

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047514**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.07.31

(21) Номер заявки
201990232

(22) Дата подачи заявки
2017.07.07

(51) Int. Cl. **C07K 14/705** (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(54) МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ЛИГАНД-УПРАВЛЯЕМЫЕ ИОННЫЕ КАНАЛЫ И СПОСОБЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ

(31) 62/359,534; 62/486,779

(32) 2016.07.07; 2017.04.18

(33) US

(43) 2019.07.31

(86) PCT/US2017/041147

(87) WO 2018/009832 2018.01.11

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ХОВАРД ХБЮЗ МЕДИКАЛ
ИНСТИТЮТ (US)**

(72) Изобретатель:
**Стернсон Скотт, Ли Питер, Магнус
Кристофер (US)**

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

(56) US-A1-20100130420

CAPPELLI, A. et al., "The interactions of the 5-HT₃ receptor with aryl piperazine, tropane, and quinuclidine ligands", Current Topics in Medicinal Chemistry, 2002, Vol. 2, No. 6, pp. 599-624, See abstract; page 599; and chart 1.

PRICE, K.L. et al., "Varenicline interactions at the 5-HT₃ receptor ligand binding site are revealed by 5-HTBP", ACS Chemical Neuroscience, 2015, Vol. 6, No. 7, pp. 1151-1157, See abstract; and page 1151.

US-A1-20050250808

GAO, Y. et al., "Derivatives of dibenzothiophene for positron emission tomography imaging of α 7-nicotinic acetylcholine receptors", Journal of Medicinal Chemistry, 2013, Vol. 56, No. 19, pp. 7574-7589, See abstract; and page 7574.

(57) Настоящий документ относится к материалам и способам контроля активности лиганд-управляемого ионного канала (LGIC). Например, приводятся LGIC, включая по меньшей мере одну субъединицу LGIC, имеющую модифицированный лиганд-связывающий домен (LBD) и/или модифицированный домен ионных пор (IPD). Также приводятся экзогенные лиганды LGIC, который могут связываться с модифицированным LGIC и активировать его, а также способы модулирования переноса ионов через мембрану клетки млекопитающего, способы модулирования возбудимости клетки у млекопитающего и способы лечения млекопитающего, имеющего каналопатию.

047514

B1

047514
B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

Для настоящей заявки испрашивается приоритет по заявке на патент США № 62/359,534, поданной 7 июля 2016 г., и испрашивается приоритет по заявке на патент США № 62/486,779, поданной 18 апреля 2017 г. Раскрытия предыдущих заявок считаются частью (и включены посредством ссылки) раскрытия данной заявки.

Предшествующий уровень техники

1. Область техники.

Настоящий документ относится к материалам и способам контроля активности лиганд-управляемого ионного канала (LGIC). Например, в данном документе представлены модифицированные LGIC, включающие по меньшей мере одну субъединицу LGIC с модифицированным лиганд-связывающим доменом (LBD) и/или модифицированным доменом ионных пор (IPD). Также приводятся экзогенные лиганды LGIC, которые могут связываться с модифицированным LGIC и активировать его. В некоторых случаях модифицированный LGIC и экзогенный лиганд могут использоваться для лечения млекопитающего, имеющего каналопатию (например, нервная каналопатия или мышечная каналопатия). В некоторых случаях модифицированный LGIC и экзогенный лиганд LGIC могут использоваться для модулирования (например, активации или ингибирования) переноса ионов через клеточную мембрану млекопитающего. В некоторых случаях модифицированный LGIC и экзогенный лиганд LGIC могут использоваться для модулирования (например, повышения или снижения) возбудимости клетки у млекопитающего.

2. Дополнительная информация.

Ионные каналы опосредуют ионный поток в клетках, что сильно влияет на их биологическую функцию. Ярким примером являются нейроны, где ионные каналы управляют электрической сигнализацией между нейронами, влияя на физиологию, восприятие, поведение, настроение и познание.

Различные LGIC имеют разные свойства связывания лиганда, а также специфические свойства ионной проводимости (Hille 2001 Ion Channels of Excitable Membranes. pp. 814. Sunderland, MA: Sinauer Associates; Kandel et al., 2000 Principles of Neural Science. USA: McGraw-Hill Co. 1414 pp). Например, никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChRs) связывают эндогенный лиганд ацетилхолин (ACh), который активирует проводимости катионов и обычно деполяризует клетки, тем самым повышая возбудимость клеток. В отличие от этого, глициновый рецептор (GlyR) связывает эндогенный лиганд глицин, который активирует проводимость хлорид-аниона и, как правило, уменьшает возбудимость клеток путем гиперполяризации и/или электрического шунта сопротивления клеточной мембраны.

Сущность изобретения

Уровни эндогенных агонистов LGIC, например, ACh, не поддаются контролю.

В настоящем документе представлены материалы и способы контроля активности LGIC (например, повышение чувствительности LGIC к экзогенным лигандам и/или снижение чувствительности к эндогенным лигандам, например ACh). Например, в настоящем документе представлены модифицированные LGIC, включающие по крайней мере одну модифицированную субъединицу LGIC, имеющую LBD и IPD, и имеющую по меньшей мере одну модифицированную аминокислоту (например, аминокислотную замену). Также приводятся экзогенные лиганды LGIC, которые могут связываться с модифицированным LGIC и активировать его. В некоторых случаях модифицированный LGIC и экзогенный лиганд могут использоваться для лечения млекопитающего, имеющего каналопатию (например, нервная каналопатия или мышечная каналопатия). В некоторых случаях модифицированный LGIC и экзогенный лиганд LGIC могут использоваться для модулирования (например, активации или ингибирования) переноса ионов через клеточную мембрану млекопитающего. В некоторых случаях модифицированный LGIC и экзогенный лиганд LGIC могут использоваться для модулирования (например, повышения или снижения) возбудимости клетки у млекопитающего.

Наличие возможности контролировать активность LGIC дает уникальную и невнедренную возможность достижения контроля переноса ионов в клетках. Например, модифицированные LGIC, имеющие повышенную чувствительность к одному или нескольким экзогенным лигандам LGIC, могут использоваться для обеспечения временного и пространственного контроля переноса ионов и/или клеточной возбудимости, основанного на доставке экзогенного лиганда LGIC. Например, модифицированные LGIC с пониженной чувствительностью к эндогенным лигандам LGIC предотвращают нежелательную активацию модифицированных LGIC и допускают селективный контроль над модифицированными LGIC при помощи экзогенных лигандов. Кроме того, экзогенные лиганды LGIC, имеющие повышенную потентность в отношении модифицированного LGIC, улучшают селективность таргетирования модифицированного LGIC, по сравнению с эндогенными ионными каналами. Таким образом, модифицированные LGIC и экзогенные лиганды LGIC, представленные в настоящем документе, полезны для достижения терапевтического эффекта, уменьшая побочные эффекты малых молекул на непредусмотренные мишени.

Согласно настоящему описанию, одна или несколько мутаций в модифицированном LGIC могут повысить потентность в отношении экзогенных лигандов LGIC. Мутация $\alpha 7$ LBD $\alpha 7$ -GlyR по остатку L131 (например, замена Leu на Gly или Ala) увеличивала потентность для варениклина (16-кратно) и

трописетрона (3,6-кратно) при снижении потентности ACh (6,4-кратной), по сравнению с $\alpha 7$ -GlyR. Мутация $\alpha 7$ LBD $\alpha 7$ -GlyR по остатку G175 (например, G175K) или P216 (например, P216I) повышала потентность для ACh, никотина, трописетрона, варениклина, а также других агонистов хинуклидина и тропана. Сочетание мутации по остатку G175K с мутациями, понижающими потентность эндогенного агониста ACh (например, Y115F), образовывало $\alpha 7$ -GlyR Y115F G175K с повышенной потентностью для трописетрона (5,5-кратной) и пониженной потентностью для ACh (-8-кратной). Кроме того, комбинирование мутаций в $\alpha 7$ -LBD по остаткам 77 (например, замена Trp на Phe или Tyr) и/или 79 (например, замена Gln на Gly, Ala или Ser), и/или 131 (например, замена Leu на Gly или Ala), и/или 141 (например, замена Leu на Phe или Pro) в данных химерных каналах с мутациями, усиливающими потентность по остаткам G175 (например, G175K) или P216 (например, P216I) повышают потентность для отдельных лигандов и/или снижают потентность ACh. Например, химерный LGIC $\alpha 7$ -GlyR с LBD $\alpha 7$ nAChR ($\alpha 7$ -LBD), имеющий мутацию по остатку 79 (например, замена Gln на Gly), мутацию по остатку 115 (например, замена Tyr на Phe) и мутацию по остатку 175 (например, замена Gly на Lys), имеет более чем 100-кратно повышенную чувствительность к экзогенному тропану - лиганду LGIC, соединению 723 (тропану) и пониженную чувствительность к ACh (-15-кратную), по сравнению с немодифицированным химерным LGIC $\alpha 7$ -GlyR. Кроме того, модифицированный LGIC, включающий по меньшей мере одну химерную субъединицу LGIC, имеющую LBD $\alpha 7$ nAChR ($\alpha 7$ -LBD), имеющий мутацию по остатку 79 (например, замену Gln на Ala, Gly или Ser), и IPD GlyR, имеющий мутацию по остатку 298 (например, замена Ala на Gly) имеет почти 20-кратно повышенную чувствительность к экзогенному лиганду LGIC, например, хинуклидину или тропану. Дополнительные мутации по остатку 27 (например, замена Arg на Asp) и 41 (например, замена Glu на Arg) $\alpha 7$ -LBD уменьшали ассоциацию модифицированного химерного LGIC с немодифицированными ионными каналами. Дополнительные мутации по остатку 115 (например, замена Tyr на Phe), 139 (например, замена Gln на Gly или Leu), 210 (например, замена Tyr на Phe), 217 (например, замена Tyr на Phe) и/или 219 (например, замена Asp на Ala) $\alpha 7$ -LBD понижала чувствительность химерного LGIC к эндогенному лиганду ACh. Данные химерные LGIC обеспечивают высокоселективный контроль над клеточной функцией в клетках млекопитающего, минимизируя перекрестную реактивность с эндогенными сигнальными системами у млекопитающего.

В целом, один из аспектов данного документа описывает модифицированный LGIC, имеющий по меньшей мере одну модифицированную субъединицу LGIC, которая включает LBD с модификацией аминокислоты, и IPD, где экзогенный лиганд LGIC активирует модифицированный LGIC. Модифицированный LGIC может представлять собой химерный LGIC, имеющий LBD первого LGIC и IPD второго LGIC. LBD может представлять собой LBD альфа7 никотинового ацетилхолинового рецептора ($\alpha 7$ -nAChR).

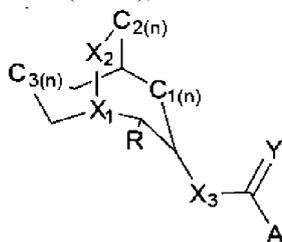
Модифицированный LGIC по п.3, где по меньшей мере одна модифицированная аминокислота в LBD $\alpha 7$ -nAChR содержит аминокислотную замену по аминокислотному остатку, выбранному из группы, состоящей из остатков 77, 79, 131, 139, 141, 175, и 216 LBD $\alpha 7$ -nAChR. Аминокислотная замена может быть по остатку 79 $\alpha 7$ -LBD, и аминокислотная замена может быть Q79A, Q79G или Q79S. Например, аминокислотная замена по остатку 79 $\alpha 7$ -LBD может представлять собой Q79G. IPD может представлять собой IPD серотонинового рецептора 3 типа (5HT3), IPD глицинового рецептора (GlyR), IPD рецептора гамма-аминомасляной кислоты (GABA) или IPD $\alpha 7$ -nAChR. IPD может представлять собой IPD GlyR, а IPD GlyR может включать аминокислотную замену по остатку 298 (например, замена A298G) химерного LGIC. IPD может представлять собой IPD GABA, и IPD GABA может включать аминокислотную замену по остатку 298 (например, замена W298A) модифицированного LGIC. Модифицированный LGIC может представлять собой химерный LGIC, включая α -LBD, имеющий аминокислотную замену Q7 9G, и IPD GlyR, имеющий аминокислотную замену A298G. Экзогенный лиганд LGIC может представлять собой синтетический экзогенный лиганд LGIC, выбранный из группы, состоящей из хинуклидина, тропана, 9-азабицикло[3.3.1]нонана, 6,7,8,9-тетрагидро-6,10-метано-6H-пиразино(2,3-h)бензазепина и 1,4-диазабицикло[3.2.2]нонана.

Когда синтетический экзогенный лиганд LGIC является тропаном, тропаном может представлять собой трописетрон, псевдо-трописетрон, нортрописетрон, соединение 723, соединение 725, соединение 737 или соединение 745. Когда синтетическим экзогенным лигандом LGIC является хинуклидин, хинуклидин может представлять собой PNU-282987, PNA-543613, соединение 0456, соединение 0434, соединение 0436, соединение 0354, соединение 0353, соединение 0295, соединение 0296, соединение 0536, соединение 0676 или соединение 702. Когда синтетическим экзогенным лигандом LGIC является 6,7,8,9-тетрагидро-6,10-метано-6H-пиразино(2,3-h)бензазепин, лиганд может представлять собой соединение 765 или соединение 770. Когда синтетическим экзогенным лигандом LGIC является 1,4-диазабицикло[3.2.2]нонаном, лиганд может представлять собой соединение 773 или соединение 774. В некоторых случаях LBD может быть α -LBD, и α -LBD может также включать по меньшей мере одну модифицированную аминокислоту, которая обеспечивает селективное связывание с другим $\alpha 7$ -LBD, имеющим по меньшей мере одну модифицированную аминокислоту, по сравнению со связыванием с немо-

дифицированным LGIC. Немодифицированный LGIC может представлять собой эндогенный LGIC (например, эндогенный $\alpha 7$ -nAChR). По меньшей мере одна модифицированная аминокислота в $\alpha 7$ -LBD, которая обеспечивает пониженное связывание с немодифицированным LGIC, может включать аминокислотную замену по остатку 27 (например, замена R27D) и/или остатку 41 (например, замена E41R). В некоторых случаях IPD может быть IPD 5HT3, и IPD 5HT3 может включать по меньшей мере одну модифицированную аминокислоту, которая обеспечивает повышенную ионную проводимость модифицированному LGIC. По меньшей мере одна модифицированная аминокислота в IPD 5HT3, которая обеспечивает повышенную ионную проводимость модифицированному LGIC, может включать аминокислотную замену в аминокислотном остатке по остатку 425 (например, замена R425Q), 429 (например, замена R429D) и/или 433 (например, замена R433A).

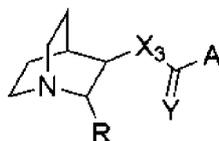
В другом аспекте данный документ описывает модифицированный LGIC, имеющий по меньшей мере одну модифицированную субъединицу LGIC, включая LBD, имеющий по меньшей мере одну модифицированную аминокислоту, и IPD, где по меньшей мере одна модифицированная аминокислота в LBD снижает связывание с эндогенным лигандом LGIC. Модифицированный LGIC может представлять собой химерный LGIC, имеющий LBD первого LGIC и IPD второго LGIC. Эндогенный лиганд LGIC может представлять собой ACh. Модифицированный LGIC может иметь значение EC_{50} более 20 мкМ для ACh. По меньшей мере одна модифицированная аминокислота может включать аминокислотную замену по остатку 115, 139, 210, 217 и/или 219. Когда по меньшей мере одна модифицированная аминокислота включает аминокислотную замену по остатку 115, аминокислотная замена может представлять собой замену Y115F. Если хотя бы одна модифицированная аминокислота включает аминокислотную замену по остатку 139, то аминокислотная замена может представлять собой замену Q139G или Q139L. Когда по меньшей мере одна модифицированная аминокислота включает аминокислотную замену по остатку 210, аминокислотная замена может представлять собой замену Y210F. Когда по меньшей мере одна модифицированная аминокислота включает аминокислотную замену по остатку 217, аминокислотная замена может представлять собой замену Y217F. Когда по меньшей мере одна модифицированная аминокислота включает аминокислотную замену по остатку 219, аминокислотная замена может представлять собой замену D219A.

В другом аспекте в данном документе описан лиганд, имеющий повышенную потентность в отношении лиганд-управляемого ионного канала (LGIC), где лиганд включает формулу I:



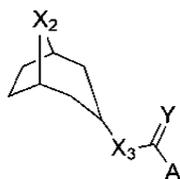
где каждый из X_1 , X_2 и X_3 может независимо представлять собой CH, CH₂, O, NH или NMe; где каждый n может независимо быть 0 или 1; где Y=O или S; где A=ароматический заместитель; и где R=H или пиридинилметил. Ароматический заместитель может представлять собой 1H-индол, 4-(трифторметил)бензол, 2,5-диметоксибензол, 4-хлоранилин, анилин, 5-(трифторметил)пиридин-2-ил, 6-(трифторметил)никотиновую кислоту или 4-хлорбензол.

В некоторых случаях лиганд LGIC может представлять собой хинуклидин и может иметь структуру, показанную в формуле II:



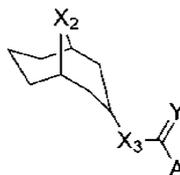
где X_3 =O, NH или CH₂; где Y=O или S; где A=ароматический заместитель; и где R=H или пиридинилметил. Ароматический заместитель может представлять собой 1H-индол, 4-(трифторметил)бензол, 4-хлорбензол, 2,5-диметоксибензол, 4-(трифторметил)бензол, 4-хлоранилин, анилин, 5-(трифторметил)пиридин-2-ил, 6-(трифторметил)никотиновую кислоту, 3-хлор-4-фторбензол или 1H-индол. Хинуклидин может представлять собой PNU-282987, PNA-543613, соединение 0456, соединение 0434, соединение 0436, соединение 0354, соединение 0353, соединение 0295, соединение 0296, соединение 0536, соединение 0676 или соединение 702.

В некоторых случаях лиганд LGIC может представлять собой тропан и может иметь структуру, показанную в формуле III:



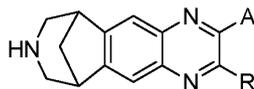
где $X_2 = \text{NH}$ или NMe ; где $X_3 = \text{O}$, NH или CH_2 ; где $Y = \text{O}$ или S ; и где $A =$ ароматический заместитель. Ароматический заместитель может представлять собой 1H-индол, 7-метокси-1H-индол, 7-метил-1H-индол, 5-хлор-1H-индол или 1H-индазол. Тропан может быть трописетроном, псевдо-трописетроном, нортрописетроном, соединением 723, соединением 725, соединением 737 или соединением 745.

