длинные HSP с ними. Совпадения слов затем расширяются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности до тех пор, пока совокупный показатель выравнивания можно увеличивать.

Совокупные баллы вычисляются с использованием параметров M для нуклеотидных последовательностей (балл вознаграждения для пары совпадающих остатков; всегда > 0) и N (штрафной балл за не совпадающие остатки; всегда < 0). Для аминокислотных последовательностей матрицу подсчета баллов используют для расчета совокупного балла. Расширение зачетов слов в каждом направлении прекращает, когда: совокупный балл выравнивания падает на величину X от его

максимального достигнутого значения; совокупный балл стремится к нулю или ниже вследствие накопления одного или более отрицательных баллов выравнивания остатков; или в конце каждой последовательности. Параметры W , T и X алгоритма BLAST определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) по умолчанию используют длину слова (W), равную 11, ожидание (E), равное 10, $M = 5$, $N = -4$, а также сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей в программе BLASTP по умолчанию используют длину слова (W), равную 3, ожидание (E), равное 10, и матрицу замен BLOSUM62 (см., Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1992)).

10 В дополнение к проценту идентичности последовательности, алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ сходства двух последовательностей (см., например, Karlin & Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873–5787 (1993)). Одно измерение сходства, проводимое алгоритмом BLAST, заключается в определении наименьшей суммарной вероятности ($P(N)$), которая указывает на вероятность, при которой совпадение двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей 15 будет происходить случайным образом. Например, нуклеиновая кислота считается аналогичной эталонной последовательности, если наименьшая суммарная вероятность при сравнении исследуемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой составляет менее около 0,1, более предпочтительно менее около 0,01, а наиболее 20 предпочтительно менее около 0,001.

Дополнительным показателем по существу идентичности двух нуклеотидных последовательностей или двух полипептидов является иммунологическое перекрестное реагирование полипептида, кодируемого первой нуклеиновой кислотой, с полипептидом, кодируемым второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким 25 образом, полипептид, как правило, по существу идентичен второму полипептиду, например когда два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим признаком по существу идентичности двух нуклеотидных последовательностей является гибридизация этих двух молекул друг с другом в строгих условиях.

В настоящем документе термин «полинуклеотид», который является синонимом термина «молекула нуклеиновой кислоты», «нуклеотиды» или «нуклеиновые кислоты», 30 относится к любому полирибонуклеотиду или полидезоксирибонуклеотиду, который может представлять собой немодифицированную РНК или ДНК или модифицированную РНК или ДНК. «Полинуклеотиды» включают, без ограничений, одно- и двухцепочечные ДНК, ДНК, которые представляют собой смесь одно- и

двухцепочечных областей, одно- и двухцепочечные РНК, РНК, которые представляют собой смесь одно- и двухцепочечных областей, слитые молекулы, содержащие ДНК и РНК, которые могут быть одноцепочечными или, как правило, двухцепочечными или представлять собой смесь одно- и двухцепочечных областей. Кроме того,

5 «полинуклеотидом» называют трехцепочечные области, содержащие РНК или ДНК, или как РНК, так и ДНК. Термин «полинуклеотид» также включает ДНК или РНК, содержащую одно или более модифицированных оснований, и ДНК или РНК с основными цепями, модифицированными для стабильности или для других целей. «Модифицированные» основания включают, например, тритилированные основания и нетипичные основания, такие как инозин. В ДНК и РНК могут быть внесены различные модификации; следовательно, термин «полинуклеотид» охватывает химически, ферментативно или метаболически модифицированные формы полинуклеотидов, как правило, встречающиеся в природе, а также химические формы ДНК и РНК, характерные для вирусов и клеток. Термин «полинуклеотид» также охватывает
10 относительно короткие цепи нуклеиновых кислот, часто называемые олигонуклеотидами.

В настоящем документе термины «пептид», «полипептид» или «белок» могут относиться к молекуле, образованной из аминокислот, и могут быть признаны специалистами в данной области как белок. В настоящем документе используется
20 обычный однобуквенный или трехбуквенный код для аминокислотных остатков. Термины «пептид», «полипептид» и «белок» могут применяться взаимозаменяемо и относятся к полимерам аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты и неаминокислотные перемиčky. Термины также охватывают аминокислотный полимер, который был модифицирован естественным образом или посредством вмешательства;
25 например, это может быть образование дисульфидной связи, гликозилирование, липидизация, ацетилирование, фосфорилирование или любая другая манипуляция или модификация, такая как конъюгация с маркирующим компонентом. Определение также включает в себя, например, полипептиды, содержащие один или более аналогов
30 аминокислот (включая, например, неприродные аминокислоты и т. п.), а также другие модификации, известные в данной области.

Пептидные последовательности, описанные в настоящем документе, написаны в соответствии с обычной процедурой, где N-концевая область пептида находится слева, а С-концевая область расположена справа. Хотя известны изомерные формы

аминокислот, они представляют собой L-форму представленной аминокислоты, если явным образом не указано иное.

Выделенные рекомбинантные клетки и способы получения рекомбинантных клеток

Изобретения, описанные в настоящем документе, основаны по меньшей мере частично на неожиданном открытии того, что совместная экспрессия определенных белков-шаперонов с $\alpha 5$ -содержащими никотиновыми ацетилхолиновыми рецепторами (nAChR) (такими как $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR) в клетках приводила к образованию клеток, которые в высокой степени экспрессируют $\alpha 5$ -содержащий nAChR, что делает эти клетки пригодными для открытия лекарственного средства. В данном документе предложены способы получения рекомбинантных клеток, экспрессирующих $\alpha 5$ -субъединицу nAChR, и выделенных рекомбинантных клеток для экспрессии $\alpha 5$ -субъединицы nAChR. Также в данном документе предложены способы получения рекомбинантных клеток, экспрессирующих $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR, и выделенных рекомбинантных клеток для экспрессии $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR.

В контексте данного документа термины «никотиновый ацетилхолиновый рецептор $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ », « $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR», «никотиновый ацетилхолиновый рецептор альфа2альфа5бета2» и «альфа2альфа5бета2 nAChR» используются взаимозаменяемо и относятся к белку никотинового рецептора ацетилхолина $\alpha 2\alpha 5\beta 2$, предпочтительно $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR человека, который является членом семейства белков холинергических рецепторов.