В некоторых случаях лиганд LGIC может быть 9-азабицикло[3.3.1]нонаном и может иметь структуру, показанную в формуле IV:



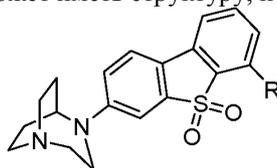
где X_1 может представлять собой CH , X_2 может представлять собой NH или NMe , X_3 может представлять собой O , NH или CH ; Y может представлять собой O или S , и A может представлять собой ароматический заместитель. Ароматический заместитель может представлять собой 4-хлорбензол. 9-азабицикло[3.3.1]нонан может представлять собой соединение 0536.

В другом аспекте в данном документе описан лиганд, обладающий повышенной потентностью в отношении модифицированного лиганд-управляемого ионного канала (LGIC), где лиганд может представлять собой 6,7,8,9-тетрагидро-6,10-метано-6H-пиразино(2,3-h)бензазепин и имеет структуру, показанную в формуле V:



где R может представлять собой H или CH_3 , и где A может представлять собой H или ароматический заместитель. 6,7,8,9-тетрагидро-6,10-метано-6H-пиразино(2,3-h)бензазепин может представлять собой варениклин, соединение 0765 или соединение 0770.

В другом аспекте в данном документе описан лиганд, имеющий повышенную потентность в отношении модифицированного лиганд-управляемого ионного канала (LGIC), где лиганд может представлять собой 1,4-диазабицикло[3.2.2]нонан и может иметь структуру, показанную в формуле VI:



где R может представлять собой H , F или NO_2 . 1,4-диазабицикло[3.2.2]нонан может представлять собой 3-(1,4-диазабицикло[3.2.2]нонан-4-ил)добензо[b,d]тиофен-5,5-диоксид, соединение 0773 или соединение 0774.

В другом аспекте в данном документе описаны способы лечения каналопатии у млекопитающего. Способы включают или состоят, по существу, из введения в клетку млекопитающих модифицированного LGIC, где экзогенный лиганд LGIC селективно связывается с модифицированным LGIC. Модифицированный LGIC имеет по меньшей мере одну модифицированную субъединицу LGIC, включая LBD, включая по меньшей мере одну модифицированную аминокислоту, и

IPD; и введение экзогенного лиганда млекопитающему. Каналопатия может представлять собой синдром Барттера, синдром Бругада, катехоламинергическую полиморфную желудочковую тахикардию (CPVT), врожденный гиперинсулинизм, муковисцидоз, синдром Драве, эпизодическую атаксию, эритро-мелалгию, генерализованную эпилепсию (например, с фебрильными судорогами), наследственную гемиплегическую мигрень, фибромиалгию, гиперкалиемический периодический паралич, гипокалиемический периодический паралич, миастенический синдром Ламберта-Итона, синдром удлинения интервала QT (например, синдром Романо-Уорда), синдром укороченного QT, злокачественную гипертермию, муколипидоз IV типа, миастению гравис, врожденную миотонию, нейромиелит зрительного нерва, нейромиотонию, внесиндромную глухоту, врожденную параимитонию, пигментный ретинит, синдром тимоти, шум в ушах, эпилептический припадок, невралгию тройничного нерва или рассеянный склероз.

В другом аспекте в данном документе описаны способы модулирования переноса ионов через клеточную мембрану млекопитающего. Методы включают или состоят, по существу, из введения в клетку модифицированного LGIC, где экзогенный лиганд LGIC селективно связывается с модифицированным

LGIC. Модифицированный LGIC имеет по меньшей мере одну модифицированную субъединицу LGIC, включая LBD, включая по меньшей мере одну модифицированную аминокислоту, и IPD; и введение экзогенного лиганда млекопитающему. Модулирование может включать активацию или ингибирование переноса ионов. Клетка может представлять собой нейрон, глиальную клетку, миоцит, стволовую клетку, эндокринную клетку или иммунную клетку. Введение модифицированного LGIC в клетку может быть введением *in vivo* или введением *ex vivo*. Введение модифицированного LGIC в клетку может включать введение нуклеиновой кислоты, кодирующей модифицированный LGIC.

В другом аспекте в данном документе описаны способы модулирования возбудимости клетки у млекопитающего. Способы включают или состоят, по существу, из введения в клетку млекопитающих модифицированного LGIC, где экзогенный лиганд LGIC селективно связывается с модифицированным LGIC. Модифицированный LGIC имеет по меньшей мере одну модифицированную субъединицу LGIC, включая LBD, включая по меньшей мере одну модифицированную аминокислоту, и IPD; и введение экзогенного лиганда млекопитающему. Модулирование может включать повышение возбудимости клетки или снижение возбудимости клетки. Клетка может быть возбудимой клеткой. Клетка может представлять собой нейрон, глиальную клетку, миоцит, стволовую клетку, эндокринную клетку или иммунную клетку. Введение модифицированного LGIC в клетку может быть введением *in vivo* или введением *ex vivo*. Введение модифицированного LGIC в клетку может включать введение нуклеиновой кислоты, кодирующей модифицированный LGIC.

В другом аспекте в данном документе описаны способы модулирования активности клетки у млекопитающего. Методы включают или состоят, по существу, из введения в клетку модифицированного LGIC, где экзогенный лиганд LGIC селективно связывается с модифицированным LGIC. Модифицированный LGIC имеет по меньшей мере одну модифицированную субъединицу LGIC, включая LBD, включая по меньшей мере одну модифицированную аминокислоту, и IPD; и введение экзогенного лиганда млекопитающему. Модулирование может включать повышение активности клетки или снижение активности клетки. Активность может представлять собой перенос ионов, пассивный перенос, возбуждение, ингибирование или экзоцитоз. Клетка может представлять собой нейрон, глиальную клетку, миоцит, стволовую клетку, эндокринную клетку или иммунную клетку. Введение модифицированного LGIC в клетку может быть введением *in vivo* или введением *ex vivo*. Введение модифицированного LGIC в клетку может включать введение нуклеиновой кислоты (например, посредством вирусного вектора, например, на основе аденоассоциированного вируса, вируса простого герпеса или лентивируса), кодирующей модифицированный LGIC.

В другом аспекте в данном документе описан способ идентификации лиганда, который селективно связывается с модифицированным LGIC. Данный способ включает или состоит, по существу, из обеспечения одного или нескольких лигандов-кандидатов для модифицированного LGIC, описанного в данном документе, и выявления связывания между лигандом-кандидатом и модифицированным LGIC, тем самым идентифицируя лиганд, который селективно связывается с модифицированным LGIC. Модифицированный LGIC может быть гомомерным модифицированным LGIC.

В другом аспекте в данном документе описан способ выявления модифицированного LGIC. Способ включает или состоит, по существу, из обеспечения одной или нескольких модифицированных субъединиц LGIC, описанного в настоящем документе, обеспечения агента, который селективно связывается с модифицированным LGIC, и выявления связывания между модифицированным LGIC и агентом, который селективно связывается с модифицированным LGIC, тем самым выявляя модифицированный LGIC. Агент, избирательно связывающийся с модифицированным LGIC, может представлять собой антитело, белок (например, бунгаротоксин) или малую молекулу (например, позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) с лигандами). Агент, который выборочно связывает модифицированный LGIC, может включать детектируемую метку (например, флуоресцентную метку, радиоактивную метку или позитронно-активную метку).

Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом в данной области техники, к которому относится данное раскрытие. Методы и материалы описаны здесь для использования в настоящем раскрытии; могут также использоваться другие, подходящие методы и материалы, известные в данной области техники. Материалы, методы и примеры носят лишь иллюстративный характер и не предназначены для ограничения. Все публикации, патентные заявки, патенты, последовательности, записи в базе данных и другие ссылки, упомянутые в настоящем документе, включаются путем ссылки в полном объеме. В случае конфликта настоящее описание, включая определения, будет иметь преимущественную силу.

Детали одного или нескольких вариантов осуществления изобретения изложены на прилагаемых чертежах и в описании ниже. Другие признаки, цели и преимущества изобретения будут очевидны из описания и чертежей, а также из формулы изобретения.

Описание графических материалов

На фиг. 1 показаны иллюстративные аминокислотные последовательности химерных LGIC. Мутация аминокислотных остатков 77 (например, W77F или W77Y) приводила к чувствительности к границе-

трону и трописетрону. Мутация аминокислотных остатков 79 (например, Q79G) была наиболее эффективной для нескольких агонистов. Мутации аминокислотных остатков 131 (например, L131G, L131A, L131M или L131N) изменяли чувствительность к варениклину, трописетрону, гранисетрону и ACh. Потентность была значительно повышена, когда мутации LBD сочетались с мутацией по аминокислотному остатку 298 в GlyR или IPD GABA_C. Потентность также усиливалась, когда мутации LBD $\alpha 7$ -nAChR сочетались с мутацией по аминокислотному остатку G175 и P216. А) аминокислотная последовательность химерного рецептора $\alpha 7$ -5HT₃ (SEQ ID NO: 6), включая компоненты LBD $\alpha 7$ -nAChR человека (SEQ ID NO: 1) и IPD 5HT₃ мыши (SEQ ID NO: 3). В) аминокислотная последовательность химерного рецептора $\alpha 7$ -GlyR (SEQ ID NO: 7), включая компоненты LBD $\alpha 7$ -nAChR человека (SEQ ID NO: 2) и IPD GlyR человека (SEQ ID NO: 5). С) аминокислотная последовательность химерного рецептора $\alpha 7$ -5HT₃ (SEQ ID NO: 8), включая компоненты LBD $\alpha 7$ -nAChR (SEQ ID NO: 1) и IPD 5HT₃ человека (SEQ ID NO: 4). D) Аминокислотная последовательность химерного рецептора $\alpha 7$ -GABA_C (SEQ ID NO: 10), включая компоненты LBD $\alpha 7$ nAChR человека (SEQ ID NO: 2) и компоненты IPD GABA_C человека (SEQ ID NO: 9). E) Аминокислотная последовательность крысиной последовательности nAChR (SEQ ID NO: 12).

На фиг. 2 показаны значения EC₅₀ для трописетрона против химерного LGIC $\alpha 7$ -5HT₃ и варианты химерного LGIC с мутациями LBD в позициях, показанных на фиг. 1. Множественные мутации по Gln79 показали аналогичную или улучшенную потентность по сравнению с немодифицированным каналом $\alpha 7$ -5HT₃ (стрелки).

На фиг. 3 показана относительная потентность известных агонистов nAChR для химерных LGIC $\alpha 7$ -5HT₃. А) График величин EC₅₀, нормализованных к немодифицированному химерному каналу $\alpha 7$ -5HT₃ (логарифмическая шкала). *P<0,05, отмечены статистически значимые изменения потентности (дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим тестом Данна). В) Структурные формулы известных агонистов nAChR.

На фиг. 4 показана относительная потентность известных агонистов nAChR для химерных LGIC $\alpha 7$ -GlyR. А) График величин EC₅₀ для Q79 LBD-мутантов, нормализованных к немодифицированному химерному каналу $\alpha 7$ -GlyR (логарифмическая шкала). В) График величин EC₅₀ для A298G IPD-мутации, нормализованных к немодифицированному химерному каналу $\alpha 7$ -GlyR (логарифмическая шкала). С) График величин EC₅₀ для $\alpha 7$ -GlyR^{A298G}, нормализованных к немодифицированному химерному каналу $\alpha 7$ -GlyR, и по сравнению с двойным мутантным каналом $\alpha 7$ Q79G-GlyR^{A298G} (логарифмическая шкала). *P<0,05, отмечены статистически значимые изменения потентности (дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим тестом Данна).

На фиг. 5 показаны схематические структуры агонистов LGIC с паттернами замещения, наиболее совместимыми с повышением потентности в отношении $\alpha 7$ ^{Q79G}-5HT₃ и $\alpha 7$ ^{Q79G}-GlyR^{A298G}. А) Обобщенная структура, показывающая признаки, связанные с повышенной потентностью. В) Специфическими фармакофорами, представленными на (А), являются основные структуры хинуклидина, тропана и 9-азабицикло[3.3.1]нонана. С) Иллюстративные синтетические молекулы, которые демонстрируют высокую потентность в отношении $\alpha 7$ ^{Q79G}-GlyR^{A298G}, $\alpha 7$ ^{Q79G,Y115F,G175K}-GlyR, $\alpha 7$ ^{W77F,Q79G,G175K}-GlyR.

На фиг. 6 показаны мутации, которые снижают ассоциацию LBD химерных LGIC $\alpha 7$ nAChR с немодифицированными LBD. А) Возможные конфигурации схемы изменения заряда для трансфекции двух конструкций, меченных эпитопом (HA и V5), кодирующих $\alpha 7$ -5HT₃ (вверху) или двух конструкций, кодирующих $\alpha 7$ -5HT₃-HA и $\alpha 7$ ^{R21D,E41R}-5HT₃-V5, где ассоциация между двумя различными субъединицами, помеченными эпитопом, будет нежелательна из-за мутаций с изменением заряда на поверхностях субъединиц. В) Метод фиксации в конфигурации "целая клетка" в клетках HEK, экспрессирующих $\alpha 7$ ^{R21D,E41R}-5HT₃ с меткой эпитопа V5, демонстрируют сильные ответы на PNU-282987. С) Ассоциация LGIC $\alpha 7$ -5HT₃ с метками эпитопов HA и V5 в клетках HEK была исследована с помощью НА-иммунопреципитации (слева) или полной изоляции лизата с последующим вестерн-блоттингом или с антителами против HA (сверху), или с антителами против V5 (снизу). В клетках, коэкспрессирующих каналы с эпитопами HA и V5, анти-HA IP с последующим иммуноблоттингом с анти-V5 демонстрирует совместную иммунопреципитацию немодифицированных каналов каждого типа, но мутации с изменением заряда в LBD $\alpha 7$ ^{R21D,E41R}-5HT₃-V5 не иммунопреципитировались. MW $\alpha 7$ -5HT₃ составляет ~48 кД (стрелка).

На фиг. 7 показано, что химерные LGIC можно контролировать, используя экзогенный лиганда. Кортикальные нейроны мозга мыши, трансдуцированные химерным LGIC $\alpha 7$ ^{Q79G}-GlyR^{A298G} посредством векторов на основе аденоассоциированного вируса (AAV), начинают генерировать потенциалы действия в ответ на инъекцию тока 40 пА (PRE), которые эффективно подавляются 30 нМ трописетрона. После промывки (WASH) трописетрона срабатывание нейронов восстанавливается.

На фиг. 8 показана активность агонистов на химерных LGIC с мутацией G175K. А) График значений EC₅₀ для Q79G G175K LBD-мутантов против известных агонистов, нормализованных к немодифицированному химерному каналу $\alpha 7$ -GlyR (логарифмическая шкала). В) График значений EC₅₀ для ACh и трописетрона для каналов с мутациями в химерных LGIC $\alpha 7$ -GlyR. Мутации, которые приводят к обра-

зованию каналов с высокой потентностью для трописетрона и низкой потентностью для эндогенного лиганда, ацетилхолина (ACh), являются оптимальными (выделение серым). Немод.: немодифицированный химерный LGIC $\alpha 7$ -GlyR. C) Потенциалы действия кортикальных нейронов мозга мыши, трансдуцированных химерным LGIC $\alpha 7^{Q79G, Y115F, G175K}$ -GlyR. Нейроны срабатывают в ответ на инъекцию тока (PRE) и сильно подавляются 100 нМ трописетрона. После промывки (WASH) трописетрона срабатывание нейронов восстанавливается.

На фиг. 9 показана активность агонистов на химерных LGIC с мутацией L131G. A) График значений EC_{50} для L131 LBD-мутантов против известных агонистов, нормализованных к немодифицированному химерному каналу $\alpha 7$ -GlyR (логарифмическая шкала). B) График значений EC_{50} для ACh и трописетрона для каналов с мутациями в химерных LGIC $\alpha 7^{L131G}$ -GlyR. C) Графики, показывающие мутации, которые приводят к образованию каналов с высокой потентностью для варениклина и низкой потентностью для эндогенного лиганда, ацетилхолина (ACh), являются оптимальными (выделение серым). Немод.: немодифицированный химерный LGIC $\alpha 7$ -GlyR. D) Потенциалы действия кортикальных нейронов мозга мыши, трансдуцированных химерным LGIC $\alpha 7^{L131G, Q139L, Y217F}$ -GlyR. Нейрон срабатывает в ответ на инъекцию тока (PRE) и сильно подавляется 10 нМ варениклина, даже при >6-кратном увеличении инъекции тока. После промывки (WASH) трописетрона срабатывание нейронов восстанавливается.

На фиг. 10 показаны структурные формулы агонистов LGIC. A) Структурные формулы агонистов LGIC с паттернами замещения, наиболее совместимыми с повышением потентности в отношении $\alpha 7^{Q79G, Y115F, G175K}$ -GlyR. B) Структурные формулы агонистов LGIC с паттернами замещения, наиболее совместимыми с повышением потентности в отношении $\alpha 7^{L131G, Q139L, Y217F}$ -GlyR или $\alpha 7^{L131G, Q139L, Y217F}$ -5HT3 HC.

Подробное описание изобретения

В данном документе приведены модифицированные LGIC и способы их использования. Например, в настоящем документе представлены модифицированные LGIC, включающие по крайней мере одну модифицированную субъединицу LGIC, имеющую LBD и IPD, и имеющую по меньшей мере одну модифицированную аминокислоту (например, аминокислотную замену). В некоторых случаях модифицированный LGIC может представлять собой химерный LGIC. Например, химерный LGIC может включать LBD первого LGIC и IPD второго LGIC. В некоторых случаях модифицированная аминокислота может обеспечивать фармакологическую селективность модифицированному LGIC. Например, модифицированная аминокислота может обеспечивать селективное связывание модифицированного LGIC с экзогенным лигандом LGIC. Например, модифицированная аминокислота может обеспечивать модифицированный LGIC с пониженным (минимизированным или исключенным) связыванием немодифицированной субъединицы LGIC (субъединицы LGIC без модификации и/или эндогенной субъединицы LGIC). Например, модифицированная аминокислота может обеспечивать модифицированный LGIC с пониженным (минимизированным или исключенным) связыванием эндогенного лиганда LGIC.

Модифицированные LGIC, представленные в настоящем документе, могут быть использованы, например, в способах лечения каналопатий (например, нервной каналопатии или мышечной каналопатии). Например, модифицированный LGIC и экзогенный лиганд LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его, можно использовать для лечения млекопитающего, имеющего каналопатию. В некоторых случаях модифицированный LGIC и экзогенный лиганд LGIC могут использоваться для модулирования (например, активации или ингибирования) переноса ионов через клеточную мембрану млекопитающего. В некоторых случаях модифицированный LGIC и экзогенный лиганд LGIC могут использоваться для модулирования (например, повышения или снижения) возбудимости клетки у млекопитающего.

Модифицированные LGIC.