$\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR представляет собой лиганд-зависимый ионный канал, состоящий из $\alpha 2$ -, $\alpha 5$ - и $\beta 2$ -субъединиц. $\alpha 2$ -субъединица кодируется геном CHRNA2 (NM_000742), $\alpha 5$ -субъединица кодируется геном CHRNA5 (NM_000745), а $\beta 2$ -субъединица кодируется геном CHRNB2 (NM_000748). При совместной экспрессии субъединицы совместно собираются с образованием $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR, содержание которого у кур специфически повышено в зрительной доле, а у млекопитающих — в хабенуло-интерпедункулярной системе (см., например, Balestra et al., Chick Optic Lobe Contains a Developmentally Regulated $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ Nicotinic Receptor Subtype, MOL 58:300–311, 2000 /1/841787 and Salas et al., «Nicotinic Receptors in the Habenulo-Interpeduncular System Are Necessary for Nicotine Withdrawal in Mice», J. Neurosci. 29:3014-18, 2009).

«Рекомбинантные клетки» относятся к одной или более отдельным клеткам, а также к рекомбинантной линии клеток, в которой клетки являются гетерологически

экспрессирующими белок (-и). Используемый в данном документе термин «гетерологичная экспрессия» белка в клетке относится к модификации клетки для экспрессии белка путем введения экзогенной нуклеиновой кислоты в клетку, например, экзогенной нуклеиновой кислоты, которая кодирует белок, подлежащий экспрессии.

5 «Гетерологичная нуклеиновая кислота» относится к нуклеиновой кислоте, экзогенной по отношению к клетке, которая вводится в клетку. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота представляет собой ДНК. В некоторых вариантах осуществления гетерологичная нуклеиновая кислота представляет собой РНК. Гетерологичная экспрессия белка в клетке может быть достигнута с использованием различных способов. Например, вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую белок, который функционально связан с нуклеиновой кислотой, кодирующей промотор, способный инициировать экспрессию белка (например, конститутивный промотор), может быть введен в клетку.

15 Термин «экспрессия» в настоящем документе обозначает биосинтез продукта гена. Термин охватывает транскрипцию гена в РНК. Термин также охватывает трансляцию РНК в один или более полипептидов и дополнительно охватывает все посттранскрипционные и посттрансляционные модификации природного происхождения.

20 В общем аспекте изобретение относится к способам получения или создания клеток, экспрессирующих $\alpha 5$ -содержащий nAChR (таких как $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR), которые подходят для поиска новых лекарственных средств. В одном варианте осуществления способ включает в себя введение в клетку нуклеиновой кислоты, кодирующей $\alpha 5$ -субъединицу nAChR, и нуклеиновой кислоты, кодирующей белок-шаперон, выбранный из экспрессируемого во внутреннем ухе белка TMIE и белка FAM163B. Нуклеиновая (-ые) кислота (-ы), кодирующая (-ие) $\alpha 5$ -субъединицу nAChR и белок-шаперон (т. е. TMIE или FAM163B), может находиться в векторе экспрессии (например, в одном векторе экспрессии или в отдельных векторах экспрессии). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая $\alpha 5$ -субъединицу nAChR и белок-шаперон (т. е. TMIE или FAM163B), функционально связана с промотором, способным инициировать экспрессию соответствующего белка. В некоторых других вариантах осуществления каждая из нуклеиновых кислот, кодирующих $\alpha 5$ -субъединицу nAChR и белок-шаперон (т. е. TMIE или FAM163B), функционально связана с промотором, способным инициировать экспрессию соответствующего белка. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой конститутивный промотор.

В общем аспекте изобретение относится к способам получения или создания клеток, экспрессирующих $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR, которые подходят для поиска новых лекарственных средств. В одном варианте осуществления способ включает в себя введение в клетку нуклеиновой кислоты, кодирующей $\alpha 2$ -субъединицу $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR, нуклеиновой кислоты, кодирующей $\alpha 5$ -субъединицу $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR, нуклеиновой кислоты, кодирующей $\beta 2$ -субъединицу $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR, нуклеиновой кислоты, кодирующей диаминацетилтрансферазу 1 (SAT1), нуклеиновой кислоты, кодирующей холин-О-ацетилтрансферазу (CHAT), и одну или обе из нуклеиновой кислоты, кодирующей TMIE, и нуклеиновой кислоты, кодирующей FAM163B. Нуклеиновая (-ые) кислота (-ы), кодирующая (-ие) $\alpha 2$ -, $\alpha 5$ - и $\beta 2$ -субъединицы $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR, SAT1, CHAT и одно, выбранное из TMIE и FAM163B, могут находиться в векторе экспрессии (например, в одном векторе экспрессии или в отдельных векторах экспрессии). В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота, кодирующая $\alpha 2$ -, $\alpha 5$ - и $\beta 2$ -субъединицы $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR, SAT1, CHAT и одно или оба из TMIE и FAM163B, функционально связана с промотором, способным инициировать экспрессию соответствующего белка. В некоторых других вариантах осуществления каждая из нуклеиновых кислот, кодирующих $\alpha 2$ -, $\alpha 5$ - и $\beta 2$ -субъединицы $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR, SAT1, CHAT и одно или оба из TMIE и FAM163B, функционально связана с промотором, способным инициировать экспрессию соответствующего белка. В некоторых вариантах осуществления промотор представляет собой конститутивный промотор.

В другом аспекте способ включает в себя введение в клетку нуклеиновой кислоты, кодирующей $\alpha 2$ -субъединицу $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR, нуклеиновой кислоты, кодирующей $\alpha 5$ -субъединицу $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR, нуклеиновой кислоты, кодирующей $\beta 2$ -субъединицу $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR, нуклеиновой кислоты, кодирующей SAT1, нуклеиновой кислоты, кодирующей CHAT, и одну или обе из нуклеиновой кислоты, кодирующей TMIE, и нуклеиновой кислоты, кодирующей FAM163B, причем клетка, полученная данным способом, экспрессирует $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR на повышенном уровне по сравнению с такой же клеткой без нуклеиновых кислот, кодирующих $\alpha 2$ -, $\alpha 5$ -, $\beta 2$ -субъединицы $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR, и нуклеиновых кислот, кодирующих SAT1, CHAT, TMIE или FAM163B.

В другом аспекте изобретение относится к клеткам, генетически модифицированным для экспрессии TMIE или FAM163B, причем генетически модифицированная клетка экспрессирует по меньшей мере один белок на повышенном уровне относительно экспрессии того же белка в немодифицированной клетке в тех же (или по существу одинаковых) условиях. В одном варианте осуществления клетки

генетически модифицированы для экспрессии SAT1, CHAT и одного или обоих, выбранных из TMIE и FAM163B, причем генетически модифицированная клетка экспрессирует SAT1, CHAT и одно или оба, выбранные из TMIE и FAM163B, на повышенном уровне по сравнению с экспрессией SAT1, CHAT и одно или оба, выбранные из TMIE и FAM163B, соответственно, в немодифицированной клетке в тех же (или по существу одинаковых) условиях.

В другом аспекте изобретение относится к клеткам, генетически модифицированным для экспрессии $\alpha 2$ -, $\alpha 5$ - и $\beta 2$ -субъединиц $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR, SAT1, CHAT и TMIE или FAM163B, причем генетически модифицированная клетка экспрессирует эти белки на повышенном уровне по сравнению с экспрессией такого же белка в немодифицированной клетке в тех же (или по существу одинаковых) условиях. В одном варианте осуществления клетки генетически модифицированы для экспрессии $\alpha 2$ -, $\alpha 5$ - и $\beta 2$ -субъединиц $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR, SAT1, CHAT, TMIE, FAM163B, причем генетически модифицированная клетка экспрессирует эти белки на повышенном уровне по сравнению с экспрессией такого же белка в немодифицированной клетке в тех же (или по существу одинаковых) условиях.

В другом аспекте изобретение относится к выделенным рекомбинантным клеткам, содержащим по меньшей мере один вектор экспрессии, выбранный из группы, состоящей из вектора экспрессии, содержащего нуклеотидную последовательность, кодирующую SAT1, вектор экспрессии, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CHAT, и вектор экспрессии, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую TMIE или FAM163B. В одном варианте осуществления изобретение относится к выделенным рекомбинантным клеткам, содержащим по меньшей мере один вектор экспрессии, выбранный из группы, состоящей из вектора экспрессии, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую SAT1, вектора экспрессии, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую CHAT, вектора экспрессии, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую TMIE, и вектора экспрессии, содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую FAM163B.

В одном аспекте изобретение относится к выделенным рекомбинантным клеткам, содержащим гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую $\alpha 5$ -субъединицу nAChR, и гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую белок-шаперон, выбранный из трансмембранного экспрессируемого во внутреннем ухе белка (TMIE) и белка FAM163B. В одном варианте осуществления гетерологичные

нуклеиновые кислоты вводят в рекомбинантные клетки в форме векторов экспрессии. В одном варианте осуществления выделенные рекомбинантные клетки, описанные в данном документе, содержат вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую $\alpha 5$ -субъединицу nAChR, и вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую белок-шаперон, выбранный из TMIE и FAM163B. В одном варианте осуществления выделенные рекомбинантные клетки, описанные в данном документе, содержат вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую $\alpha 5$ -субъединицу nAChR, вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую TMIE, и вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую FAM163B.

В дополнительном аспекте изобретение относится к выделенным рекомбинантным клеткам, содержащим гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую $\alpha 2$ -субъединицу nAChR, гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую $\alpha 5$ -субъединицу nAChR, гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую $\beta 2$ -субъединицу nAChR, гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую диаминацетилтрансферазу 1 (SAT1), гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую холин-О-ацетилтрансферазу (CHAT), и гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую TMIE и/или FAM163B, причем $\alpha 2$ -, $\alpha 5$ - и $\beta 2$ -субъединицы образуют $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR. В одном варианте осуществления гетерологичные нуклеиновые кислоты вводят в рекомбинантные клетки в форме векторов экспрессии. В одном варианте осуществления выделенные рекомбинантные клетки, описанные в данном документе, содержат вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую $\alpha 2$ -субъединицу nAChR, вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую $\alpha 5$ -субъединицу nAChR, вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую $\beta 2$ -субъединицу nAChR, вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую SAT1, вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую CHAT, и вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую TMIE или FAM163B. В одном варианте осуществления выделенные рекомбинантные клетки, описанные в данном документе, содержат вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую $\alpha 2$ -субъединицу nAChR, вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую $\alpha 5$ -субъединицу nAChR, вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую $\beta 2$ -субъединицу nAChR, вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую SAT1, вектор экспрессии,

содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую CHAT, вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую TMIE, и вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую FAM163B.

5 В любом из вариантов осуществления, описанных в настоящем документе, нуклеиновая (-ые) кислота (-ы), кодирующая (-ие) любое одно или более из $\alpha 2$ -, $\alpha 5$ - и $\beta 2$ -субъединиц nAChR, SAT1, CHAT, TMIE и FAM163B, может (-гут) находиться в одном векторе экспрессии или в отдельных векторах экспрессии.

10 В одном варианте осуществления $\alpha 2$ -субъединица nAChR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 95%, например на 95%, на 96%, на 97%, на 98%, на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.

SEQ ID NO: 1:

15 MGPSCPVFLSFTKLSLWLLLLTPAGGEEAKRPPPRAPGDPLSSPSPTALPQGGG
HTETEDRLFKHLFRGYNRWARVPNTSDVVIVRFGLSIAQLIDVDEKNQMMT
TNVWLKQEWSDYKLRWNPTDFGNITSLRVPSEMIWIPDIVLYNNADGEFAVT
HMTKAHLFSTGTVHWVPPAIYKSSCSIDVTFPPFDQQNCKMKFGSWTYDKAK
IDLEQMEQTVDLKDYWESGEWAIVNATGTYNSSKKYDCCAEIYPDVTYAFVIR
20 RLPLFYTINLIIPCLLISCLTVLVFYLPSPDCGEKITLCISVLLSLTVFLLLITEIIPST
SLVIPLIGEYLLFTMIFVTLISIVITVFLNVHHRSPSTHTMPHWVRGALLGCVPR
WLLMNRPPPPVELCHPLRLKLSPSYHWLESNVDAEEREVVVEEEDRWACAG
HVAPSVGTLCSHGHLHSGASGPKAEALLQEGELLSPHMQALEGVHYIADH
LRSEADSSVKEDWKYVAMVIDRIFLWLFIIVCFLGTIGLFLPPFLAGMI

25 В одном варианте осуществления $\alpha 5$ -субъединица nAChR содержит аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 95%, например на 95%, на 96%, на 97%, на 98%, на 99% или на 100% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

30 SEQ ID NO: 2

MAARGSGPRALRLLLLVQLVAGRCGLAGAAGGAQRGLSEPSSIAKHEDSLLK
DLFQDYERWVRPVEHLNDKIKIKFGLAISQLVDVDEKNQLMTTNVWLKQEWI
DVKLRWNPDDYGGIKVIRVPSDSVWTPDIVLFDNADGRFEGTSTKTVIRYNGT
VTWTPPANYKSSCTIDVTFPPFDLQNCSSMKFGSWTYDGSQVDIILEDQDVKR