В данном случае "модифицированный" LGIC представляет собой LGIC, который включает по меньшей мере одну субъединицу LGIC. Модифицированная субъединица LGIC может включать по меньшей мере одну модифицированную аминокислоту (например, аминокислотную замену) в LBD и/или по меньшей мере одну модифицированную аминокислоту (например, аминокислотную замену) в IPD. Описанная в данном документе модифицированная субъединица LGIC может представлять собой модификацию LGIC любого подходящего вида (например, человека, крысы, мыши, собаки, кошки, лошади, коровы, козы, свиньи или обезьяны). В некоторых случаях модифицированный LGIC может включать по меньшей мере одну химерную субъединицу LGIC, имеющую не встречающееся в природе сочетание LBD первого LGIC и IPD второго LGIC.

Модифицированный LGIC может быть гомомерным (например, иметь любое количество одинаковых модифицированных субъединиц LGIC) или гетеромерным (например, иметь по меньшей мере одну модифицированную субъединицу LGIC и любое количество различных субъединиц LGIC). В некоторых случаях модифицированный LGIC, описанный в настоящем документе, может быть гомомерным модифицированным LGIC. Модифицированный LGIC, описанный в настоящем документе, может включать любое подходящее количество модифицированных субъединиц LGIC. В некоторых случаях модифицированный LGIC может представлять собой тример, тетрамер, пентамер или гексамер. Например, модифицированный LGIC, описанный в настоящем документе, может быть пентамером.

Модифицированная субъединица LGIC, описанная в настоящем документе, может быть модификацией любого подходящего LGIC. LGIC может проводить анионы, катионы или и то, и другое через мембрану клетки в ответ на связывание лиганда. Например, LGIC может транспортировать ионы натрия (Na^+), калия (K^+), кальция (Ca^{2+}) и/или хлора (Cl^-) через клеточную мембрану в ответ на связывание лиганда. Примеры LGIC включают, без ограничения, Cys-петлевые рецепторы (например, AChR, такой как nAChR (например, nAChR мышечного типа или nAChR нейронного типа), рецепторы гамма-аминомасляной кислоты (GABA; например, GABA_A и GABA_{A- ρ} (также именуемые как GABA_C), GlyR, GluCl-рецепторы и 5HT₃-рецепторы), ионотропные глутаматные рецепторы (iGluR; например, AMPA-рецепторы, каинатные рецепторы, NMDA-рецепторы и дельта-рецепторы), АТФ-зависимые каналы (например, P2X) и фосфатидилинозитол 4,5-бисфосфат (PIP₂)-зависимые каналы. В случаях, когда модифицированный LGIC, описанный в настоящем документе, является химерным LGIC, химерный LGIC может включать LBD, выбранный из любого подходящего LGIC, и IPD, выбранный из любого подходящего LGIC. В тех случаях, когда LGIC включает несколько различных субъединиц (например, nAChR нейронного типа включает α 4-, β 2 - и α 7-субъединицы), LBD и/или IPD могут быть выбраны из любой субъединицы. Например, LBD nAChR может представлять собой α 7-LBD. Ниже приводится репрезентативная аминокислотная последовательность α 7 nAChR крысы (включая как LBD, так и IPD).

SEQ ID NO: 12

MGGGRGGIWLALAAALLHVSLQGEFQRRLYKELVKNYNPLERPVANDSQPLTVYFSLSL
LQIMDVDEKNQVLTNTNIWLQMSWTDHYLQWNMSEYPGVKNVRFDPGQIWKPDILLYNSADERFD
ATFHTNVLVNASGHCQYLPPGIFKSSCYIDVRWFPPDVQCKLKFGSWSYGGWSLDLQMQEADI
SSYIPNGEWDLMGIPGKRNEKFYECCKEYPDPVTYTVTMRRTLYYGLNLLIPCVLISALALLV
FLLPADSGEKISLGIITVLLSLTVFMLLVAEIMPATSDSVPLIAQYFASTMIIVGLSVVTVIVL
RYHHHDPDGKMPKWTRII LLNWCAWFLRMKRPGEDKVRPACQHKPRRCSLASVELSAGAGPPT
SNGNLLYIGFRGLEGMHCAPTDPDSGVVCGRLACSPTHDEHLMHGAHPSDGDPLAKILEEVRYI
ANRNRCDSESEVICSEWKFAACVVDPLCLMAFSVFTI ICTIGILMSAPNFVEAVSKDFA

В некоторых случаях модифицированная субъединица LGIC, описанная в данном документе, может включать LBD α 7-nAChR. Примеры LBD α 7 nAChR включают, без ограничения, LBD α 7 nAChR человека, имеющего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, LBD α 7 nAChR человека, имеющего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, и LBD α 7 nAChR человека, имеющего аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11. В некоторых случаях LBD α 7 nAChR может быть гомологом, ортологом или паралогом LBD α 7 nAChR человека, представленного в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 11. В некоторых случаях LBD α 7 nAChR может иметь по меньшей мере 75% идентичности последовательностей (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99%) с SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 11.

SEQ ID NO: 1

MRCSPGGVWLALAAASLLHVSLQGEFQRKLYKELVKNYNPLERPVANDSQPLTVYFSLSL
LQIMDVDEKNQVLTNTNIWLQMSWTDHYLQWNVSEYPGVKTVRFPDPGQIWKPDILLYNSADERFD
ATFHTNVLVNSSGHCQYLPPGIFKSSCYIDVRWFPPDVQHCKLKFGSWSYGGWSLDLQMQEADI
SGYIPNGEWDLVGIPGKRSERFYECCKEYPDPVTFTV

SEQ ID NO: 2

MRCSPGGVWLALAAASLLHVSLQGEFQRKLYKELVKNYNPLERPVANDSQPLTVYFSLSL
LQIMDVDEKNQVLTNTNIWLQMSWTDHYLQWNVSEYPGVKTVRFPDPGQIWKPDILLYNSADERFD

ATFHTNVLVNSSGHCQYLPPGIFKSSCYIDVRWFPPFDVQHCKLKFGSWSYGGWSLDLQMQEADI
SGYIPNGEWDLVGIPGKRSEFYECCKEYPDPVTFTVTMRRR

SEQ ID NO:11

MRCSPGGVWLALAAASLLHVSLQGEFQRKLYKELVKNYNPLERPVANDSQPLTVYFSLSL
LQIMDVDEKNQVLTNTNIWLQMSWTDHYLQWNVSEYYPGVKTVRFDPGQIWKPDILLYNSADERFD
ATFHTNVLVNSSGHCQYLPPGIFKSSCYIDVRWFPPFDVQHCKLKFGSWSYGGWSLDLQMQEADI
SGYIPNGEWDLVGIPGKRSEFYECCKEYPDPVTFTVTMRRRTLYY

В некоторых случаях модифицированная субъединица LGIC, описанная в данном документе, может включать IPD рецептора 5HT₃. Примеры IPD 5HT₃ включают, без ограничения, IPD 5HT₃ мыши с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 3, и IPD 5HT₃ человека с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 4. В некоторых случаях IPD 5HT₃ может быть гомологом, ортологом или паралогом IPD 5HT₃, представленного в SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 4. В некоторых случаях IPD 5HT₃ может иметь по меньшей мере 75% идентичности последовательностей (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99%) с SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4.

SEQ ID NO:3

IIRRRPLFYAVSLLLPSIFLMVVDIVGFCLPPDSGERVSFKITLLLGYSVFLIIVSDTL
PATIGTPLIGVYFVVCMLLVISLAETIFIVRLVHKQDLQRPVPDWRHLVLDRIAWILCLGEG
PMAHRPPATFQANKTDDCSGSDLLPAMGNHCSHVGGPQDLEKTPRGRGSPLPPPREASLAVRGL
LQELSSIRHFLEKRDEMREVARDWLRVGYVLDRLLFRIYLLAVLAYSITLVTLWSIWHYS

SEQ ID NO:4

LFYVVSLLLPSIFLMVMDIVGFYLPNSGERVSFKITLLLGYSVFLIIVSDTLPATIAIG
TPLIGVYFVVCMLLVISLAETIFIVRLVHKQDLQPPVPAWLRHLVLERIAWLLCLREQSTSQR
PPATSQATKTDDCSAMGNHCSHMGGPQDFEKSPDRDCSPPPPPREASLAVCGLLQELSSIRQFL
EKRDEIREVARDWLRVGSVLDKLLFHIYLLAVLAYSITLVMLWSIWQYA

В некоторых случаях модифицированная субъединица LGIC, описанная в настоящем документе, может включать IPD GlyR. Примеры IPD GlyR включают, без ограничения, IPD GlyR мыши, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5. В некоторых случаях IPD GlyR может быть гомологом, ортологом или паралогом IPD GlyR человека, указанного в SEQ ID NO: 5. В некоторых случаях GlyR IPD может иметь по меньшей мере 75% идентичности последовательностей (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99%) с SEQ ID NO: 5.

SEQ ID NO:5

MGYYLIQMYIPSLILVILSWISFWINMDAAPARVGLGITTVLTMTTQSSGSRASLPKVS
YVKAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVNFVSRQHKELLRFRRKRRHHKEDEAGEGRFNFSAYGMG
PACLQAKDGISVKGANNSNTTNPAPPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFY
WIIYKIVRREDVHNQ

В некоторых случаях модифицированная субъединица LGIC, описанная в настоящем документе, может включать IPD рецептора GABA (например, GABA_{A-р}, также именуемый как GABA_C). Примеры IPD GABA_{A-р} включают, без ограничения, IPD GABA_{A-р} человека, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9. В некоторых случаях IPD GABA_{A-р} может быть гомологом, ортологом или паралогом IPD GABA_{A-р} человека, представленного в SEQ ID NO: 9. В некоторых случаях IPD GABA_{A-р} может иметь по меньшей мере 75% идентичности последовательностей (например, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 82%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 97% или по меньшей мере 99%) с SEQ ID NO: 9.

SEQ ID NO:9

LLQTYFPATLMVMLSWSVFWIDRRVAVPARVPLGITTVLTMSTIITGVNASMPRVSYIKA
 VDIYLWVSFVVFVFLSVLEYAAVNYLTTVQERKEQKLREKLPCTSGLPPPRRTAMLDGNYSDGEVN
 DLDNYMPENGEKPDMMVQLTLASERSSPQRKSQRSSYVSMRIDTHAIDKYSRIIFPAAYILFN
 LIYWSIFS

При расчете процента идентичности последовательностей две последовательности выравнивают и определяют количество идентичных совпадений аминокислотных остатков между двумя последовательностями. Число идентичных совпадений делится на длину выровненного участка (т.е. количество выровненных аминокислотных остатков) и умножается на 100, чтобы получить значение процента идентичности последовательностей. Следует понимать, что длина выровненного участка может быть частью одной или обеих последовательностей вплоть до полной длины самой короткой последовательности. Кроме того, следует понимать, что одна последовательность может выравниваться с более чем одной другой последовательностью и, следовательно, может иметь разные значения процента идентичности последовательностей для каждого выровненного участка. Выравнивание двух или более последовательностей для определения процента идентичности последовательностей может быть выполнено, используя компьютерную программу ClustalW и параметры по умолчанию, которые вычисляют наилучшее совпадение между запросом и одной или несколькими предметными последовательностями и выравнивают их так, чтобы идентичности, сходства и различия могли быть определены. См., например, Chenna et al., 2003, *Nucleic Acids Res.*, 31(13):3497-500.

В случаях, когда модифицированная субъединица LGIC, описанная в настоящем документе, является химерной субъединицей LGIC, химерная субъединица LGIC может включать LBD и IPD одного вида или LBD и IPD разных видов. В некоторых случаях химерная субъединица LGIC может включать LBD белка-LGIC человека и IPD белка-LGIC человека. Например, химерная субъединица LGIC может содержать LBD $\alpha 7$ человека и IPD GlyR человека. В некоторых случаях химерная субъединица LGIC может включать LBD белка-LGIC человека и IPD белка-LGIC мыши. Например, химерная субъединица LGIC может содержать LBD $\alpha 7$ человека и IPD 5HT3 мыши.

В случаях, когда модифицированная субъединица LGIC, описанная в настоящем документе, является химерной субъединицей LGIC, химерная субъединица LGIC может включать в себя различные точки слияния, соединяющие LBD и IPD, так что количество аминокислот в LBD может изменяться, когда LBD сливается с различными IPD для формирования субъединицы химерного канала. Например, длина LBD $\alpha 7$ nAChR, используемого для формирования химерной субъединицы LGIC с IPD 5HTS, отличается от длины LBD $\alpha 7$ nAChR, используемого для формирования химерной субъединицы LGIC с IPD GlyR (сравните, например, фиг. 1A и 1C с фиг. 1B).

Модифицированная субъединица LGIC, описанная в настоящем документе, может включать LBD, имеющий по меньшей мере одну модифицированную аминокислоту, и/или IPD, имеющий по меньшей мере одну модифицированную аминокислоту. Например, модифицированная субъединица LGIC, описанная в настоящем документе, может включать $\alpha 7$ -LBD, имеющий по меньшей мере 75% идентичности последовательностей с SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12, и аминокислотную замену по аминокислотному остатку 27, 41, 77, 79, 131, 139, 141, 175, 210, 216, 217 и/или 219. Например, модифицированная субъединица LGIC, описанная в настоящем документе, может включать IPD GlyR, имеющий по меньшей мере 75% идентичности последовательностей с последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 5, и аминокислотную замену по аминокислотному остатку 298 химерного рецептора $\alpha 7$ -GlyR (например, SEQ ID NO: 7). Например, модифицированная субъединица LGIC, описанная в настоящем документе, может включать IPD GABA_C, имеющую по меньшей мере 75% идентичности последовательностей с SEQ ID NO: 9, и аминокислотную замену по аминокислотному остатку 298 химерного рецептора α -GABA_C (например, SEQ ID NO: 10). В некоторых случаях модифицированная субъединица LGIC, описанная в данном документе, может включать более одной (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать или более) аминокислотных модификаций. Модификация может представлять собой аминокислотную замену. В некоторых случаях модифицированная аминокислота может обеспечивать фармакологическую селективность модифицированному LGIC. Например, модифицированная аминокислота может обеспечивать селективное связывание модифицированного LGIC с экзогенным лигандом LGIC. Например, модифицированная аминокислота может обеспечивать модифицированный LGIC с пониженным (минимизированным или исключенным) связыванием немодифицированной субъединицы LGIC (субъединицы LGIC без модификации и/или эндогенной субъединицы LGIC). Например, модифицированная аминокислота может обеспечивать модифицированный LGIC с пониженным (минимизированным или исключенным) связыванием эндогенного лиганда LGIC.

В некоторых аспектах модифицированная субъединица LGIC, описанная в настоящем документе, может включать по меньшей мере одну модифицированную аминокислоту, которая обеспечивает моди-

фицированному LGIC селективное связывание (например, усиленное связывание или повышенную потенциальность) с экзогенным лигандом LGIC. Связывание с экзогенным лигандом LGIC может быть селективным по сравнению со связыванием с эндогенным лигандом LGIC. Модифицированная субъединица LGIC с селективным связыванием с экзогенным лигандом LGIC может включать любой подходящий LBD (например, $\alpha 7$ -LBD). В некоторых аспектах модифицированная субъединица LGIC может включать $\alpha 7$ LBD, представленный в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12, и аминокислотная модификация может представлять собой замену по аминокислотному остатку 77, 79, 131, 139, 141, 175 и/или 216. В некоторых случаях триптофан по аминокислотному остатку 77 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12 может быть замещен гидрофобным аминокислотным остатком, например, фенилаланином (например, W77F), тирозином (например, W77Y) или метионином (например, W77M). Например, модифицированная субъединица LGIC, описанная в данном документе, может включать в себя $\alpha 7$ -LBD, представленный в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12, и имеющий замену W77F. В некоторых случаях глутамин по аминокислотному остатку 79 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12 может быть замещен аминокислотным остатком, например, аланином (например, Q79A), глицином (например, Q79G) или серином (например, Q79S). Например, модифицированная субъединица LGIC, описанная в данном документе, может включать в себя $\alpha 7$ -LBD, имеющий замену Q79G. В некоторых случаях лейцин по аминокислотному остатку 131 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12 может быть замещен аминокислотным остатком, например, аланином (например, L131A), глицином (например, L131G), метионином (например, L131M), аспарагином (например, L131N), глутамином (например, L131Q), валином (например, L131V) или фенилаланином (например, L131F). В некоторых случаях глицин по аминокислотному остатку 175 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12 может быть замещен аминокислотным остатком, например, лизином (например, G175K), аланином (например, G175A), фенилаланином (например, G175F), гистидином (например, G175H), метионином (например, G175M), аргинином (например, G175R), серином (например, G175S), валином (например, G175V). В некоторых случаях пролин по аминокислотному остатку 216 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12 может быть замещен аминокислотным остатком, например, изолейцином (например, P216I). Модифицированная субъединица LGIC с селективным связыванием с экзогенным лигандом LGIC может включать любой подходящий IPD (например, IPD GlyR или IPD GABA_{A-p}). В некоторых аспектах модифицированная субъединица LGIC может включать IPD GlyR, представленный в SEQ ID NO: 5, и аминокислотная модификация может представлять собой замену по аминокислотному остатку 298 химерного рецептора $\alpha 7$ -GlyR (например, SEQ ID NO: 7). В некоторых случаях аланин по аминокислотному остатку 298 SEQ ID NO: 7 может быть замещен аминокислотным остатком, например, глицином (например, A298G). В некоторых аспектах модифицированная субъединица LGIC может включать IPD GABA_{A-p}, представленный в SEQ ID NO: 9, и аминокислотная модификация может представлять собой замену по аминокислотному остатку 298 химерного рецептора $\alpha 7$ -GABA_{A-p} (например, SEQ ID NO: 10). В некоторых случаях триптофан по аминокислотному остатку 298 SEQ ID NO: 10 может быть замещен аминокислотным остатком, например, аланином (например, W298A).

В некоторых случаях модифицированная субъединица LGIC, описанная в данном документе, может включать более одной (например, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, одиннадцать, двенадцать или более) аминокислотных модификаций. Например, модифицированная субъединица LGIC, описанная в настоящем документе, может иметь по меньшей мере 75% идентичности последовательностей с SEQ ID NO: 7 и может включать замену Q79G и замену A298G. Дополнительные примеры модификаций, которые могут обеспечивать модифицированному LGIC селективное связывание экзогенного лиганда LGIC, включают модификации, описанные в других документах (см., например, патентный документ США 8,435,762).