5 DFFDNGEWEIVSATGSKGNRTDSCCWYPYVTYSFVIKRLPLFYTLFLIIPCIGLS
 FLTVLVFYLP SNEGEKICLCTSVLVSLTVFLLVIEEIPSSSKVIPLIGEYLVFTMIF
 VTLSIMVTVFAINIHRSSSTHNAMAPLVRKIFLHTLPKLLCMRSHVDRYFTQK
 EETESGSGPKSSRNTLEAALDSIRYITRHIMKENDVREVVEDWKFIAQVLDRM
 FLWTFLFVSIVGSLGLFVPVIYKWANILIPVHIGNANK

10 В одном варианте осуществления β 2-субъединица nAChR содержит
 аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 85%, или по меньшей мере
 на 90%, или по меньшей мере на 95%, например на 95%, на 96%, на 97%, на 98%, на 99%
 или на 100% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NO: 3

15 MARRCGPVALLGFGLLR L C S G V W G T D T E E R L V E H L L D P S R Y N K L I R P A T N G
 S E L V T V Q L M V S L A Q L I S V H E R E Q I M T T N V W L T Q E W E D Y R L T W K P E E F D N M K
 K V R L P S K H I W L P D V V L Y N N A D G M Y E V S F Y S N A V V S Y D G S I F W L P P A I Y K S A C
 K I E V K H F P F D Q Q N C T M K F R S W T Y D R T E I D L V L K S E V A S L D D F T P S G E W D I V A L
 P G R R N E N P D D S T Y V D I T Y D F I I R R K P L F Y T I N L I P C V L I T S L A I L V F Y L P S D C G E K
 M T L C I S V L L A L T V F L L L I S K I V P P T S L D V P L V G K Y L M F T M V L V T F S I V T S V C V L N
 V H H R S P T T H T M A P W V K V V F L E K L P A L L F M Q Q P R H H C A R Q R L R L R R R Q R E R E
 20 G A G A L F F R E A P G A D S C T C F V N R A S V Q G L A G A F G A E P A P V A G P G R S G E P C G C G
 L R E A V D G V R F I A D H M R S E D D D Q S V S E D W K Y V A M V I D R L F L W I F V F V C V F G T I
 G M F L Q P L F Q N Y T T T T F L H S D H S A P S S K

25 В одном варианте осуществления TMIE содержит аминокислотную
 последовательность с по меньшей мере 85% или по меньшей мере 90% или по меньшей
 мере 95%, например 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью
 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4. Или TMIE содержит
 аминокислотную последовательность с по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%,
 по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или по меньшей мере 90%, или по
 30 меньшей мере 95%, например 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью
 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4 и имеет свойство белка, которое
 включает свойство усиления экспрессии α 5-субъединицы nAChR.

SEQ ID NO: 4

MAGWPGAGPLCVLGGAAALGVCLAGVAGQLVEPSTAPPKPKPPPLTKETVVF
 WDMRLWHVVGIFSLFVLSIITLCCVFNCRVPRTRKEIEARYLQRKAAKMYTD
 KLETVPPLNELTEVPGEDKDKKKKKKKKDSVDTVAIKVEEDEKNEAKKKKGE
 5 K

В одном варианте осуществления FAM163B содержит аминокислотную
 последовательность, по меньшей мере на 85%, или по меньшей мере на 90%, или по
 меньшей мере на 95%, например на 95%, на 96%, на 97%, на 98%, на 99% или на 100%
 10 идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5. Или FAM163B
 содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 60%, по меньшей
 мере 70%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или по меньшей мере 90%, или
 по меньшей мере 95%, например 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью
 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5 и имеет свойство белка, которое
 15 включает свойство усиления экспрессии $\alpha 5$ -субъединицы nAChR.

SEQ ID NO: 5

MTAGTVVITGGILATVILLCIIAVLCYCRLQYYCCKKDESEDEEEPDFAVHSH
 LPPLHSNRNLVLTNGPALYPTASTSFSQKSPQARALCRSCSHCEPPTFFLQEPPE
 20 EEEDVLNGGERVLYKSVSQEDVELPPGGFGGLQALNPNRLSAMREAFARSRSI
 STDV

В одном варианте осуществления SAT1 содержит аминокислотную
 последовательность, по меньшей мере на 85%, или по меньшей мере на 90%, или по
 25 меньшей мере на 95%, например на 95%, на 96%, на 97%, на 98%, на 99% или на 100%
 идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6. Или SAT1 содержит
 аминокислотную последовательность с по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%,
 по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или по меньшей мере 90%, или по
 меньшей мере 95%, например 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью
 30 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6 и имеет свойство белка, которое
 включает свойство усиления экспрессии $\alpha 2$ - и $\beta 2$ -субъединиц nAChR.

SEQ ID NO: 6

MAKFVIRPATAADCSDILRLIKELAKYEYMEEQVILTEKDLLEDGFGHEHPFYH
 CLVAEVPKEHWTPPEGHSIVGFAMYYFTYDPWIGKLLYLEDDFFVMSDYRGGFI
 GSEILKNLSQVAMRCRCSSMHFLVAEWNEPSINFYKRRGASDLSSEEGWRLFK
 5 IDKEYLLKMATEE

В одном варианте осуществления CHAT содержит аминокислотную
 последовательность с по меньшей мере 85% или по меньшей мере 90% или по меньшей
 мере 95%, например 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью
 10 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7. Или CHAT содержит
 аминокислотную последовательность с по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%,
 по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% или по меньшей мере 90%, или по
 меньшей мере 95%, например 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичностью
 аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7 и имеет свойство белка, которое
 15 включает свойство усиления экспрессии $\alpha 2$ - и $\beta 2$ -субъединиц nAChR.

SEQ ID NO: 7

MAAKTPSSEESGLPKLPVPLQQTALATYLQCMRHLVSEEQFRKSQAIVQQFGA
 PGGLGETLQQKLLERQEK TANWVSEYWLNDMYLNNRLALPVNSSPAVIFAR
 20 QHFPGTDDQLRFAASLISGVLSYKALLDSHSIPTDCAKGQLSGQPLCMKQYYG
 LFSSYRLPGHTQDTLVAQNSSIMPEPEHVIVACCNQFFVLDVVINFRRLSEGDL
 FTQLRKIVKMASNEDERLPPIGLLTSDGRSEWAEARTVLVKDSTNRDSLDMIE
 RCICLVCLDAPGGVELSDTHRALQLLHGGGYSKNGANRWYDKSLQFVVGRD
 GTCGVVCEHSPFDGIVLVQCTEHLKHM TQSSRKLIRADSVSELPAPRRLRWK
 25 CSPEIQGHLASSAEKLQRIVKNLDFIVYKFDNYGKTFIKKQKCPDAFIQVALQ
 LAFYRLHRRLVPTYESASIRRFQEGRVDNIRSATPEALAFVRAVTDHKA AVPA
 SEKLLLLKDAIRAQTA YTVMAITGMAIDNHLALRELARAMCKELPEMFMD E
 TYLMSNRFVLSTSQVPTTTEMFCCYGPVVPNGYGACYNPQPETILFCISSFHSC
 KETSSSKFAKAVEESLIDMRDLC SLLPPTESKPLATKEKATRPSQGHQP
 30

В настоящем документе можно использовать любые подходящие средства для
 введения гетерологичной нуклеиновой кислоты в клетку для получения
 рекомбинантных клеток, описанных в настоящем документе, таких как трансфекция
 ДНК (например, посредством ДНК-вектора) и трансдукции РНК. В одном варианте

осуществления гетерологичную нуклеиновую кислоту, подлежащую введению в клетки для получения рекомбинантных клеток, получают с использованием вектора, предпочтительно экспрессионного вектора. Термин «вектор» относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. Один тип вектора представляет собой «плазмиду», которая 5 означает кольцевую двухцепочечную петлю ДНК, в которую могут быть вставлены дополнительные сегменты ДНК. Другой тип вектора представляет собой вирусный вектор, в который могут быть вставлены дополнительные сегменты ДНК. Векторы экспрессии представляют собой векторы, способные направлять экспрессию генов, с которыми они функционально связаны. Используемые в данном документе векторы 10 экспрессии содержат нуклеиновую кислоту, кодирующую белковую последовательность в форме, подходящей для экспрессии нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине. Таким образом, векторы экспрессии могут включать одну или более регуляторных последовательностей, таких как промотор, выбранный на основе клеток-хозяев, которые должны быть использованы для экспрессии, функционально связанной 15 с нуклеотидной последовательностью, которая должна быть экспрессирована. При использовании в отношении вектора экспрессии термин «функционально связанный» означает, что представляющая интерес нуклеотидная последовательность связана с регуляторной (-ыми) последовательностью (-ями) способом, обеспечивающим 20 экспрессию нуклеотидной последовательности (например, в системе транскрипции/трансляции *in vitro*, или в клетке-хозяине, когда вектор вводится в клетку-хозяина). Специалистам в данной области техники будет понятно, что конструкция вектора экспрессии может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина, подлежащей трансформации, и требуемый уровень экспрессии белка, а также 25 предполагаемое применение вектора.

Можно использовать любой вектор, известный специалистам в данной области техники с учетом данного описания, такой как плазида, космида, фаговый вектор или вирусный вектор. В одном варианте осуществления вектор представляет собой вектор экспрессии, такой как плазида. Вектор может включать любой элемент для 30 обеспечения стандартной функции экспрессионного вектора, например промотор, элемент для связывания с рибосомой, терминатор, энхансер, селективный маркер и точку начала репликации. Промотор может представлять собой конститутивный, индуцируемый или репрессируемый промотор. В данной области известен ряд векторов экспрессии, способных доставлять нуклеиновые кислоты в клетку, которые

могут быть использованы в настоящем изобретении. Для генерации вектора экспрессии по вариантам осуществления изобретения можно использовать традиционные клональные методы или синтез искусственных генов.

Любая клетка, известная специалистам в данной области техники с учетом настоящего изобретения, может быть использована для рекомбинантной экспрессии $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\beta 2$ -субъединиц nAChR, SAT1, CHAT, TMIE и FAM163B. В одном варианте осуществления рекомбинантная клетка представляет собой клетку млекопитающего. Подходящие клетки млекопитающих могут быть выбраны из клеток эмбриональной почки 293Т человека (HEK293Т), клеток HEK293F, клеток HeLa, клеток яичника китайского хомячка (CHO), клеток NIH 3Т3, клеток MCF-7, клеток Нер G2, клеток почки новорожденного хомяка (ВНК) и клеток Со7.

Способы идентификации агонистов, антагонистов или положительных аллостерических модуляторов $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR

В данном документе дополнительно предложены способы идентификации агонистов, антагонистов или положительных аллостерических модуляторов (РАМ) $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR. РАМ представляют собой соединения, которые связываются с сайтами на поверхности белка, отличными от активных сайтов, и, следовательно, изменяют конформацию сайтов связывания белка.

В одном варианте осуществления способ включает культивирование выделенных рекомбинантных клеток, описанных в данном документе, в условиях, при которых рекомбинантные клетки растут, приведение в контакт рекомбинантных клеток с агентом и определение того, является ли агент агонистом, антагонистом или РАМ $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR, причем агонист или РАМ усиливает активность $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR, а антагонист снижает активность $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR по сравнению с активностью $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR в рекомбинантной клетке, которая не контактирует с агентом. В настоящем документе агонисты относятся к молекулам/соединениям/пептидам, которые служат для усиления функции $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR. В настоящем документе РАМ относятся к молекулам/соединениям/пептидам, которые усиливают влияние реакции nAChR $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ на лиганд без непосредственной активации рецептора. Используемый в настоящем документе термин «усиление», «усиленный», «увеличить» или «увеличенный», при использовании в отношении активности nAChR $\alpha 2\alpha 5\beta 2$, относится к увеличению сигнализации через рецептор относительно соответствующей сигнализации, наблюдаемой в клетке, в которую не вводят агонист или РАМ.

Антагонисты, используемые в данном документе, относятся к молекулам/соединениям/пептидам, которые служат для блокирования, уменьшения или ослабления функции $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR. В конкретных вариантах осуществления агент представляет собой небольшую молекулу или пептид.

5 В одном варианте осуществления анализ FLIPR используют для идентификации агонистов опосредованного $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR потока кальция. В этом анализе рекомбинантные клетки инкубируют с чувствительным к кальцию красителем (например, ca5), подвергают воздействию тестируемого соединения, а поток кальция визуализируется с помощью FLIPR^{TETRA}.