Модифицированную субъединицу LGIC, которая селективно связывается с (например, усиленное связывание или повышенная потенциальность) экзогенным лигандом LGIC по сравнению с эндогенным (например, каноническим) лигандом LGIC, также можно описать как имеющую усиленную потенциальность для экзогенного лиганда. В некоторых случаях модифицированная субъединица LGIC, описанная в настоящем документе, которая селективно связывается с экзогенным лигандом LGIC, может иметь по меньшей мере 4-кратно (например, по меньшей мере 5-кратно, по меньшей мере 6-кратно, по меньшей мере 7-кратно, по меньшей мере 8-кратно, по меньшей мере 9-кратно, по меньшей мере 10-кратно, по меньшей мере 11-кратно, по меньшей мере 12-кратно, по меньшей мере 13-кратно, по меньшей мере 14-кратно, по меньшей мере 15-кратно, по меньшей мере 16-кратно, по меньшей мере 17-кратно, по меньшей мере 18-кратно, по меньшей мере 19-кратно или по меньшей мере 20-кратно) усиленную потенциальность для экзогенного лиганда. В некоторых случаях модифицированная субъединица LGIC, описанная в данном документе, которая селективно связывается с экзогенным лигандом LGIC, может иметь от приблизительно 4-кратно до приблизительно 200-кратно (например, от приблизительно 4-кратно до приблизительно 200-кратно, от приблизительно от 5-кратно до приблизительно 180-кратно, от приблизительно 6-кратно до приблизительно 175-кратно, от приблизительно 7-кратно до приблизительно 150-кратно, от прибли-

тельно 8-кратно до приблизительно 125-кратно, от приблизительно 9-кратно до приблизительно 100-кратно, от приблизительно 10-кратно до приблизительно 90-кратно, от приблизительно 11-кратно до приблизительно 75-кратно, от приблизительно 12-кратно до приблизительно 65-кратно, от приблизительно 13-кратно до приблизительно 50-кратно, от приблизительно 14-кратно до приблизительно 40-кратно или от приблизительно 15-кратно до приблизительно 30-кратно) повышенную потентность для экзогенного лиганда. Например, описанная в данном документе модифицированная субъединица LGIC, которая селективно связывается с экзогенным лигандом LGIC, может иметь приблизительно от 10-кратно до приблизительно 100-кратно повышенную потентность для экзогенного лиганда. Например, описанная в данном документе модифицированная субъединица LGIC, которая селективно связывается с экзогенным лигандом LGIC, может иметь приблизительно от 10-кратно до приблизительно 20-кратно повышенную потентность для экзогенного лиганда.

В некоторых аспектах модифицированная субъединица LGIC, описанная в настоящем документе, может включать по меньшей мере одну модифицированную аминокислоту, которая обеспечивает модифицированный LGIC с пониженным (например, минимизированным или исключенным) связыванием с немодифицированной субъединицей LGIC. Связывание с модифицированной субъединицей LGIC, имеющей такую же модификацию, может быть селективным по сравнению со связыванием с немодифицированной субъединицей LGIC.

Немодифицированная субъединица LGIC может представлять собой субъединицу LGIC, не имеющую модификации, которая обеспечивает модифицированный LGIC с пониженным связыванием с немодифицированной субъединицей LGIC, или немодифицированный LGIC может представлять собой эндогенную субъединицу LGIC. Модификация, которая обеспечивает модифицированному LGIC пониженное связывание с немодифицированной субъединицей LGIC, может быть модификацией с изменением заряда. Модифицированная субъединица LGIC с пониженным связыванием с немодифицированной субъединицей LGIC может включать любой подходящий LBD (например, $\alpha 7$ -LBD). В некоторых аспектах модифицированная субъединица LGIC может включать $\alpha 7$ -LBD, представленный в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12, и аминокислотная модификация может представлять собой замену по аминокислотному остатку 27 и/или 41. Например, аргинин по аминокислотному остатку 27 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12 может быть замещен аспарагиновой кислотой (например, R27D). Например, глутаминовая кислота по аминокислотному остатку 41 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12 может быть замещена аргинином (например, E41R). В некоторых случаях модифицированная субъединица LGIC, описанная в настоящем документе, может включать $\alpha 7$ -LBD, имеющий замену R27D, и E41R.

В некоторых аспектах модифицированная субъединица LGIC, описанная в настоящем документе, может включать по меньшей мере одну модифицированную аминокислоту, которая обеспечивает модифицированный LGIC с пониженным (например, минимизированным или исключенным) связыванием эндогенного лиганда LGIC. Эндогенный лиганд LGIC может представлять собой ACh. Модифицированная субъединица LGIC с пониженным связыванием эндогенного лиганда LGIC может включать любой подходящий IPD (например, GlyR-LBD). Например, модифицированная субъединица LGIC может включать $\alpha 7$ LBD, представленный в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12, и аминокислотная модификация может представлять собой замену по аминокислотному остатку 115, 131, 139, 210, 217 и/или 219. В некоторых случаях тирозин по аминокислотному остатку 115 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12 может быть замещен фенилаланином (например, Y115F). В некоторых случаях лейцин по аминокислотному остатку 131 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12 может быть замещен аминокислотным остатком, например, аланином (например, L131A), глицином (например, L131G), метионином (например, L131M), аспарагином (например, L131N), глутамином (например, L131Q), валином (например, L131V) или фенилаланином (например, L131F). В некоторых случаях глутамин по аминокислотному остатку 139 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12 может быть замещен глицином (например, Q139G) или лейцином (например, Q139L). В некоторых случаях тирозин по аминокислотному остатку 210 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12 может быть замещен фенилаланином (например, Y210F). В некоторых случаях тирозин по аминокислотному остатку 217 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12 может быть замещен фенилаланином (например, Y217F). В некоторых случаях аспартат по аминокислотному остатку 219 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12 может быть замещен аланином (например, D219A).

В некоторых аспектах модифицированная субъединица LGIC, описанная в настоящем документе, может включать по меньшей мере одну модифицированную аминокислоту, которая обеспечивает модифицированный LGIC с повышенной ионной проводимостью. В некоторых случаях модифицированная субъединица LGIC может включать IPD 5HT₃, представленный в SEQ ID NO: 3, и аминокислотная модификация может представлять собой замену по аминокислотному остатку 425, 429 и/или 433. Например, модифицированная субъединица LGIC, описанная в данном документе, может содержать IPD 5HT₃, имеющий замену R425Q, замену R429D и замену R433A. В некоторых случаях модифицированная субъ-

L131N) и 139 (например, Q139L) и 217 (например, Y217F), и IPD 5HT3 человека (SEQ ID NO: 4) с заменой R420Q, заменой R424D и заменой R428A.

В некоторых случаях модифицированный LGIC, описанный в настоящем документе, может включать по меньшей мере одну химерную субъединицу LGIC α 7-GlyR (SEQ ID NO: 7), имеющую LBD α 7 nAChR человека (SEQ ID NO: 2) с заменой по аминокислотным остаткам 175 (например, G175K) и 115 (например, Y115F), и IPD GlyR человека (SEQ ID NO: 5).

В некоторых случаях модифицированный LGIC, описанный в настоящем документе, может включать по меньшей мере одну химерную субъединицу LGIC α 7-GlyR (SEQ ID NO: 7), имеющую LBD α 7 nAChR человека (SEQ ID NO: 2) с заменой по аминокислотным остаткам 175 (например, G175K) и 115 (например, Y115F) и 79 (например, Q79G), и IPD GlyR человека (SEQ ID NO: 5).

В некоторых случаях модифицированный LGIC, описанный в настоящем документе, может включать по меньшей мере одну химерную субъединицу LGIC α 7-GlyR (SEQ ID NO: 7), имеющую LBD α 7 nAChR человека (SEQ ID NO: 2) с заменой по аминокислотным остаткам 175 (например, G175K) и 77 (например, W77F) и 79 (Q79G), и IPD GlyR человека (SEQ ID NO: 5).

В некоторых случаях модифицированный LGIC, описанный в настоящем документе, может включать по меньшей мере одну химерную субъединицу LGIC α 7-GlyR (SEQ ID NO: 7), имеющую LBD α 7 nAChR человека (SEQ ID NO: 2) с заменой по аминокислотному остатку 216 (например, P216I), и IPD GlyR человека (SEQ ID NO: 5).

В некоторых случаях модифицированный LGIC, описанный в настоящем документе, может включать по меньшей мере одну химерную субъединицу LGIC α 7-GlyR (SEQ ID NO: 7), имеющую LBD α 7 nAChR человека (SEQ ID NO: 2) с заменой по аминокислотным остаткам 216 (например, P216I) и 79 (например, Q79G), и IPD GlyR человека (SEQ ID NO: 5).

В некоторых случаях модифицированный LGIC, описанный в настоящем документе, может включать по меньшей мере одну химерную субъединицу LGIC α 7-GlyR (SEQ ID NO: 10), имеющую LBD α 7 nAChR человека (SEQ ID NO: 2) с заменой по аминокислотному остатку 131 (например, L131A, L131G, L131M, L131N, L131Q, L131V или L131F), и IPD GABA_C человека (SEQ ID NO: 9).

В случаях, когда LBD и/или IPD представляет собой гомолог, ортолог или паралог последовательности, представленной в настоящем документе (например, SEQ ID NO: 1-5 и/или 9), предполагается, что ссылка на конкретный модифицированный аминокислотный остаток может перемещаться на соответствующую аминокислоту в гомологе, ортологе или паралоге. Например, остатки 425, 429 и 433 в IPD 5HT3 мыши, представленные в SEQ ID NO: 3, соответствуют остаткам 420, 424 и 428 в IPD 5HT3 человека, представленным в SEQ ID NO: 4, и замены R425Q, R429D и R433A в IPD 5HT3 мыши соответствуют заменам R420Q, R424D и R428A в IPD 5HT3 человека.

Любой способ может быть использован для получения модифицированной субъединицы LGIC, описанной в настоящем документе. В некоторых случаях методы синтеза пептидов могут быть использованы для получения модифицированной субъединицы LGIC, описанной в настоящем документе. Примеры методов синтеза пептидов включают, без ограничения, жидкофазный пептидный синтез и твердофазный пептидный синтез. В некоторых случаях методы биосинтеза белка могут быть использованы для создания модифицированной субъединицы LGIC, описанной в настоящем документе. Примеры методов биосинтеза белка включают, без ограничения, транскрипцию и/или трансляцию нуклеиновых кислот, кодирующих представленный в настоящем документе пептид, имитирующий фосфорилирование. Подобные модифицированные субъединицы LGIC (например, модифицированные субъединицы, имеющие, по существу, одинаковые модификации и/или имеющие, по существу, одинаковую аминокислотную последовательность) будут самостоятельно собираться посредством взаимодействий между LBD с образованием модифицированного LGIC.

В данном документе также представлены нуклеиновые кислоты, кодирующие модифицированные субъединицы LGIC, согласно настоящему описанию, а также конструкции (например, плазмиды, невирусные векторы, вирусные векторы (например, векторы на основе аденоассоциированного вируса, вируса простого герпеса или лентивируса)) для экспрессии нуклеиновых кислот, кодирующих модифицированные субъединицы LGIC, описанные в настоящем документе. Описанные здесь нуклеиновые кислоты, кодирующие модифицированные субъединицы LGIC, могут быть функционально связаны с любым подходящим промотором. Промотор может быть нативным (то есть минимальным) промотором или составным промотором. Промотор может быть универсальным (то есть конститутивным) промотором или регулируемым промотором (например, индуцируемым, тканеспецифическим, специфическим к типу клеток (например, нейрон-специфическим, мышечно-специфическим, глиально-специфическим) и специфическим к нейронному подтипу). Примеры промоторов, которые можно использовать для управления экспрессией нуклеиновых кислот, кодирующих модифицированные субъединицы LGIC, описанные в настоящем документе, включают, без ограничения, синапсин, CAMKII, CMV, CAG, энолазу, TRPV1, POMC, NPY, AGRP, MCH и орексиновые промоторы. В некоторых случаях нуклеиновая кислота, кодирующая субъединицу модифицированного LGIC, описанную в настоящем документе, может быть функционально связана с нейрон-специфическим промотором.

В данном документе также представлены клетки (например, клетки млекопитающих), имеющие модифицированный LGIC, описанный здесь. Клетки млекопитающих, имеющие модифицированный LGIC, описанный в настоящем документе, могут быть получены любым подходящим способом. В некоторых случаях предварительно собранный модифицированный LGIC может быть доставлен в клетку. В некоторых случаях нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированную субъединицу LGIC, описанную в данном документе, может быть доставлена в клетку в условиях, при которых модифицированная субъединица LGIC транскрибируется, и в условиях, при которых множество (например, три, четыре, пять, шесть или более) модифицированных субъединиц LGIC могут собираться в модифицированный LGIC, описанный в настоящем документе.

Лиганды LGIC.

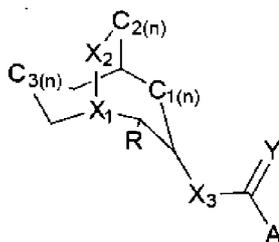
В данном документе также представлены лиганды LGIC, которые могут связываться с модифицированными LGIC, описанными здесь, и активировать их. Лиганд LGIC, который может связываться с модифицированными LGIC, описанными в настоящем документе, и активировать их, может быть экзогенным или эндогенным. Лиганд LGIC, который может связываться с модифицированными LGIC, описанными в настоящем документе, и активировать их, может быть природным или синтетическим. Лиганд LGIC, который может связываться с модифицированными LGIC, описанными в настоящем документе, и активировать их, может быть каноническим или неканоническим. Лиганд LGIC, который может связываться с модифицированными LGIC, описанными в настоящем документе, и активировать их, может быть природным или синтетическим. В некоторых случаях лиганд LGIC является экзогенным агонистом LGIC. Примеры лигандов LGIC включают, без ограничения, ACh, никотин, эпибататин, цитизин, RS56812, трописетрон, нортрописетрон, PNU-282987, PNA-543613, соединение 0353, соединение 0354, соединение 0436, соединение 0676, соединение 702, соединение 723, соединение 725, гранисетрон, ивермектин, меквитазин, промазин, варениклин, соединение 765, соединение 770, 3-(1,4-дизабцикло[3.2.2]нонан-4-ил)добензо[b,d]тиофен-5,5-диоксид, соединение 773 и соединение 774 (см., например, фиг. 3B, фиг. 5C, фиг. 10A и фиг. 10B).

Лиганд LGIC, который может связываться с модифицированными LGIC и активировать их, описанный в настоящем документе, может иметь селективное связывание (например, усиленное связывание или повышенную потентность) для модифицированного LGIC, описанного здесь. В некоторых случаях лиганд LGIC, который может связываться с модифицированными LGIC, описанными в настоящем документе, и активировать их, не связывается с эндогенными рецепторами и не активирует их. Лиганд LGIC, который селективно связывается с модифицированным LGIC и активирует его (например, модифицированный LGIC, имеющий по меньшей мере одну аминокислотную модификацию, которая обеспечивает фармакологическую селективность модифицированному LGIC), описанный в настоящем документе, по сравнению с немодифицированным лигандом LGIC, также может быть описан как имеющий повышенную потентность в отношении модифицированного LGIC. В некоторых случаях описанная в данном документе модифицированная субъединица LGIC, которая селективно связывается с экзогенным лигандом LGIC, может иметь по меньшей мере 5-кратно (например, по меньшей мере 10-кратно, по меньшей мере 15-кратно, по меньшей мере 20-кратно, по меньшей мере 25-кратно, по меньшей мере 30-кратно, по меньшей мере 35-кратно, по меньшей мере 40-кратно, по меньшей мере 45-кратно, по меньшей мере 50-кратно, по меньшей мере 55-кратно, по меньшей мере 60-кратно, по меньшей мере 65-кратно, по меньшей мере 70-кратно, по меньшей мере 75-кратно, по меньшей мере 80-кратно, по меньшей мере 85-кратно, по меньшей мере 95-кратно, по меньшей мере 100-кратно, по меньшей мере 125-кратно, по меньшей мере 150-кратно, по меньшей мере 200-кратно, по меньшей мере 200-кратно, по меньшей мере 250-кратно или по меньшей мере 300-кратно) повышенную потентность в отношении модифицированного LGIC. Например, лиганд LGIC, селективно связывающийся с модифицированным LGIC и активирующий его, может иметь от приблизительно 10-кратно до приблизительно 300-кратно (например, от приблизительно 10-кратно до приблизительно 250-кратно, от приблизительно 10-кратно до приблизительно 200-кратно, от приблизительно 10-кратно до приблизительно 150-кратно, от приблизительно 10-кратно до приблизительно 100-кратно, от приблизительно 25-кратно до приблизительно 300-кратно, от приблизительно 50-кратно до приблизительно 300-кратно, от приблизительно 100-кратно до приблизительно 300-кратно, от приблизительно 200-кратно до приблизительно 300-кратно, от приблизительно 25-кратно до приблизительно 250-кратно, от приблизительно 50-кратно до приблизительно 200-кратно или от приблизительно 100-кратно до приблизительно 150-кратно) повышенную потентность в отношении модифицированного LGIC. В некоторых случаях лиганд LGIC, связывающийся с модифицированным LGIC, описанным в настоящем документе, и активирующий его, может иметь лигандную потентность менее 25 нМ (например, менее 22 нМ, менее 20 нМ, менее 17 нМ, менее 15 нМ, менее 13 нМ, менее 12 нМ, менее 11 нМ, менее 10 нМ, менее 5 нМ, менее 2 М или менее 1 нМ). Например, лиганд LGIC, связывающийся с модифицированным LGIC, описанным в настоящем документе, и активирующий его, может иметь лигандную потентность менее 15 нМ. В некоторых случаях лиганд LGIC может иметь значение EC_{50} менее 25 нМ (например, менее 22 нМ, менее 20 нМ, менее 17 нМ, менее 15 нМ, менее 13 нМ, менее 12 нМ, менее 11 нМ или менее 10 нМ) для модифицированной субъединицы LGIC, описанной здесь. Например, лиганд LGIC (например, трописетрон) может иметь значение EC_{50} около 11 нМ для модифици-

рованной субъединицы LGIC, описанной в настоящем документе (например, $\alpha 7^{Q79G}$ -GlyR^{A298G}). Например, лиганд LGIC (например, нортрописетрон) может иметь значение EC₅₀ около 13 нМ для модифицированной субъединицы LGIC, описанной в настоящем документе (например, $\alpha 7^{Q79G, Y115F}$ -GlyR^{A298G}). В некоторых случаях лиганд LGIC может иметь значение EC₅₀ более 20 мкМ (например, более 22 мкМ, более 25 мкМ, более 35 мкМ, более 50, более 65 мкМ, более 80 мкМ или более 100 мкМ) для модифицированной субъединицы LGIC, описанной в настоящем документе. Например, лиганд LGIC (например, ACh) может иметь значение EC₅₀ более 100 мкМ для модифицированной субъединицы LGIC, описанной в настоящем документе (например, $\alpha 7^{Q79G, Y115F}$ -GlyR^{A298G}).

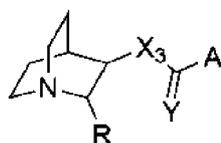
В некоторых аспектах лиганд LGIC может быть синтетическим лигандом, который может связываться с модифицированными LGIC, описанными в настоящем документе, и активировать их, может представлять собой хинуклидин, тропан, 9-азабицикло[3.3.1]нонан или 2-фенил-7,8,9,10-тетрагидро-6H-6,10-метаноазепино[4,5-g]хиноксалин.

Лиганд LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC, описанным в данном документе, и активировать его, может иметь формулу I:



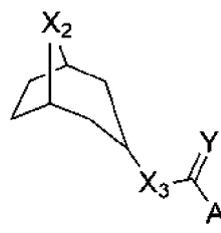
где X₁ и X₂ могут независимо представлять собой CH, CH₂, O, NH или NMe; каждый n может независимо быть 0 или 1; Y может представлять собой O или S; A может представлять собой ароматический заместитель; и R может представлять собой H или пиридиниметил. Примеры ароматических заместителей включают, без ограничения, 4-хлорбензол, 1H-индол, 4-(трифторметил)бензол, 4-хлорбензол, 2,5-диметоксибензол, 4-хлоранилин, анилин, 5-(трифторметил)пиридин-2-ил, 6-(трифторметил)никотиновую кислоту и 4-хлорбензол.

Лиганд LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC, описанным в данном документе, и активировать его, может представлять собой хинуклидин. Хинуклидин может иметь структуру по формуле II:



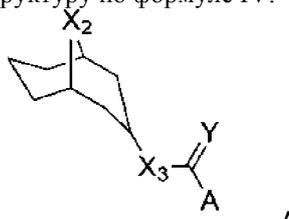
где X₃ может быть O, NH или CH₂; Y может быть O или S; A может представлять собой ароматический заместитель; и R может представлять собой H или пиридинилметил. Примеры ароматических заместителей включают, без ограничения, 1H-индол, 4-(трифторметил)бензол, 4-хлорбензол, 2,5-диметоксибензол, 4-(трифторметил)бензол, 4-хлоранилин, анилин, 5-(трифторметил)пиридин-2-ил, 6-(трифторметил)никотиновую кислоту, 3-хлор-4-фторбензол, 4-хлорбензол и 1H-индол. Примеры хинуклидинов включают, без ограничения, соединения PNU-282987, PNA-543613, 0456, 0434, 0436, 0354, 0353, 0295, 0296 и 0676 (см., например, фиг. 5C, табл. 3 и табл. 6).

Лиганд LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC, описанным в данном документе, и активировать его, может представлять собой тропан. Тропан может иметь структуру по формуле III:



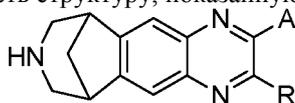
где X₂ может представлять собой NH или NMe; X₃ может представлять собой O, NH или CH₂; Y может представлять собой O или S; и A может представлять собой ароматический заместитель. Примеры ароматических заместителей могут включать, без ограничения, 1H-индол, 7-метокси-1H-индол, 7-метил-1H-индол, 5-хлор-1H-индол и 1H-индазол. Примеры тропанов включают, без ограничения, трописетрон, псевдо-трописетрон, нортрописетрон, соединение 737 и соединение 745 (см., например, фиг. 5C, табл. 3 и табл. 6).

Лиганд LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его, описанный в настоящем документе, может представлять собой 9-азабицикло[3.3.1]нонан. 9-азабицикло[3.3.1]нонан может иметь структуру по формуле IV:



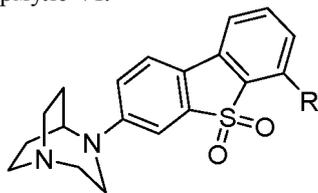
где X_1 может представлять собой CH, X_2 может представлять собой NH или NMe, X_3 может представлять собой O, NH или CH; Y может представлять собой O или S; и A может представлять собой ароматический заместитель. Примером ароматических заместителей является, без ограничения, 4-хлорбензол. Примеры 9-азабицикло[3.3.1]нонанов включают, без ограничения, соединение 0536, соединение 0749, соединение 0751, соединение 0760 и соединение 0763 (см., например, фиг. 5С, табл. 3 и табл. 6).

В некоторых случаях лиганд LGIC может представлять собой 6,7,8,9-тетрагидро-6,10-метано-6Н-пиперино(2,3-н)бензазепин и может иметь структуру, показанную в формуле V:



где R=H или CH_3 ; и где A=H или ароматический заместитель. Примеры 6,7,8,9-тетрагидро-6,10-метано-6Н-пиперино(2,3-н)бензазепинов включают, без ограничения, варениклин, соединение 0765 и соединение 0770 (см., например, фиг. 10А, табл. 3 и табл. 9).

В некоторых случаях лиганд LGIC может представлять собой 1,4-дизабицикло[3.2.2]нонан и может иметь структуру, показанную в формуле VI:



где R=H, F, NO_2 . Примеры 1,4-дизабицикло-[3.2.2]нонанов включают, без ограничений, 3-(1,4-дизабицикло-[3.2.2]нонан-4-ил)дифензо[b,d]тиофен-5,5-диоксид, соединение 0773 и соединение 0774 (см., например, фиг. 10В, табл. 6 и табл. 9).

Способы использования.

В данном документе также представлены способы использования модифицированного LGIC, описанного здесь, и лиганда LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его, согласно настоящему описанию. Лиганд LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его, может использоваться для активации модифицированного LGIC с временным и/или пространственным контролем на основе доставки лиганда.

В некоторых аспектах модифицированный LGIC, описанный в настоящем документе, и лиганд LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его, согласно настоящему описанию, могут использоваться для идентификации лиганда, который избирательно связывается с модифицированным LGIC, описанным здесь. Например, такие способы скрининга могут включать обеспечение одного или нескольких лигандов-кандидатов для модифицированного LGIC, описанного в данном документе, и выявления связывания между лигандом-кандидатом и модифицированным LGIC.

Любой подходящий метод может быть использован для выявления связывания между лигандом-кандидатом и модифицированным LGIC, и любой подходящий метод может быть использован для выявления активности модифицированного LGIC. Например, способность лиганда связываться с модифицированным LGIC и активировать его можно измерить с помощью анализов, включая, но не ограничиваясь, анализ мембранного потенциала (МП) (например, флуоресцентный анализ МП), анализ радиоактивного связывания и/или измерение фиксации потенциала пиковых токов и установившихся токов.

В некоторых аспектах модифицированный LGIC, описанный в настоящем документе, и лиганд LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его, согласно настоящему описанию, могут использоваться для лечения млекопитающего, имеющего каналопатию (например, нервную каналопатию или мышечную каналопатию). Например, млекопитающее, имеющее каналопатию, можно лечить путем введения модифицированного LGIC, описанного в настоящем документе, и затем введения лиганда LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его. Например, млекопитающее, имеющее каналопатию, можно лечить введением модифицированного LGIC, описанного в настоящем документе (например, включая по меньшей мере одну химерную субъединицу LGIC $\alpha 7$ -GlyR (SEQ ID NO: 6), имеющую LBD $\alpha 7$ nAChR человека (SEQ ID NO: 2), с аминокис-

лотной заменой R27D, аминокислотной заменой E41R, аминокислотной заменой Q79G и аминокислотной заменой Y115F и IPD GlyR человека (SEQ ID NO: 5), с аминокислотной заменой A298G), и затем введением трописетрона. Например, млекопитающее, имеющее каналопатию, можно лечить введением модифицированного LGIC, описанного в настоящем документе, включая модифицированный LBD $\alpha 7$ nAChR человека (например, SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 12) с аминокислотной заменой L131 (например, L131G, L131A, L131M или L131N), и, дополнительно, аминокислотной заменой Q79S, аминокислотной заменой Q139L и/или аминокислотной заменой Y217F, и затем введением варениклина, трописетрона и/или соединения 765.

Любой вид млекопитающего можно лечить с использованием модифицированного LGIC, описанного в настоящем документе, и лиганда LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его, согласно настоящему описанию. Например, людей и других приматов, таких как обезьяны, можно лечить, используя модифицированный LGIC, описанного в настоящем документе, и лиганд LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его, согласно настоящему описанию. В некоторых случаях собак, кошек, лошадей, коров, свиней, овец, кроликов, мышей и крыс можно лечить с использованием модифицированного LGIC, описанного в настоящем документе, и лиганда LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его, согласно настоящему описанию.

Любой подходящий метод может быть использован для идентификации млекопитающего, имеющего каналопатию и/или млекопитающего, подверженного риску развития каналопатии. Например, генетическое тестирование может быть использовано для выявления млекопитающего, имеющего каналопатию и/или млекопитающего, подверженного риску развития каналопатии.

После того, как выявлено, что у млекопитающего есть каналопатия и/или оно подвержено риску развития каналопатии, млекопитающему можно вводить или предписывать вводить самостоятельно модифицированный LGIC, описанный в настоящем документе, и затем вводить или предписывать вводить самостоятельно лиганд LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его, согласно настоящему описанию. Модифицированный LGIC, описанный в настоящем документе, и лиганд LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его, согласно настоящему описанию, можно вводить вместе или отдельно.

При лечении млекопитающего, имеющего каналопатию и/или млекопитающего, подверженного риску развития каналопатии, с использованием материалов и методов, описанных здесь, каналопатия может представлять собой любую каналопатию. В контексте данного документа термин "каналопатия" может представлять собой любое заболевание или расстройство, вызванное aberrантной функцией ионного канала и/или aberrантной функцией лиганда, или которое может быть облегчено посредством модулированной функции ионного канала и/или измененного клеточного потока ионов (например, потока ионов кальция). Каналопатия может быть врожденной или приобретенной. Примеры каналопатии включают, без ограничения, синдром Барттера, синдром Бругада, катехоламинергическую полиморфную желудочковую тахикардию (CPVT), врожденный гиперинсулинизм, муковисцидоз, синдром Драве, эпизодическую атаксию, эритромелалгию, генерализованную эпилепсию (например, с фебрильными судорогами), наследственную гемиплегическую мигрень, фибромиалгию, гиперкалиемический периодический паралич, гипокалиемический периодический паралич, миастенический синдром Ламберта-Итона, синдром удлинения интервала QT (например, синдром Романо-Уорда), синдром укороченного QT, злокачественную гипертермию, муколипидоз IV типа, миастению гравис, врожденную миотонию, нейромиелит зрительного нерва, нейромиотонию, внесиндромную глухоту, врожденную парамиотонию, пигментный ретинит, синдром тимоти, шум в ушах, эпилептический припадок, невралгию тройничного нерва и рассеянный склероз. В альтернативном варианте или в дополнение описанные в настоящем документе материалы и методы могут быть использованы в других областях применения, включая, без ограничения, обезболивание, терапию раковых клеток, контроль аппетита, лечение спастичности, лечение мышечной дистонии, лечение тремора и лечение расстройств движений.

В некоторых случаях модифицированный LGIC, описанный в настоящем документе, и лиганд LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его, согласно настоящему описанию, могут использоваться для модулирования активности клетки. Активность клетки, которая модулируется, используя модифицированный LGIC, описанный в настоящем документе, и лиганд LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его, согласно настоящему описанию, может представлять собой любую клеточную активность. Примеры клеточных активностей включают, без ограничения, активный перенос (например, перенос ионов), пассивный перенос, возбуждение, ингибирование, ионный поток (например, поток ионов кальция) и экзоцитоз. Клеточная активность может быть повышенной или пониженной. Например, модифицированный LGIC, описанный в настоящем документе, и лиганд LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его, согласно настоящему описанию, может использоваться для модулирования (например, увеличения) переноса ионов через мембрану клетки. Например, модифицированный LGIC, описанный здесь, и лиганд LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его, согласно настоящему описанию, могут использоваться для модулирования (например, повышения) возбу-

димости клетки.

Модифицированный LGIC, описанный в настоящем документе, и лиганд LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его, согласно настоящему описанию, могут использоваться для модулирования активности любого типа клеток у млекопитающего. Клетка может представлять собой нейрон, глиальную клетку, миоцит, иммунную клетку (например, нейтрофилы, эозинофилы, базофилы, лимфоциты и моноциты), эндокринную клетку или стволовую клетку (например, эмбриональную стволовую клетку). В некоторых случаях клетка может быть возбудимой клеткой. Клетка может быть *in vivo* или *ex vivo*.

Модифицированный LGIC, описанный в настоящем документе, можно вводить любым подходящим способом. Модифицированный LGIC можно вводить в виде модифицированных субъединиц LGIC или в виде предварительно собранных модифицированных LGIC. Модифицированный LGIC можно вводить в виде нуклеиновой кислоты, кодирующей модифицированный LGIC. Модифицированный LGIC можно вводить в виде нуклеиновой кислоты, кодирующей модифицированную субъединицу LGIC, описанную в настоящем документе. Например, нуклеиновая кислота может быть доставлена в виде "голой" нуклеиновой кислоты или используя любой подходящий вектор (например, рекомбинантный вектор). Векторы могут представлять собой векторы на основе ДНК, на основе РНК или их комбинацию. Векторы могут экспрессировать нуклеиновую кислоту в делящихся или неделящихся клетках. Примеры рекомбинантных векторов включают, без ограничения, плазмиды, вирусные векторы (например, ретровирусные векторы, аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы и векторы на основе вируса простого герпеса), космиды и искусственные хромосомы (например, искусственные хромосомы дрожжей или искусственные бактериальные хромосомы). В некоторых случаях нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированную субъединицу LGIC, описанную в настоящем документе, может быть экспрессирована при помощи аденоассоциированного вирусного вектора.

Описанный здесь модифицированный LGIC может быть выявлен (например, для подтверждения его присутствия в клетке) любым подходящим способом. В некоторых случаях агент, который избирательно связывается с модифицированным LGIC, может использоваться для выявления модифицированного LGIC. Примеры агентов, которые могут быть использованы для связывания с модифицированным LGIC, описанным здесь, включают, помимо прочего, антитела, белки (например, бунгаротоксин) и низкомолекулярные лиганды (например, ПЭТ-лиганды). Агент, который селективно связывается с модифицированным LGIC, может включать детектируемую метку (например, флуоресцентные метки, радиоактивные метки, позитронно-активные метки и ферментные метки). Методы выявления экспрессии LGIC в клетке могут включать флуоресцентную визуализацию, автордиографию, функциональную МРТ, ПЭТ и ОФЭКТ.

Модифицированный LGIC, описанный в настоящем документе, и лиганд LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его, согласно настоящему описанию, можно вводить млекопитающему, имеющему каналопатию и/или подверженному риску развития каналопатии, в качестве комбинированной терапии с одним или несколькими дополнительными агентами/методами лечения, используемыми для лечения каналопатии. Например, комбинированная терапия, используемая для лечения млекопитающего, имеющего каналопатию, согласно настоящему описанию, может включать введение модифицированного LGIC, описанного в настоящем документе, и лиганда LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его, как описано здесь, и лечение ацетазоламиндом, дихлорфенамидом, мексилитином, глюкозой, глюконатом кальция, L-ДОПом, стимуляцией мышц, спинномозговой стимуляцией, стимуляцией мозга и/или нервной стимуляцией.

В вариантах осуществления изобретения, где модифицированный LGIC, описанный в настоящем документе, и лиганд LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его, согласно настоящему описанию, используются в сочетании с дополнительными агентами/методами лечения, используемыми для лечения каналопатии, один или несколько дополнительных агентов можно вводить одновременно или раздельно. Например, во-первых, модифицированный LGIC, описанный в настоящем документе, и лиганд LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его, согласно настоящему описанию, и, во-вторых, вводят один или несколько дополнительных агентов, или наоборот. В вариантах осуществления изобретения, где модифицированный LGIC, описанный в настоящем документе, и лиганд LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его, в контексте данного документа, используются в сочетании с одним или несколькими дополнительными методами лечения, используемыми для лечения каналопатии, один или несколько дополнительных методов лечения можно проводить одновременно или независимо от введения модифицированного LGIC, описанного здесь, и лиганда LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его, согласно настоящему описанию. Например, модифицированный LGIC, описанный в настоящем документе, и лиганд LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его, согласно настоящему описанию, можно вводить до, во время или после проведения одного или нескольких дополнительных методов лечения.

В некоторых случаях модифицированный LGIC, описанный в настоящем документе, и/или лиганд LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его, согласно настоящему

описанию, могут быть составлены в фармацевтически приемлемую композицию для введения млекопитающему, имеющему каналопатию или подверженному риску развития каналопатии. Например, терапевтически эффективное количество модифицированного LGIC, описанного в настоящем документе (например, нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированный LGIC, описанный здесь), и/или лиганд LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его, согласно настоящему описанию, могут быть составлены вместе с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми носителями (добавками) и/или разбавителями. Фармацевтическая композиция может быть составлена для введения в твердой или жидкой форме, включая, без ограничения, стерильные растворы, суспензии, композиции с замедленным высвобождением, таблетки, капсулы, пилюли, порошки и гранулы.

Фармацевтически приемлемые носители, наполнители и основы, которые могут быть использованы в фармацевтической композиции, описанной в настоящем документе, включают, без ограничения, ионообменники, оксид алюминия, стеарат алюминия, лецитин, сывороточные белки, например, сывороточный альбумин человека, буферные вещества, например, фосфаты, глицин, сорбиновую кислоту, сорбат калия, неполные глицеридные смеси насыщенных растительных жирных кислот, воду, соли или электролиты, например, протаминсульфат, натрия моногидрофосфат, дикалия гидрофосфат, натрия хлорид, соли цинка, коллоидный диоксид кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, вещества на основе целлюлозы, полиэтиленгликоль, натриевую соль карбоксиметилцеллюлозы, полиакрилаты, воски, блок-полимеры полиэтилен-полиоксипропилен, полиэтиленгликоль и ланолин.

Фармацевтическая композиция, содержащая модифицированный LGIC, описанный в настоящем документе, и/или лиганд LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его, согласно настоящему описанию, может быть предназначена для перорального, парентерального (в том числе подкожного, внутривенного, внутриартериального, внутримышечного, внутривенного, внутрикоронового, внутрикожного, или местного) или ингаляционного введения. При пероральном введении фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество модифицированного LGIC, описанного в настоящем документе (например, нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированный LGIC, описанный здесь), и/или лиганд LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его, согласно настоящему описанию, может быть в форме пилюли, таблетки или капсулы. Композиции, пригодные для парентерального введения, включают водные и неводные стерильные инъекционные растворы, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатики и растворы, которые с кровью предполагаемого реципиента делают композицию изотонической; и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут включать суспендирующие вещества и загустители. Композиции для ингаляции могут быть доставлены с использованием, например, ингалятора, распылителя и/или порошкового ингалятора. Композиции могут быть представлены в боксах с однократной дозой или несколькими дозами, например, в герметичных ампулах и флаконах, и могут храниться в сублимированных (лиофилизированных) условиях, требующих только добавления стерильного жидкого носителя, например воды для инъекций, непосредственно перед использованием. Экстемпоральные инъекционные растворы и суспензии могут быть приготовлены из стерильных порошков, гранул и таблеток.