10 В одном варианте осуществления анализ FLIPR используют для идентификации антагонистов вызванного никотином потока кальция $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR. В этом анализе рекомбинантные клетки инкубируют с чувствительным к кальцию красителем (например, ca5). Используя протокол двойного добавления, рекомбинантные клетки подвергаются воздействию тестируемых соединений в течение первого периода и
15 никотина (например, в EC₈₀ (1 мкМ)) в течение второго периода. После этого поток кальция визуализируется с помощью FLIPR^{TETRA}. Как показано на Фиг. 2, антагонисты $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR снижают поток кальция.

 В одном варианте осуществления анализ FLIPR используется для
 идентификации соединений, которые положительно модулируют или усиливают
20 вызванный никотином поток кальция $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR. В этом анализе рекомбинантные клетки инкубируют с чувствительным к кальцию красителем (например, ca5).
 Используя протокол двойного добавления, рекомбинантные клетки подвергаются
 воздействию тестируемых соединений в течение первого периода и никотина
 (например, в EC₈₀ (1 мкМ)) в течение второго периода. После этого поток кальция
25 визуализируется с помощью FLIPR^{TETRA}. Если тестируемое соединение усиливает
 вызванный никотином поток кальция, опосредованный $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR, но не усиливает
 поток кальция в качестве агониста (определяется, как указано выше), тестируемое
 соединение называют положительным аллостерическим модулятором (РАМ) или
 потенциатором $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR.

30 В предпочтительном варианте осуществления клетки инкубируют при температуре около 25–35 °С в течение около 20–50 часов до анализа FLIPR или другого анализа для измерения активности $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR. В некоторых вариантах осуществления клетки инкубируют при температуре около 25 °С, около 26 °С, около 27 °С, около 28 °С, около 29 °С, около 30 °С, около 31 °С, около 32 °С, около 33 °С,

около 34 °С или около 35 °С, в течение около 20 ч, около 25 ч, около 30 ч, около 35 ч, около 40 ч, около 45 ч или около 50 ч перед анализом.

Система экспрессии и наборы

- 5 В данном документе дополнительно предложены системы и наборы экспрессии, содержащие выделенные рекомбинантные клетки. Системы и наборы экспрессии могут дополнительно включать в себя инструкции по применению.

ПРИМЕР

- 10 Специалистам в данной области будет понятно, что в варианты осуществления, описанные выше, можно вносить изменения без отступления от общей концепции изобретения. Таким образом, следует понимать, что данное изобретение не ограничено конкретными описанными вариантами осуществления, но предполагается, что оно охватывает модификации в пределах сущности и объема настоящего изобретения,
- 15 определяемых настоящим описанием.

Материал

Название	Компания	№ по кат.
Среда для экспрессии FreeStyle293	Gibco	12338018
OptiPro SFM	Gibco	12309019
Реагент FreeStyle MAX	Invitrogen	16447100
Среды для замораживания клеточных	Gibco	12648010
DMEM с высоким содержанием	Sigma	D5671-500ML
Охарактеризованная FBS	HyClone	SH30070.03
Пируват натрия	HyClone	SH30239.01
Глутамакс	HyClone	35050061
DMSO	Sigma Aldrich	41648
Краситель Ca5	Molecular Devices	R8186
Никотин	Tocris	3546
384-луночные планшеты	Greiner	781280
384-луночные планшеты с поли-D-	Corning	354663
Пользовательский HBSS	HyClone	SH3A4475.01
Хлорид кальция	Amresco	E506-500ML
Хлорид магния	Amresco	E525-500ML
Флакон для заморозки	Nalgene	5000-0020

Линия клеток

- Линия клеток FreeStyle293F (ThermoFisher Scientific № R79007)

Векторные конструкции

- pcDNA3.1- α 2
- 5 • pcDNA3.1- α 5
- pcDNA3.1- β 2
- pcDNA3.1-SAT1
- pcDNA3.1-CHAT
- pcDNA3.1-TMIE
- 10 • pcDNA3.1-FAM163B

Культуральная среда

- Среда для экспрессии FreeStyle 293

Реагенты для трансфекции

- Реагент FreeStyle MAX

15 *Растительная среда*

- DMEM
- 10% FBS
- 1% пенициллин/стрептомицин

Буфер для разведения соединения / Ca5

- 20 • Буферный солевой раствор HEPES (500 мл), дополненный 1 мМ Mg²⁺ и 2 мМ Ca²⁺

Кальций 5 (Ca5) краситель (Molecular Devices)

- Кальциевый краситель разводили в концентрации 25 x буферным солевым раствором Хэнкса. Краситель разводили до 1 x буфером для анализа HEPES с
- 25 2 мМ CaCl₂ и 1 мМ MgCl₂.

Способы и процедуры*Получение клеток, день 1*

- Готовят клеточную суспензию 1 x 10⁶ клеток на мл путем центрифугирования клеток и ресуспендирования в свежих предварительно нагретых средах;
- 30 • при встряхивании 1900 мл клеток готовят следующую смесь для трансфекции в 50 мл среды OptiPro SFM;
- добавляют 2,5 мл реагента FreeStyle MAX к 47,5 мл OptiPro SFM в пустую пробирку емкостью 50 мл;

- во вторую пробирку емкостью 50 мл добавляют 2,5 мг общей ДНК ($\alpha 2$, $\alpha 5$, $\beta 2$, SAT1, CHAT и TMIE или FAM163B в соотношении 3 : 3 : 3 : 3 : 1 : 2) в OptiPro SFM до конечного объема 50 мл и осторожно перемешивают;
- переносят разведенную ДНК в реагент FreeStyle MAX и осторожно перемешивают раствор, затем инкубируют в течение 10 минут при комнатной температуре;
- переносят 100 мл смеси для трансфекции MAX/ДНК FreeStyle в клетки и гомогенизируют культуры;
- инкубируют 1 час при 37 °С с 8% CO₂;
- разливают клетки в стерильные пробирки емкостью 500 мл;
- центрифугируют при 1000 об/мин в течение 7 минут;
- удаляют супернатант; и
- ресуспендируют клетки в среде для замораживания, аликвоту переносят в криопробирку и замораживают при –80 °С.

15 *Посев клеток, день 2*

- Флаконы обеззараживают этанолом;
- разливают клетки в коническую пробирку объемом 50 мл;
- Медленно добавляют 10 мл нагретой среды для посева на планшеты по каплям;
- аккуратно нажимают и отпускают поршень пипетки несколько раз, чтобы разбить осадок, при наличии;
- центрифугируют при 1000 об/мин в течение 7 мин, аспирируют супернатант и ресуспендируют в планшете объемом 25 мл;
- высевают 35 000 клеток/лунку в 35 мкл ($1,0 \times 10^6$ клеток/мл); и
- инкубируют планшеты в течение 24 часов при 37 °С. Затем переносят планшет в условия 30 °С с 5% CO₂ в увлажненной атмосфере на 24–48 часов.