Фармацевтически приемлемая композиция, включающая терапевтически эффективное количество модифицированного LGIC, описанного в настоящем документе (например, нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированный LGIC, описанный здесь), и/или лиганд LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его, согласно настоящему описанию, может быть введена локально или системно. В некоторых случаях композиция, содержащая терапевтически эффективное количество модифицированного LGIC, описанного в настоящем документе (например, нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный LGIC, описанный здесь) и/или лиганд LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его, согласно настоящему описанию, можно вводить системно путем внутривенного или перорального введения или ингаляции млекопитающим (например, человеком). В некоторых случаях композиция, содержащая терапевтически эффективное количество модифицированного LGIC, описанного в настоящем документе (например, нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный LGIC, описанный здесь) и/или LGIC лиганд, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его, согласно настоящему описанию, может вводиться локально путем чрескожного, подкожного, внутримышечного, внутривенного или открытого хирургического введения (например, инъекции) в ткань-мишень млекопитающего (например, человека).

Эффективные дозы могут варьироваться в зависимости от тяжести каналопатии, способа введения, возраста и общего состояния здоровья пациента, использования вспомогательных веществ, возможности совместного использования с другими терапевтическими воздействиями, например, использования других агентов, и усмотрения лечащего врача.

Частота введения может быть любой частотой, которая улучшает симптомы каналопатии, не создавая значительной токсичности для млекопитающего. Например, частота введения может быть от приблизительно одного раза в неделю до приблизительно трех раз в день, приблизительно два раза в месяц до приблизительно шести раз в день или приблизительно два раза в неделю до приблизительно одного раза в день. Частота введения может оставаться постоянной или может варьироваться в течение всего периода

лечения. Курс лечения композицией, содержащей терапевтически эффективное количество модифицированного LGIC, описанного в настоящем документе (например, нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный LGIC, описанный здесь), и/или лиганд LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его, согласно настоящему описанию, может включать перерывы. Например, можно вводить композицию, содержащую терапевтически эффективное количество модифицированного LGIC, описанного в настоящем документе (например, нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный LGIC, описанный здесь) и/или лиганд LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его, согласно настоящему описанию, ежедневно в течение двухнедельного периода, за которым следует двухнедельный перерыв, и такой режим можно повторять несколько раз. Как и в случае с эффективным количеством, различные факторы могут влиять на фактическую частоту введения, используемую для конкретного применения. Например, эффективное количество, продолжительность лечения, использование нескольких лечебных средств, способ введения и тяжесть каналопатии могут потребовать увеличения или уменьшения частоты введения.

Эффективная продолжительность введения композиции, содержащей терапевтически эффективное количество модифицированного LGIC, описанного в настоящем документе (например, нуклеиновую кислоту, кодирующую модифицированный LGIC, описанный здесь), и/или лиганд LGIC, который может связываться с модифицированным LGIC и активировать его, согласно настоящему описанию, может быть любой продолжительностью, которая улучшает симптомы каналопатии, не создавая значительной токсичности для млекопитающего. Например, продолжительность действия может варьироваться от нескольких дней до нескольких недель, месяцев или лет. В некоторых случаях продолжительность действия для лечения каналопатии может варьироваться от приблизительно одного месяца до приблизительно 10 лет. Множество факторов могут влиять на фактическую продолжительность действия, используемую для конкретного лечения. Например, продолжительность действия может варьироваться в зависимости от частоты введения, эффективного количества, использования нескольких лечебных средств, способа введения и степени тяжести каналопатии, подлежащей лечению.

В некоторых случаях можно контролировать курс лечения и симптомы млекопитающего, подлежащего лечению в связи с каналопатией. Любой подходящий метод может быть использован для мониторинга симптомов каналопатии.

Изобретение будет дополнительно описано в следующих примерах, которые не ограничивают объем изобретения, описанный в формуле изобретения.

Примеры

Пример 1. Мутации лиганд-связывающего домена, усиливающие потентность.

Скрининг проводили с панелью из 41 химерного канала $\alpha 7$ -5HT₃, которые имеют мутантные LBD, против панели из 51 применяемого в клинической практике препарата с химическим подобием с агонистами никотиновых рецепторов. Мутации были в остатках, выделенных на фиг. 1. Скрининг выявил мутации по Gln⁷⁹ в LBD $\alpha 7$ nAChR, которые усиливали потентность известного агониста nAChR - трописетрона (фиг. 2). Данные мутации (Q79A, Q79G, Q79S) уменьшают размер аминокислотной боковой цепи. Некоторые комбинации мутантных ионных каналов-лигандов привели к 12-кратному улучшению потентности (табл. 1, фиг. 3). Мутации Q79A, Q79G или Q79S не оказали значительного влияния на канонические агонисты $\alpha 7$ nAChR, ACh, никотин, эпibatидин и препарат против курения варениклин. Однако подгруппа агонистов $\alpha 7$ nAChR показала повышенную потентность с некоторыми мутациями. Цитизин, RS56812, трописетрон, нортрописетрон и PNU-282987 показали значительно улучшенную потентность в отношении $\alpha 7^{Q79G}$ -5HT₃. Кроме того, нортрописетрон и PNU-282987 показали значительно повышенную потентность в отношении $\alpha 7^{Q79A}$ -5HT₃ and $\alpha 7^{Q79S}$ -5HT₃ соответственно. Как правило, агонисты на основе фармакофора хинуклидина или тропана со связанной ароматической структурой, которая взаимодействует с комплементарной связывающей поверхностью лиганд-связывающего домена, показали улучшенную потентность с заменой Gln79 с меньшими аминокислотными остатками Ala, Gly или Ser. Для большинства агонистов $\alpha 7^{Q79G}$ -5HT₃ являлся наиболее предпочтительным мутантным химерным ионным каналом.

Таблица 1

Потентность агонистов nAChR против химерных катионных каналов, мутантных по Gln79 в клетках НЕК. Среднее значение EC_{50} , РЭМ в круглых скобках (мкМ)

Агонист	$\alpha 7$ -5HT3	$\alpha 7^{Q79A}$ -5HT3	$\alpha 7^{Q79G}$ -5HT3	$\alpha 7^{Q79S}$ -5HT3
Ацетилхолин	7,0 (0,8)	9,2 (1,8)	6,7 (0,6)	6,2 (1,4)
Никотин	3,9 (0,4)	4,1 (1,3)	3,1 (0,5)	2,1 (0,4)
Эпибатидин	0,053 (0,006)	0,067 (0,022)	0,050 (0,008)	0,044 (0,006)
Варениклин	0,92 (0,16)	0,76 (0,21)	0,91 (0,12)	0,47 (0,07)
Цитизин	8,2 (0,3)	4,0 (0,9)	1,7 (0,2)	4,4 (1,0)
RS56812	10 (1,8)	6,8 (1,9)	1,4 (0,2)	5,7 (0,8)
Трописетрон	0,24 (0,03)	0,08 (0,02)	0,035 (0,002)	0,11 (0,02)
Нортрописетрон	0,061 (0,021)	0,010 (0,002)	0,006 (0,001)	0,019 (0,007)
PNU-282987	0,22 (0,03)	0,037 (0,009)	0,018 (0,003)	0,023 (0,004)

Данные мутантные LBD были использованы для создания химерных каналов $\alpha 7$ -GlyR, обладающих вплоть до 6-кратно повышенной потентностью для большинства из этих лигандов (фиг. 4А). Подобно мутациям $\alpha 7$ -5HT3, данные мутации по Gln79 не оказывали значительного влияния на потентность ACh, никотина, эпибатидина, варениклина или цитизина. Тем не менее, трописетрон, нортрописетрон и RS56812 показали значительно повышенную потентность в отношении $\alpha 7^{Q79G}$ -GlyR. Подобно мутациям LBD для $\alpha 7$ -5HT3, нортрописетрон имел значительно повышенную потентность в отношении $\alpha 7^{Q79A}$ -GlyR, и PNU-282987 демонстрировал значительно повышенную потентность в отношении $\alpha 7^{Q79S}$ -GlyR. Для большинства агонистов $\alpha 7^{Q79G}$ -GlyR являлся наиболее предпочтительным мутантным химерным ионным каналом.

Другая взаимосвязь, которая наблюдалась при скрининге малых молекул, заключалась в том, что мутации по Trp77 обеспечивали агонистическую активность для препарата гранисетрона в отношении рецепторов $\alpha 7^{W77F}$ -5HT3 (EC_{50} : 1,2 мкМ), $\alpha 7^{W77Y}$ -5HT3 (EC_{50} : 1,1 мкМ) и 7^{W77F} -GlyR (EC_{50} : 0,66 мкМ). Гранисетрон является антагонистом рецептора 5HT3, гранисетроном, который не активирует $\alpha 7$ -5HT3 или $\alpha 7$ -GlyR.

Данные результаты показывают, что мутация Q79 (по A, G или S) в LBD $\alpha 7$ nAChR усиливает связывание известных лигандов LGIC с модифицированными LGIC.

Пример 2. Мутации домена ионных пор, усиливающие потентность.

Каналы $\alpha 7$ -GlyR, имеющие мутации IPD, ранее установленные в полноразмерных каналах глициновых рецепторов (T258S и A288G, нумерация GlyR; что эквивалентно T268S и A298G для нумерации $\alpha 7$ -GlyR), были исследованы на предмет повышенной потентности для аллостерического агониста ивермектина. Было обнаружено, что каналы, имеющие $\alpha 7$ -GlyR^{T268S}, имеют значительную вероятность открытия без лигандов, что делает их непригодными для контролируемых лигандом манипуляций с клетками. Мутации в $\alpha 7$ -GlyR^{A298G}, которые были эффективны для усиления потентности ивермектина в отношении полноразмерного глицинового рецептора, приводили к незначительному изменению в вероятности открытия в отсутствие лиганда; таким образом, была изучена активность данного канала против группы известных агонистов. Для канонических агонистов ACh, никотина и эпибатидина, а также для варениклина и трописетрона, агонистическая потентность не была существенно повышена в отношении $\alpha 7$ -GlyR^{A298G}. Подгруппа агонистов $\alpha 7$ nAChR демонстрировала незначительное 4-кратное увеличение потентности: RS56812, цитизин, PNU-282987 и нортрописетрон были значительно более потентными. Таким образом, эффект мутации IPD A298G улучшал потентность лиганда, но зависел от структуры лиганда и был не таким эффективным, как мутации в LBD.

Изучена мутация Q79G в LBD и A298G IPD-мутация для $\alpha 7$ -GlyR (табл. 2). Двойной мутантный химерный канал, $\alpha 7^{Q79G}$ -GlyR^{A298G}, приводил к синергетическому усилению потентности, демонстрируя вплоть до 18-кратное увеличение потентности по сравнению с $\alpha 7$ -GlyR по отношению к агонистам $\alpha 7$ nAChR. Повышение от данного двойного мутантного канала было больше, чем от единичных мутаций для агонистов RS56812, трописетрона, нортрописетрона и PNU-282987. Кроме того, подчеркивая неожиданную структурную чувствительность данной комбинации мутаций, множественные агонисты, например, ACh, никотин, эпибатидин, варениклин и цитизин, существенно не изменялись между $\alpha 7$ -GlyR и $\alpha 7^{Q79G}$ -GlyR^{A298G}. Таким образом, сочетание мутации LBD Q79G с мутацией IPD A298G привело к синергетическому эффекту, при котором потентность некоторых, но не всех никотиновых агонистов была значительно увеличена ~10-20-кратно.

Таблица 2

Потентность агонистов nAChR против мутированных химерных каналов-переносчиков для ионов хлора. Среднее значение EC₅₀ и РЭМ в круглых скобках (мкМ) для активности агониста в клетках НЕК, экспрессирующих химерные каналы.

Агонист	$\alpha 7$ GlyR	$\alpha 7^{Q79A}$ -GlyR	$\alpha 7^{Q79G}$ -GlyR	$\alpha 7^{Q79S}$ -GlyR	$\alpha 7$ -GlyR ^{A298G}	$\alpha 7^{Q79G}$ -GlyR ^{A298G}
Ацетилхолин	6,4 (1,2)	7,6 (1,7)	7,1 (1,2)	4,5 (1,2)	6,4 (1,8)	4,8 (0,5)
Никотин	5,0 (1,8)	2,6 (0,7)	4,1 (0,3)	1,4 (0,4)	3,1 (1,8)	2,2 (0,6)
Эпibatидин	0,062 (0,021)	0,038 (0,005)	0,069 (0,011)	0,024 (0,003)	0,018 (0,001)	0,032 (0,007)
Варениклин	0,62 (0,2)	0,48 (0,08)	1,1 (0,25)	0,28 (0,06)	0,25 (0,04)	0,33 (0,08)
Цитизин	6,4 (2,0)	4,5 (0,6)	5,6 (2,1)	2,5 (0,7)	2,1 (0,28)	2,8 (1,0)
RS56812	6,5 (1,8)	3,5 (0,5)	2,0 (0,15)	2,8 (0,5)	2,3 (0,1)	0,61 (0,14)
Трописетрон	0,15 (0,045)	0,044 (0,008)	0,038 (0,003)	0,040 (0,009)	0,065 (0,026)	0,011 (0,002)
Нортрописетрон	0,022 (0,007)	0,004 (0,001)	0,008 (0,003)	0,005 (0,001)	0,005 (0,001)	0,002 (0,001)
PNU-282987	0,13 (0,038)	0,022 (0,004)	0,026 (0,005)	0,014 (0,002)	0,035 (0,005)	0,007 (0,001)

Данные результаты показывают, что мутация Q79 (по A, G или S) в LBD $\alpha 7$ nAChR и/или мутация A298 (по G) в IPD GlyR дополнительно усиливают селективное связывание известных лигандов LGIC с модифицированными LGIC.

Пример 3. Молекулы, проявляющие повышенную потентность.

Основываясь на взаимосвязи структурной активности известных агонистов, которые показали повышенную потентность к $\alpha 7^{Q79G}$ -GlyR^{A298G}, были протестированы множество синтетических молекул, состоящих из фармакофоров хинуклидина, тропана или 9-азабицикло[3.3.1]нонана с одним или несколькими ароматическими заместителями боковой цепи. Кроме того, также был испытан известный агонист $\alpha 7$ nAChR PNA-543613 (Walkeretal2006,Wishkaetal2006), и показал значительную потентность в отношении $\alpha 7^{Q79G}$ -GlyR^{A298G}. Данные молекулы, как правило, демонстрировали 10-100-кратно повышенную потентность (табл. 3), что указывает на то, что для этих фармакофоров ряд структурных признаков был совместим с улучшенной потентностью в отношении $\alpha 7^{Q79G}$ -GlyR^{A298G}.

Данные результаты показывают, что модифицированные LGIC могут быть активированы синтетическими хинуклидин-содержащими и тропан-содержащими лигандами LGIC.

Таблица 3

Потентность соединений против химерных каналов. Среднее значение EC₅₀ и РЭМ в круглых скобках (мкМ) для активности агониста в клетках НЕК, экспрессирующих химерные каналы. Частичный относится к активности частичного агониста.

Соединение	X ₁	X ₂	X ₃	Y	C ₁ n	C ₂ n	C ₃ n	Конфигурация С-Х	R	A	α7-5HT3 EC ₅₀ (мкМ)	α7-GlyR EC ₅₀ (мкМ)	α7 ^{Q79G} -GlyR ^{A298G} EC ₅₀ (мкМ)
PNU-282987	N	CH ₂	NH	O	0	1	0	R	H	4-хлорбензол	0,22	0,13	0,007
Трописетрон	C	NMe	O	O	1	0	0	Эндо	H	1Н-индол	0,24	0,15	0,011
Псевдо-трописетрон	C	NMe	O	O	1	0	0	Экзо	H	1Н-индол	2	0,7	<0,2
Нортрописетрон	C	NH	O	O	1	0	0	Эндо	H	1Н-индол	0,061	0,022	0,002
PNA-543613	N	CH ₂	NH	O	0	1	0	R	H	фуоро[2,3]пиридин	0,046	0,039	0,004
0542	C	NMe	NH	S	1	0	0	Эндо	H	1Н-индол	3,8	0,58	0,072
0026	N	CH ₂	O	O	0	1	0	S	H	4-(трифторметил)бензол	-	13,7	1,43
0456	N	CH ₂	CH ₂ -NH	S	0	1	0	смеш	H	4-хлорбензол	-	2,8	0,47
0434	N	CH ₂	NH	O	0	1	0	смеш	пиридин-3-илметил	2,5-диметоксibenзол	>10	>10	0,19
0436	N	CH ₂	NH	O	0	1	0	смеш	пиридин-3-илметил	4-(трифторметил)бензол	0,84	0,31	0,006
0354	N	CH ₂	NH	S	0	1	0	R	H	4-хлоранилин	1,4 частичный	1,0	0,03
0353	N	CH ₂	NH	O	0	1	0	S	H	анилин	0,65	0,27	0,01
0295	N	CH ₂	NH	O	0	1	0	S	H	5-(трифторметил)пиридин-2-ил	>100	>100	4,6
0296	N	CH ₂	NH	O	0	1	0	S	H	6-(трифторметил)никотиновая кислота	>100	-	0,45
0536	C	NMe	NH	S	1	0	1	Эндо	H	4-хлорбензол	>33	>100	9,1
0676	N	CH ₂	NH	O	0	1	0	S	H	1Н-индол	0,03	0,018	0,002

Пример 4. Мутации, снижающие чувствительность к ацетилхолину.

α7 nAChR обладает относительно низкой чувствительностью к ACh по сравнению с другими изоформами nAChR, и мутации, усиливающие потентность лигандов тропана и хинуклидина, не изменяли значительно потентность ацетилхолина в отношении данных каналов. Таким образом, химерные каналы были дополнительно модифицированы для снижения чувствительности данных каналов к ацетилхолину. Чувствительность к ацетилхолину в некоторых случаях была значительно снижена до более чем 100 мкМ при дополнительных мутациях LBD Y115F и Q139G, которые лишь незначительно снижали потентность некоторых агонистов для α7^{Q79G,Y115F}-5HT3 α7^{Q79G,Q139G}-5HT3 α7^{Q79G,Q139G}-GlyR^{A298G} α7^{Q79G,Y115F}-GlyR^{A298G}. Например, α7^{Q79G,Y115F}-GlyR^{A298G} имеет значение EC₅₀ 13 нМ для нортрописетрона и >100 мкМ для ACh (табл. 4).

Табл. 4. Потентность агонистов nAChR против мутированных химерных каналов-переносчиков для ионов хлора с низкой чувствительностью к ацетилхолину. Среднее значение EC₅₀ и РЭМ в круглых скобках (мкМ) для активности в клетках НЕК, экспрессирующих химерные каналы.