Анализ FLIPR, день 3

- Промывают планшет с помощью устройства для промывки планшетов (4 промывки по 100 мкл/промывку), используя буфер для разведения соединения, оставляя по 25 мкл в каждой лунке;
- добавляют 25 мкл 2 х красителя Ca5 в каждую лунку;
- инкубируют при комнатной температуре в течение 1 часа;
- промывают планшет с помощью устройства для промывки планшетов (4 промывки по 100 мкл/промывку), используя буфер для разведения соединения, оставляя по 50 мкл в каждой лунке;

- переносят планшеты в систему FLIPR для добавления соединения.

Функциональная экспрессия $\alpha 2\beta 2$ nAChR и $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR

$\alpha 2$ - и $\beta 2$ -субъединицы человека $\alpha 2\beta 2$ nAChR совместно трансфицировали указанными комбинациями кДНК (только вектор; SAT1+CHAT; SAT1+CHAT+TMIE или SAT1+CHAT+FAM163B) в клетках HEK293T и инкубировали при 37 °C в течение 5 ночи, а затем при 30 °C в течение 24–48 часов. Трансфицированные клетки инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре с красителем Ca5 с последующей стимуляцией E_{max} никотина (33 мкМ). Вызванный никотином сигнал Ca^{2+} 10 трансфицированной клетки представлен на Фиг. 1 (слева). Как показано, совместная трансфекция с SAT1 и CHAT усиливает функцию $\alpha 2\beta 2$ nAChR (т. е. вызванный никотином поток кальция), тогда как совместная трансфекция с TMIE или FAM163B не влияет на функцию $\alpha 2\beta 2$ nAChR.

Отдельно $\alpha 2$ -, $\alpha 5$ - и $\beta 2$ -субъединицы человека $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR совместно 15 трансфицировали указанными комбинациями кДНК (только вектор; SAT1+CHAT; SAT1+CHAT+TMIE или SAT1+CHAT+FAM163B) в клетках HEK293T и инкубировали при 37 °C в течение ночи, а затем при 30 °C в течение 24–48 часов. Трансфицированные клетки инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре с красителем Ca5 с последующей стимуляцией E_{max} никотина (33 мкМ). Вызванный никотином 20 сигнал Ca^{2+} трансфицированной клетки представлен на Фиг. 1 (справа). Как показано, совместная трансфекция TMIE или FAM163B (в присутствии SAT1 и CHAT) существенно усиливает функцию $\alpha 2\beta 2\alpha 5$ nAChR (т. е. вызванный никотином поток кальция).

25 Кривая зависимости концентрации антагониста от индуцированной никотином активности $\alpha 2\beta 2$ nAChR и $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR

$\alpha 2$ -субъединицы и $\beta 2$ -субъединицы nAChR человека с $\alpha 5$ или без нее совместно трансфицировали указанными комбинациями кДНК (SAT1+CHAT; SAT1+CHAT+TMIE или SAT1+CHAT+FAM163B) в клетках HEK293T. После 30 инкубации при 37 °C в течение ночи клетки инкубировали при 30 °C в течение дополнительных 24–48 часов. Затем клетки инкубировали с красителем Ca5 в течение одного часа при комнатной температуре и стимулировали различными концентрациями никотина. Вызванный никотином поток кальция регистрировали с помощью устройства для визуализации FLIPR^{TETRA}. Сигналы FLIPR усредняли и наносили на

график с процентным отношением к максимальным ответам на каждую трансфекцию. Как показано на Фиг. 2, совместная трансфекция с FAM163B или TMIE слева изменяла активность никотина как на $\alpha 2\beta 2$ nAChR, так и на $\alpha 2\beta 2\alpha 5$ nAChR.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенная рекомбинантная клетка, содержащая:
 - а) гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую $\alpha 5$ -субъединицу никотинового ацетилхолинового рецептора (nAChR); и
 - б) гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую белок-шаперон, выбранный из трансмембранного экспрессируемого во внутреннем ухе белка TMIE и белка FAM163B.
2. Выделенная рекомбинантная клетка по п. 1, дополнительно содержащая:
 - с) гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую $\alpha 2$ -субъединицу nAChR;
 - д) гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую $\beta 2$ -субъединицу nAChR;
 - е) гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую диаминацетилтрансферазу 1 (SAT1); и
 - ф) гетерологичную нуклеиновую кислоту, кодирующую холин-О-ацетилтрансферазу (CHAT),
причем $\alpha 2$ -, $\alpha 5$ - и $\beta 2$ -субъединицы nAChR образуют $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR.
3. Выделенная рекомбинантная клетка по п. 1 или 2, в которой рекомбинантная клетка представляет собой клетку млекопитающего.
4. Выделенная рекомбинантная клетка по п. 3, в которой клетка млекопитающего выбрана из группы, состоящей из клетки эмбриональной почки 293Т человека (НЕК293Т), клетки НЕК293F, клетки HeLa, клетки яичника китайского хомячка (СНО), клетки NIH3Т3, клетки MCF-7, клетки Нер G2, клетки почки новорожденного хомячка (ВНК) и клетки Cos7.
5. Выделенная рекомбинантная клетка по любому из пп. 1–4, в которой $\alpha 2$ -субъединица $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1.
6. Выделенная рекомбинантная клетка по любому из пп. 1–5, в которой $\alpha 5$ -субъединица $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR содержит аминокислотную последовательность с по

меньшей мере 95% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

7. Выделенная рекомбинантная клетка по любому из пп. 1–7, в которой $\beta 2$ -
5 субъединица $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR содержит аминокислотную последовательность с по
меньшей мере 95% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID
NO: 3.
8. Выделенная рекомбинантная клетка по любому из пп. 1–7, в которой TMIE
10 содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95%
идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4.
9. Выделенная рекомбинантная клетка по любому из пп. 1–8, в которой FAM163B
15 содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95%
идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5.
10. Выделенная рекомбинантная клетка по любому из пп. 2–9, в которой SAT1
20 содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95%
идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6.
11. Выделенная рекомбинантная клетка по любому из пп. 2–10, в которой CHAT
содержит аминокислотную последовательность с по меньшей мере 95%
идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7.
- 25 12. Способ идентификации агонистов, антагонистов или положительных
аллостерических модуляторов $\alpha 5$ -содержащего nAChR, включающий:
а) приведение выделенной рекомбинантной клетки по любому из пп. 1–11 в
контакт с агентом; и
б) определение активности $\alpha 5$ -содержащего nAChR выделенной рекомбинантной
30 клетки, причем агент идентифицируется как агонист или положительный
аллостерический модулятор (PAM), если агент усиливает активность $\alpha 5$ -
содержащего nAChR, и агент идентифицируется как антагонист, если агент
снижает активность $\alpha 5$ -содержащего nAChR по сравнению с активностью $\alpha 5$ -