Таблица 4

	α7 ^{Q79G,Y115F} -5HT3	α7 ^{Q79G,Q139G} -5HT3	α7 ^{Q79G,Y115F} -GlyR ^{A298G}	α7 ^{Q79G,Q139G} -GlyR ^{A298G}	α7 ^{R27D,E41R,Q79G,Y115F} -GlyR ^{A298G}
Ацетилхолин	>100	36 (2)	>100	73 (27)	>100
Никотин	34 (4)	24 (4)	22 (3)	30 (8)	7,5 (1,3)
Трописетрон	0,10 (0,12)	0,31 (0,06)	0,086 (0,043)	0,26 (0,04)	0,035 (0,021)
Нортрописетрон	0,028 (0,005)	0,047 (0,013)	0,013 (0,001)	0,031 (0,006)	0,003 (0,001)
PNU-282987	0,35 (0,07)	0,16 (0,04)	0,22 (0,04)	0,18 (0,04)	0,066 (0,010)

Данные результаты показывают, что мутации Y115F и/или Q139G в LBD α7 nAChR снижают связывание эндогенного лиганда LGIC ACh с модифицированным LGIC.

Пример 5. Мутации, снижающие ассоциации с субъединицами эндогенных рецепторов.

Сборка α7 nAChR основана на ассоциациях пяти гомомерных субъединиц посредством взаимодействия между LBD (Celie et al., 2004 Neuron 41: 907-14). Чтобы свести к минимуму нежелательные ассо-

циации с эндогенными субъединицами $\alpha 7$ nAChR и/или нежелательные ассоциации химерных каналов, потенциальные межсубъединичные солевые мостики были идентифицированы путем изучения кристаллической структуры белка, связывающего ацетилхолин, и выявления близлежащих межсубъединичных остатков с противоположным зарядом, которые также имеют гомологичные ионные аминокислоты в LBD рецептора $\alpha 7$ nAChR. Мутации с изменением заряда (переключение кислотного элемента потенциального солевого мостика на основной остаток и его основного партнера на кислотный остаток) были разработаны для нарушения межсубъединичных взаимодействий с немодифицированными субъединицами, но сохранения взаимодействия между субъединицами с мутациями с изменением заряда (фиг. 6А). Химерные субъединицы LGIC, имеющие мутации с изменением заряда, были способны собираться селективно друг с другом без взаимодействия с немодифицированными каналами, например, с эндогенным $\alpha 7$ nAChR. Двойная мутация R27D,E41R в LBD $\alpha 7$ -nAChR обеспечивала функциональные каналы (фиг. 6В). Коэкспрессия данных каналов с изменением заряда с каналами $\alpha 7$ -5HT₃, имеющими немодифицированную последовательность, показала, что субъединицы с изменением заряда не иммунопреципитируют совместно с немодифицированными каналами (фиг. 6С). Сочетание с мутациями, усиливающими потенциальность, и мутациями, блокирующими ацетилхолин, для получения химерного канала $\alpha 7^{R27D,E41R,Q79G,Y115F}$ -GlyR^{A298G} выявило, что некоторые агонисты сохраняют высокую потенциальность для своего сходного агониста (табл. 4, правая колонка).

Данные результаты показывают, что мутации R27D и E41R в LBD $\alpha 7$ nAChR снижают ассоциацию модифицированных субъединиц LGIC с другими модифицированными и/или эндогенными субъединицами LGIC.

Пример 6. Мутации LBD, которые повышают потенциальность лиганда.

Протестированы мутации в Gly¹⁷⁵ и Pro²¹⁶ LBD $\alpha 7$ nAChR в химерных каналах $\alpha 7$ -GlyR. Мутация Gly¹⁷⁵ по Lys ($\alpha 7^{G175K}$ -GlyR) продемонстрировала повышенную потенциальность для ACh (5-кратную) (табл. 5). Для $\alpha 7^{G175K}$ -GlyR было также обнаружено, что потенциальность никотина была увеличена 10-кратно по сравнению с немодифицированным химерным каналом $\alpha 7$ -GlyR (табл. 5). Мутация Pro²¹⁶ по Ile ($\alpha 7^{P216I}$ -GlyR) не изменяла значительно потенциальность ACh (табл. 5). Тем не менее $\alpha 7^{P216I}$ -GlyR показал повышенную >4-кратную потенциальность никотина по сравнению с немодифицированным $\alpha 7$ -GlyR (табл. 5). Данные мутации, вплоть до 30-кратно повышающие потенциальность в $\alpha 7^{G175K}$ -GlyR и $\alpha 7^{P216I}$ -GlyR, также влияли на потенциальность ряда других агонистов $\alpha 7$ -GlyR (табл. 5). Для $\alpha 7^{G175K}$ -GlyR наблюдалось более чем 10-кратное повышение потенциальности, по сравнению с $\alpha 7$ -GlyR, для применяемых в клинической практике препаратов трописетрона, варениклина, цитизина, гранисетрона и эпibatидина. Для $\alpha 7^{P216I}$ -GlyR повышение потенциальности было приблизительно 3-кратным (табл. 5).

Таблица 5

Повышение агонистической потенциальности при помощи мутаций G175K и P216I в химерических каналах $\alpha 7$ GlyR

Соединение	в химерических каналах $\alpha 7$ GlyR														
	$\alpha 7$ GlyR	$\alpha 7$ GlyR G175K	$\alpha 7$ GlyR P216I	$\alpha 7$ GlyR Y115F G175K	$\alpha 7$ GlyR G175K Y210F	$\alpha 7$ GlyR W77F G175K	$\alpha 7$ GlyR Q79G G175K	$\alpha 7$ GlyR W77F Q79G G175K	$\alpha 7$ GlyR W77F Q79G Y115F G175K	$\alpha 7$ GlyR W77F Y210F Y115F G175K	$\alpha 7$ GlyR Q79G G175K Y115F	$\alpha 7$ GlyR Q79G G175K Y115F K322L	$\alpha 7$ GlyR Y115F G175K L141F	$\alpha 7$ GlyR Y115F G175K Q139L G175K	
Ацетилхолин	6,4 (1,2)	1,2 (0,41)	4,0 (0,5)	52 (6,6)	93 (1,3)	6,8 (1,6)	4,5 (1,3)	41 (3,1)	143 (13)	80 (31)	98 (10)	>1000	>200	58	53
Никотин	5,0 (1,8)	0,5 (0,25)	1,4 (0,1)	4,1 (1,4)	6 (0,5)	1,3 (0,4)	1,1 (0,1)	2,6 (0,7)	6,1 (2,0)	4,2	13 (0,2)	>100	14,5	3	5,8
Эпibatидин	0,062 (0,021)	0,005 (0,001)	0,03 (0,01)	0,036 (0,006)	0,65 (0,11)	0,04 (0)	0,037 (0,013)	2,6 (2,3)	0,33	0,38	0,22 (0,015)	>10	0,27	0,144	0,144
Варениклин	0,62 (0,2)	0,056 (0,014)	0,18 (0,06)	5,0 (1,7)	4,3 (0,6)	0,57 (0,18)	0,42 (0,1)	3,3 (1,0)	>10	>9	>10	>30	>30	>8,1	0,96
Цитизин	6,4 (2,0)	0,4 (0,05)	1,9 (0,2)	7,1 (1,2)	>10	1,5 (0,6)	2,5 (1,2)	6,9 (1,2)	4,02	5,1	>10	>30	>30	4,74	3,24
RNU-282987	0,13 (0,038)	0,005 (0,001)	0,04 (0,004)	0,1 (0,01)	0,7 (0,3)	0,67 (0,35)	0,06 (0,05)	0,5 (0,2)	>1	>40	0,08 (0,01)	>1	0,018	0,51	0,05
Трописетрон	0,15 (0,045)	0,011 (0,002)	0,05 (0,003)	0,027 (0,004)	1,1 (0,2)	0,04 (0,01)	0,01 (0,001)	0,024 (0,004)	0,1 (0,04)	>1	0,027 (0,002)	0,717	0,066	0,117	0,105
Нортрописетрон	0,022 (0,007)	0,003 (0,002)	0,006 (0,0004)	0,007 (0,001)	0,28 (0,09)	0,004 (0,001)	0,0008 (0,0001)	0,0026 (0,0004)	0,014	>12	0,012 (0,001)	>0,3	0,069	0,075	0,001
RNA-543613	0,03 (0,01)	0,001 (0,0001)	0,009 (0,001)	0,02 (0,007)	0,26 (0,08)	0,041 (0,016)	0,003 (0,0004)	0,12 (0,04)	>0,3	>3	0,036 (0,006)	>1	0,111	0,057	0,024
Гранисетрон	>100	3,3 (0,1)	6,1 (0,9)	1,6 (0,6)	1,4 (0,1)	0,18 (0,02)	>100	1,6 (0,4)	0,2	0,06 (0,01)	6,8 (1,7)	4,8	>30	0,84	>30
Ивермектин		н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	0,21	н/о	н/о	н/о	н/о

н/о=не определено

Для использования в организмах, которые продуцируют ACh, важно уменьшить потенциальность эндогенного ACh в данных каналах, состоящих из LBD $\alpha 7$ nAChR. Мутация G175K может быть дополни-

тельно объединена с другими мутациями, понижающими чувствительность к ACh, например, Y115F и Y210F. Для $\alpha 7^{Y115F, G175K}$ -GlyR была обнаружена высокая потентность агонистов на основе тропановых или хинуклидиновых структур для трописетрона, гранисетрона, нортрописетрона, PNU-282987 и PNA-543613 и значительно пониженная потентность для варениклина и цитизина (табл. 5). Для $\alpha 7^{G175K, Y210F}$ -GlyR потентность большинства агонистов была значительно снижена, однако наблюдалось повышение потентности для гранисетрона (табл. 5).

Для разработки каналов с пониженной чувствительностью к ACh, но высокой потентностью для других агонистов, $\alpha 7^{G175K}$ -GlyR комбинировали с дополнительными мутациями, которые повышали потентность специфических агонистов. Сочетание с W77F понижало потентность ACh, и $\alpha 7^{W77F, G175K}$ -GlyR демонстрировали повышенную потентность по сравнению с $\alpha 7$ -GlyR для гранисетрона, нортрописетрона и трописетрона, но не для PNU282-987, варениклина, цитизина или PNA-543613 (табл. 5). Сочетание G175K с Q79G снижало потентность ACh, и $\alpha 7^{Q79G, G175K}$ -GlyR демонстрировал повышенную потентность для нортрописетрона, PNA-543613 и трописетрона (табл. 5). Тем не менее данное усиление потентности не наблюдалось для других агонистов, например, PNU282-987 или варениклина. $\alpha 7^{G175K, Q139L}$ -GlyR снижал потентность ACh и повышал потентность для нортрописетрона и трописетрона (табл. 5).

Дальнейшее снижение потентности ACh было достигнуто при сохранении высокой потентности для синтетических агонистов, в том числе основанных на основных структурах тропана и хинуклидина, путем включения мутаций по W77F, Q79G, L141F, Y115F, G175K и Y210F в различных комбинациях. $\alpha 7^{Q79G, Y115F, G175K}$ -GlyR снижали чувствительность к ACh, сохраняя при этом сильные ответы на трописетрон (табл. 5). Данные мутации также повышали чувствительность к другим основным тропановым и хинуклидиновым структурам относительно $\alpha 7^{Y115F, G175K}$ -GlyR, а также относительно $\alpha 7$ -5HT3 (репрезентативный для эндогенной активности $\alpha 7$ nAChR), в частности, хинуклидину тиомочевины 702 и 703, а также сложному эфиру тропана 723, 725, 726, 736, 737, 738 и 745 (табл. 6). $\alpha 7^{Q79G, Y115F, G175K}$ -GlyR также показали высокую чувствительность к ивермектину (табл. 5). $\alpha 7^{W77F, Q79G, G175K}$ -GlyR снижали чувствительность к ACh при сохранении высокоактивных ответов на трописетрон и нортрописетрон (табл. 5). $\alpha 7^{W77F, Q79G, G175K}$ -GlyR также показал повышенную потентность для дополнительных основных тропановых структур, например, соединения 723 и 725, а также применяемых в клинической практике препаратов меквитазина и промазина (табл. 6). $\alpha 7^{W77F, G175K, Y210F}$ -GlyR снижали чувствительность к ACh, но значительно повышали потентность для гранисетрона (табл. 5). $\alpha 7^{L141F, Y115F, G175K}$ -GlyR снижали чувствительность к ACh при сохранении чувствительности к гранисетрону (табл. 5). $\alpha 7^{Q79G, Q139L, G175K}$ -GlyR снижали чувствительность к ACh, но демонстрировали сильные ответы на нортрописетрон (табл. 5).

Таблица 6

Повышение потентности тропана, агонистов хинуклидина, агонистов 9-азабицикло[3.3.1]нонана, агонистов диазабицикло[3.2.2]нонана и промазина при помощи химерных каналов G175K и P216I $\alpha 7$ GlyR. Индол и индазол ароматические заместители (A), присоединены в 3 положении

Класс агониста	X ₁	X ₂	X ₃	Y	C ₁	n ₁	C ₂	n ₂	C ₃	n ₃	C-X конфигурация	R	H	Ароматическое замещение (A)	Соединение	$\alpha 7$ -	$\alpha 7$ -	$\alpha 7$ GlyR	$\alpha 7$ GlyR	$\alpha 7$ GlyR	$\alpha 7$ Gly	$\alpha 7$ GlyR	$\alpha 7$ GlyR
																5HT3	GlyR	G175K	Q79G G175K	Y115F G175K	Q79G Y115F G175K	G175K Y115F R27D E41R	W77F Q79G G175K
Хинуклидин	N	CH ₂	NH	S	0	1	0	0	R	H	R	H	H	3, 5-дихлоранилин	677	10, 6	4, 4	0, 66 (0, 06)	0, 86 (0, 004)	3, 7 (0, 7)	0, 98 (0, 09)	0, 58 (0, 14)	н/о
Хинуклидин	N	CH ₂	NH	S	0	1	0	0	R	H	R	H	H	3, 4-дихлоранилин	682	>100	0, 2	0, 12 (0, 1)	0, 013 (0, 001)	0, 40 (0, 01)	0, 13 (0, 01)	0, 06 (0, 012)	н/о
Хинуклидин	N	CH ₂	NH	S	0	1	0	0	R	H	R	H	H	4-(трифторметокси)анилин	684	>100	1, 6	0, 23 (0, 02)	0, 078 (0, 022)	3, 0 (0, 3)	0, 79 (0, 04)	0, 4 (0, 03)	н/о
Хинуклидин	N	CH ₂	NH	S	0	1	0	0	R	H	R	H	H	4-фторанилин	699	2, 8	3, 6	0, 26 (0, 11)	0, 039 (0, 009)	2, 9	0, 52 (0, 09)	0, 33 (0, 1)	н/о
Хинуклидин	N	CH ₂	NH	S	0	1	0	0	R	H	R	H	H	3-хлоранилин	700	1, 8	1, 9	0, 081 (0, 009)	0, 012 (0, 0002)	1, 5	0, 21 (0, 04)	0, 11 (0, 02)	н/о
Хинуклидин	N	CH ₂	NH	S	0	1	0	0	R	H	R	H	H	3-хлор-2-фторанилин	701	>100	н/о	0, 47 (0, 17)	0, 086 (0, 014)	5, 46	1, 0 (0, 2)	0, 58 (0, 03)	н/о
Хинуклидин	N	CH ₂	NH	S	0	1	0	0	R	H	R	H	H	3-хлор-4-фторанилин	702	>100	0, 9	0, 12 (0, 004)	0, 018 (0, 003)	1, 6	0, 17 (0, 03)	0, 12 (0, 02)	н/о
Хинуклидин	N	CH ₂	NH	S	0	1	0	0	R	H	R	H	H	5-хлор-2-фторанилин	703	>100	н/о	0, 52 (0, 08)	0, 03 (0, 01)	12, 7	1, 2 (0, 06)	1, 1 (0, 5)	н/о

Хинуклидин	N	CH ₂	NH	S	0	1	0	R	H	3-хлор-4-метиланилин	704	0,7	н/о	0,062 (0,008)	0,018 (0,002)	0,76 (0,01)	0,24 (0,02)	0,18 (0,06)	н/о
Хинуклидин	N	CH ₂	NH	S	0	1	0	R	H	5-хлор-2-метиланилин	705	>100	н/о	9,6	0,67 (0,14)	>10	4,8 (1,4)	4,5 (2,7)	н/о
Хинуклидин	N	CH ₂	NH	S	0	1	0	S	H	4-(трифторметокси)анилин	713	>100	н/о	2,1 (0,2)	0,54 (0,06)	>10	23,9	>10	н/о
Тропан	C	NMe	NH	S	1	0	0	Эндо	H	1-метил-1Н-индол	622	>100	н/о	0,87	1,3 (0,2)	2,5 (0,4)	0,93 (0,02)	1,0 (0,2)	1,7
Тропан	C	NMe	O	O	1	0	0	Эндо	H	4-метокси-1Н-индол	721	0,5	н/о	0,027 (0)	0,015 (0,003)	0,080 (0,002)	0,020 (0,001)	0,016 (0,001)	0,04
Тропан	C	NMe	O	O	1	0	0	Эндо	H	6-метокси-1Н-индол	722	0,5	н/о	0,02 (0,001)	0,015 (0)	0,052 (0,008)	0,028 (0,008)	0,016 (0,001)	0,03
Тропан	C	NMe	O	O	1	0	0	Эндо	H	7-метокси-1Н-индол	723	12,8	4	0,31 (0,02)	0,02 (0)	0,71 (0,46)	0,07 (0,01)	0,024 (0,003)	0,02
Тропан	C	NMe	O	O	1	0	0	Эндо	H	4-метил-1Н-индол	724	1,2	н/о	0,036 (0,003)	0,012 (0,002)	0,091 (0,013)	0,02 (0,006)	0,012 (0,002)	0,06
Тропан	C	NMe	O	O	1	0	0	Эндо	H	7-метил-1Н-индол	725	12,2	8,1		0,022 (0,02)	0,069 (0,33)	0,042 (0,005)	0,022 (0,0001)	0,024
Тропан	C	NMe	O	O	1	0	0	Эндо	H	4-хлор-1Н-индол	726	4,2	н/о	0,58 (0,24)	0,016 (0,001)	0,51 (0,37)	0,044 (0,006)	0,018 (0)	0,03
Тропан	C	NMe	O	O	1	0	0	Эндо	H	5-метокси-1Н-индол	736	0,83	н/о	0,2 (0,01)	0,044 (0,002)	0,57 (0,21)	0,078 (0,018)	0,078 (0,024)	0,06
Тропан	C	NMe	O	O	1	0	0	Эндо	H	5-хлор-1Н-индол	737	1	0,9	0,082 (0,004)	0,013 (0,001)	0,16 (0,03)	0,033 (0,004)	0,016 (0,001)	0,101
Тропан	C	NMe	O	O	1	0	0	Эндо	H	6-хлор-1Н-индол	738	0,4	н/о	0,015 (0)	0,016 (0,002)	0,04 (0,014)	0,025 (0,002)	0,012 (0,001)	0,033
Тропан	C	NMe	O	O	1	0	0	Эндо	H	1Н-индазол	745	1,2	1,3	0,069 (0,002)	0,026 (0,03)	0,26 (0,03)	0,089 (0,024)	0,043 (0,014)	0,05
9-азабицикло[3.3.1]нонан	CH	NMe	NH	O	1	0	1	Эндо	H	1Н-индол	749	6,6	н/о	н/о	н/о	н/о	1,3	н/о	1,9
9-азабицикло[3.3.1]нонан	CH	NMe	NH	O	1	0	1	Эндо	H	1Н-индазол	751	1,8	3,4	н/о	н/о	н/о	3,2	н/о	0,7
9-азабицикло[3.3.1]нонан	CH	NMe	NH	O	1	0	1	Эндо	H	7-метокси-1Н-индазол	760	>100	9,8	н/о	н/о	н/о	3	н/о	1,3
9-азабицикло[3.3.1]нонан	CH	NH	O	O	1	0	1	Эндо	H	1Н-индол	763	1,9	0,17	н/о	н/о	н/о	0,3	н/о	0,2
1,4-диазабицикло[3.2.2]нонан								F	добенсо[b, d]тиофен-5,5-диоксид	773	0,135	0,001	н/о	н/о	0,0003	0,00042	н/о	0,0014	
1,4-диазабицикло[3.2.2]нонан								NO ₂	добенсо[b, d]тиофен-5,5-диоксид	774	0,03	0,006	н/о	н/о	0,00078	0,03	н/о	0,03	
Хинуклидин	N	CH ₂	CH ₂		0	1	0	R	H	10Н-фенотиазин	Меквитазин	>30	н/о	н/о	н/о	н/о	>10	н/о	0,15
N, N-диметилпропиламин										10Н-фенотиазин	Промазин	>100	н/о	н/о	н/о	н/о	>100	н/о	1,6

н/о=не определено; величина, стоящая в круглых скобках: РЭМ

$\alpha 7^{G175K}$ -GlyR и $\alpha 7^{P2161}$ -GlyR вместе с мутациями Q79G, Y115F и G175K были также совместимы с неассоциационными мутациями R27D, E41R, а также с мутацией IPD GlyR A298G, которые дополнительно повысили лигандную потентность для гранисетрона, эпibatидина, варениклина, цитизина, PNU-282987, трописетрона, нортрописетрона и PNA-543613 (табл. 7). Сочетание с неассоциированными мутациями с образованием $\alpha 7^{R27D, E41R, Q79G, Y115F, G175K}$ дополнительно улучшило потентность для 702, 723, 725 и 726, с низкой чувствительностью к ACh (табл. 6).