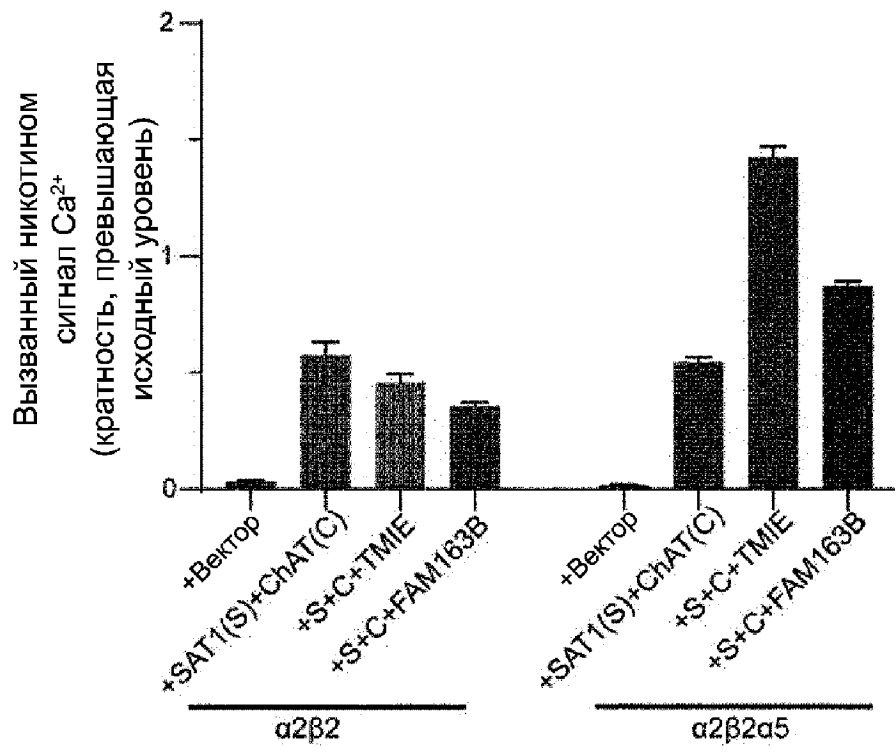
содержащего nAChR, когда выделенная рекомбинантная клетка не была приведена в контакт с агентом.

- 5 13. Способ идентификации агонистов, антагонистов или положительных аллостерических модуляторов $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR, включающий:
- а) приведение выделенной рекомбинантной клетки по любому из пп. 2–11 в контакт с агентом; и
- 10 б) определение активности $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR выделенной рекомбинантной клетки, причем агент идентифицируется как агонист или положительный аллостерический модулятор (РАМ), если агент усиливает активность $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR, и агент идентифицируется как антагонист, если агент снижает активность $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR по сравнению с активностью $\alpha 2\alpha 5\beta 2$ nAChR, когда выделенная рекомбинантная клетка не была приведена в контакт с агентом.
- 15 14. Способ по п. 13, в котором стадия б) включает в себя определение потока кальция выделенной рекомбинантной клетки, причем агент идентифицируется как агонист, если агент усиливает поток кальция по сравнению с потоком кальция, когда выделенная рекомбинантная клетка не была приведена в контакт с агентом.
- 20 15. Способ по п. 13, в котором стадия б) включает в себя определение потока кальция и вызванного никотином потока кальция выделенной рекомбинантной клетки, причем агент идентифицируется как РАМ, если агент не усиливает поток кальция и усиливает вызванный никотином поток кальция по сравнению с потоком кальция и вызванным никотином потоком кальция, когда выделенная рекомбинантная клетка
- 25 не была приведена в контакт с агентом
- 30 16. Способ по п. 13, в котором стадия б) включает в себя определение вызванного никотином потока кальция выделенной рекомбинантной клетки, причем агент идентифицируется как антагонист, если агент снижает вызванный никотином поток кальция по сравнению с вызванным никотином потоком кальция, когда выделенная рекомбинантная клетка не была приведена в контакт с агентом.

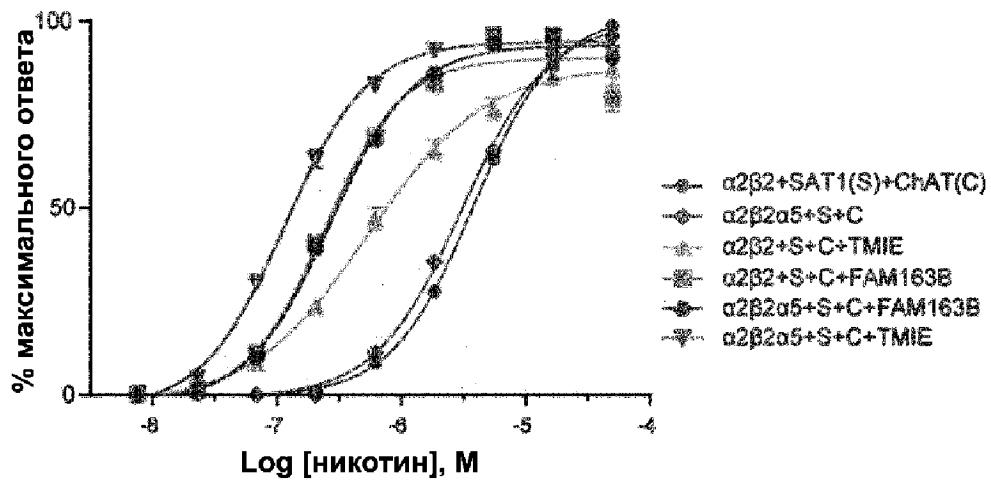
17. Способ по любому из пп. 13–16, в котором выделенную рекомбинантную клетку инкубируют при температуре около 25–35 °С в течение около 20–50 часов до приведения в контакт с агентом.

5 18. Способ по любому из пп. 13–17, в котором агент представляет собой малую молекулу или пептид.

19. Набор, содержащий (i) выделенную рекомбинантную клетку по любому из пп. 1–11 и (ii) инструкции по применению.



Фиг. 1



Фиг. 2