Таблица 7

Повышение агонистической потентности при помощи мутаций G175K и A298G в химерных каналах $\alpha 7$ GlyR, а также W298A в каналах $\alpha 7$ GABA (также именуемых как GABA_{A-p})

Соединение	$\alpha 7$ GlyR Q79G W77F A298G	$\alpha 7$ GlyR Q79G G175K A298G	$\alpha 7$ GlyR Q79G A298G G175K Y115F	$\alpha 7$ GlyR Q79G A298G P216I	$\alpha 7$ GlyR Q79G A298G Y115F K395 K396A	$\alpha 7$ GABA _c Q79G L141F W298A	$\alpha 7$ GlyR Q79G G175K Y115F R27D, E41R	$\alpha 7$ GlyR R27D E41R Q79G Y115F
Ацетилхолин	45	0,66	31	5	90	52	52 (7,7)	>500
Никотин	3,8	0,11	3,3	1,6	16,5	16,2	4,8 (0,4)	>39,8
Эпibatидин	0,37	0,0023	0,011	0,05	0,15	0,42	0,059 (0,03)	0,267
Варениклин	3,66	0,022	2,37	0,18	>30	6,27	4,9 (0,3)	>30
Цитизин	14,1	0,134	4,6	5,5	>30	13,3	4,8 (0,4)	>30
PNU-282987	1,63	0,00036	0,009	0,25	0,11	0,12	0,05 (0,03)	0,34
Трописетрон	0,018	0,0006	0,0028	0,009	0,021	0,111	0,013 (0,005)	>0,096
Нортрописетрон	0,0024	0,00013	0,0084	0,0012	0,0063	0,009	0,003 (0,001)	0,102
PNA-543613	0,0066	0,00018	0,0039	0,003	0,0408	0,039	0,0054	0,156
Гранисетрон	1,2	н/о	н/о	н/о	>30	>100	2,4 (0,3)	>30

н/о=не определено; величина, стоящая в круглых скобках: РЭМ

Дополнительные аминокислотные замены по Gly^{Y115F} LBD $\alpha 7$ nAChR в химерных каналах $\alpha 7$ ^{Y115F}-GlyR также усиливают агонистическую потентность. Потентность для трописетрона в отношении химерных каналов $\alpha 7$ ^{Y115F}-GlyR была усилена дополнительными мутациями, которые включают G175A (7,1-кратно), G175F (2-кратно), G175H (2,3-кратно), G175K (5,6-кратно), G175M (2,6-кратно), G175R (5,8-кратно), G175S (9,3-кратно), G175V (16,7-кратно).

Таблица 8

Повышение потентности агониста при помощи мутаций G175 в химерных каналах $\alpha 7$ GlyR Y115F

Соединение	$\alpha 7$ GlyR	$\alpha 7$ GlyR Y115F G175K	$\alpha 7$ GlyR Y115F G175A	$\alpha 7$ GlyR Y115F G175F	$\alpha 7$ GlyR Y115F G175H	$\alpha 7$ GlyR Y115F G175M	$\alpha 7$ GlyR Y115F G175R	$\alpha 7$ GlyR Y115F G175S	$\alpha 7$ GlyR Y115F G175V
Ацетилхолин	6,4 (1,2)	52 (6,6)	24	67	79	71	29,5	31,5	15
Варениклин	0,62 (0,2)	5,0 (1,7)	5,9	13,6	12,7	14,1	7,6	9,7	4,6
Трописетрон	0,15 (0,045)	0,027 (0,004)	0,021	0,074	0,064	0,057	0,024	0,016	0,009
PNA-543613	0,03 (0,01)	0,02 (0,007)	0,027	0,173	0,12	0,25	0,11	0,12	0,037

н/о=не определено; величина, стоящая в круглых скобках: РЭМ

Обнаружено, что мутации для Leu¹³¹ на меньшие аминокислоты снижают потентность канонических агонистов ACh и никотина, одновременно заметно повышая потентность варениклина, трописетрона и ряда других агонистов. $\alpha 7$ ^{L131A}-GlyR и $\alpha 7$ ^{L131G}-GlyR обладали пониженной чувствительностью к ACh (6-кратной) и повышенной потентностью в отношении варениклина (8-кратной и 17-кратной соответственно) и трописетрона (2,5-кратной и 3,6-кратной соответственно) (табл. 9). $\alpha 7$ ^{L131G}-5HT₃ HC обладали пониженной чувствительностью к ACh (5-кратной) и повышенной потентностью в отношении варениклина (16-кратной) и трописетрона (2,3-кратной) (фиг. 9А и табл. 9). $\alpha 7$ ^{L131G,Q139L}-GlyR и $\alpha 7$ ^{L131G,Y217F}-GlyR демонстрировали аналогичное повышение потентности по сравнению с $\alpha 7$ -GlyR в отношении для варениклина (21-кратное), но также и пониженную чувствительность к ACh (-11-кратную и -13-кратную, соответственно). $\alpha 7$ ^{Q79S,L131G}-GlyR дополнительно улучшали потентность по сравнению с $\alpha 7$ -GlyR в отношении варениклина (89-кратно) и трописетрона (15-кратно). $\alpha 7$ ^{L131G,Q139L,Y217F}-GlyR демонстрировали наибольшее улучшение потентности по сравнению с $\alpha 7$ -GlyR в отношении варениклина (387-кратное), и также демонстрировали пониженную потентность ACh (13-кратную) (фиг. 9В и табл. 9). $\alpha 7$ ^{L131G,I39L,Y217F}-GlyR также показали чрезвычайно высокую потентность для соединения 770 (0,001

мкМ), соединения 773 (0,00034 мкМ) и соединения 774 (0,00013 мкМ) (фиг. 10).

$\alpha 7^{Q79S,L131G,Q139L}$ -GlyR также улучшали потентность по сравнению с $\alpha 7$ -GlyR в отношении варениклина (31-кратно) и трописетрона (3-кратно), но снижали потентность ACh (9-кратно) (фиг. 9B и табл. 9). $\alpha 7^{L131M}$ -GlyR, $\alpha 7^{L131Q}$ -GlyR и α^{L131V} -GlyR снижали потентность ACh, но повышали потентность в отношении трописетрона, нортрописетрона, РНА-543613 и гранисетрона (табл. 9). Было обнаружено, что $\alpha 7^{L131F}$ -GlyR значительно снижает потентность ACh, но не улучшает потентность других агонистов (табл. 8). $\alpha 7^{L131G}$ -GABA_C значительно снижала потентность ACh, но не улучшала потентность для других агонистов (табл. 9). $\alpha 7^{L131G,Q139L,Y217F}$ -5HT₃ HC (табл. 9) улучшали потентность варениклина 131-кратно по сравнению с 7-5HT₃ (табл. 1). $\alpha 7^{L131G,Q139L,Y217F}$ -5HT₃ HC также демонстрировали высокую потентность для соединения 770 (0,007 мкМ), соединения 773 (0,002 мкМ) и соединения 774 (0,004 мкМ) (табл. 8).

Таблица 9

Повышение потентности агониста при помощи химерных каналов с мутациями L131																				
Соединение	$\alpha 7^{GlyR}$																			
	R	L131A	L131G	L131G	L131G	L131G	Q79G	Q79S	Q79S	L131G	L131F	Q79S	L131M	Y115F	L131N	L131Q	L131V	HC	HC	G
Ацетилхолин	6,4 (1,2)	42 (21)	41 (11)	68	85 (20)	>500	21 (3,5)	58	210	92 (32)	67 (3)	29	>500	5 (0,5)	58	16 (5)	35	39	>500	
Никотин	5,0 (1,8)	8,0 (3,2)	15 (3,5)	26	28	55 (18)	>100	8,2 (0,8)	25	36	20 (6,3)	41 (8)	15	н/о	н/о	13	3,9 (0,7)	15	20	>500
Эпибафин	0,062 (0,021)	0,027 (0,004)	0,009 (0,004)	0,012	0,015	0,021 (0,002)	н/о	0,007 (0,001)	0,012	0,16	0,24 (0,054)	0,022 (0,004)	0,042	н/о	н/о	0,027 (0,004)	0,21 (0,04)	0,009	н/о	
Варениклин	0,62 (0,2)	0,082 (0,068)	0,037 (0,026)	0,03	0,03	0,001 (0,001)	>10	0,007 (0,001)	0,02	0,78	2,6 (1,1)	0,003 (0,001)	0,53	>100	0,069 (0,027)	0,72	0,33 (0,21)	0,04	0,007	0,3
Цитизин	6,4 (2,0)	20,6 (9,4)	13,1 (0,66)	12	30	н/о	>30	8,1 (0,3)	10	>30	10,5 (1,8)	н/о	7	н/о	н/о	>30	4,3 (0,7)	11	н/о	>500
PNV-282987	0,13 (0,038)	0,055 (0,025)	0,034 (0,008)	0,063	0,054	0,16 (0,03)	0,096	0,006 (0,002)	0,018	0,41	0,20 (0,04)	0,05 (0,01)	0,021	н/о	н/о	0,048	0,064 (0,018)	0,033	0,015	0,12
Трописетрон	0,15 (0,045)	0,06 (0,02)	0,042 (0,01)	0,13	0,087	0,31 (0,05)	0,09	0,01 (0,003)	0,045	0,36	0,39 (0,2)	0,084 (0,009)	0,024	0,035	0,025 (0,005)	0,048	0,062 (0,013)	0,066	0,04	0,18
Нортрописетрон	0,022 (0,007)	0,006 (0,003)	0,004 (0,001)	0,024	0,018	0,047 (0,006)	0,012	0,004 (0,002)	0,006	0,07	0,027 (0,008)	0,014 (0,002)	0,006	н/о	н/о	0,009	0,003 (0,001)	0,009	н/о	0,021
РНА-543613	0,03 (0,01)	0,012 (0,006)	0,008 (0,002)	0,021	0,016	0,045 (0,008)	0,066	0,002 (0,005)	0,009	0,038	0,04 (0,007)	0,015 (0,001)	0,009	0,028	0,02	0,015	0,011 (0,002)	0,012	0,009	0,027
Гранисетрон	>100	17,2 (12,8)	6,7 (1,6)	4	4	н/о	н/о	4,2 (0,8)	н/о	>30	>100	н/о	4	н/о	н/о	4	5,4 (1,3)	4	н/о	>500
765	>100	н/о	н/о	н/о	н/о	0,031 (0,02)	0,027	0,024	н/о	н/о	н/о	0,034 (0,013)	н/о	н/о	>10	н/о	н/о	н/о	0,11	н/о
770	н/о	н/о	н/о	н/о	н/о	0,001 (0,0003)	н/о	н/о	н/о	н/о	0,034	0,001 (0,0001)	0,03	н/о	>10	>0,3	н/о	н/о	0,007	н/о
773	0,001	н/о	0,000 13	0,000 04	н/о	0,000 34	0,000 04	н/о	н/о	н/о	0,000 5	н/о	0,000 05	н/о	0,000 4	0,006	н/о	н/о	0,002	н/о
774	0,006	н/о	0,000 04	0,000 04	н/о	0,000 18	0,000 04	н/о	н/о	н/о	0,001 3	н/о	0,001	н/о	0,000 6	0,002	н/о	н/о	0,004	н/о

н/о=не определено; величина, стоящая в круглых скобках: РЭМ

Пример 7. Химерные LGIC в нейронах.

AAV или ДНК плазмидами, содержащими нуклеиновые кислоты, кодирующие химерные LGIC $\alpha 7^{Q79G}$ -GlyR^{A298G} или $\alpha 7^{Q79G,Y115F,G175K}$ -GlyR трансдуцировали кортикальные нейроны мышцы. Низкую концентрацию трописетрона (30 нМ или 100 нМ) вводили в кортикальные нейроны мышцы. Активность нейронов была подавлена путем применения низкой концентрации агониста (фиг. 7 и фиг. 8С).

Плазмидами ДНК, содержащими нуклеиновые кислоты, кодирующие химерные LGIC $\alpha 7^{L131G,Q139L,Y217F}$ -GlyR, трансфицировали кортикальные нейроны мышцы. В кортикальные нейроны мышцы вводили низкую концентрацию варениклина (10 нМ). Активность нейронов была подавлена путем применения низкой концентрации агониста (фиг. 9С).

Данные результаты показывают, что активность модифицированного LGIC в нейронах можно контролировать, используя низкие концентрации лигандов LGIC - трописетрона и варениклина.

Пример 8. Химерные LGIC в терапии.

Хомогенетические методы предлагают эффективную стратегию для комбинированной лекарственной и генной терапии. Это связано с тем, что клеточную функцию можно модулировать последовательно для разных типов клеток по различным признакам, используя одни и те же ионные каналы и лиганды путем использования экзогенного доставленного ионного канала, который селективно задействуется при

введении препарата. Идентификация ионных каналов, которые контролируются хорошо переносимыми, применяемыми в клинической практике препаратами, особенно эффективна для возможного распространения хемогенетики в терапевтическом применении для человека.

Для препарата тропisetрон мы обнаружили, что он активирует $\alpha 7^{Q79G}$ -GlyR^{A298G} со значением EC₅₀ 11 нМ, что аналогично описанному значению IC₅₀ 10 нМ тропisetрона для его терапевтической мишени, рецептора 5HT₃ (Combrink et al., 2009 Pharmacological reports: PR 61: 785-97).

Другие варианты осуществления изобретения

Следует понимать, что, хотя раскрытие информации было описано в сочетании с ее подробным описанием, приведенное выше описание призвано проиллюстрировать, а не ограничивать сферу раскрытия информации, которая определяется сферой охвата прилагаемых претензий. Другие аспекты, преимущества и модификации находятся в пределах объема следующей формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированный лиганд-управляемый ионный канал (LGIC), включающий по меньшей мере одну модифицированную субъединицу LGIC, где указанная модифицированная субъединица LGIC включает

модифицированный лиганд-связывающий домен (LBD) альфа7 никотинового ацетилхолинового рецептора ($\alpha 7$ -nAChR), (1) имеющий по меньшей мере 93% идентичность последовательности, представленной остатками 23-224 последовательности SEQ ID NO: 1, остатками 23-229 последовательности SEQ ID NO: 2 или остатками 23-233 последовательности SEQ ID NO: 11; и включающий (2) по меньшей мере две аминокислотные замены по аминокислотным остаткам, выбранным из группы, состоящей из остатков 131, 139, 175, 210, 216, 217 и 219, где аминокислотная замена в остатке 131 представляет собой L131G, L131A, L131M или L131N, где аминокислотная замена в остатке 139 представляет собой Q139L или Q139G, где аминокислотная замена в остатке 175 представляет собой G175A, G175F, G175H, G175K, G175M, G175R, G175S или G175V, где аминокислотная замена в остатке 210 представляет собой Y210F, где аминокислотная замена в остатке 216 представляет собой P216I, где аминокислотная замена в остатке 217 представляет собой Y217F и где аминокислотная замена в остатке 219 представляет собой D219A; и

домен ионных пор (IPD), выбранный из группы, состоящей из IPD глицинового рецептора (GlyR), IPD серотонинового рецептора 3 типа (5HT₃), IPD рецептора гамма-аминомасляной кислоты (GABA) и IPD альфа7 никотинового ацетилхолинового рецептора $\alpha 7$ -nAChR.

2. Нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированную субъединицу лиганд-управляемого ионного канала (LGIC), где указанная модифицированная субъединица LGIC включает

модифицированный лиганд-связывающий домен (LBD) альфа7 никотинового ацетилхолинового рецептора ($\alpha 7$ -nAChR), (1) имеющий по меньшей мере 93% идентичность последовательности, представленной остатками 23-224 последовательности SEQ ID NO: 1, остатками 23-229 последовательности SEQ ID NO: 2 или остатками 23-233 последовательности SEQ ID NO: 11; и включающий (2) по меньшей мере две аминокислотные замены по аминокислотным остаткам, выбранным из группы, состоящей из остатков 131, 139, 175, 210, 216, 217 и 219, где аминокислотная замена в остатке 131 представляет собой L131G, L131A, L131M или L131N, где аминокислотная замена в остатке 139 представляет собой Q139L или Q139G, где аминокислотная замена в остатке 175 представляет собой G175A, G175F, G175H, G175K, G175M, G175R, G175S или G175V, где аминокислотная замена в остатке 210 представляет собой Y210F, где аминокислотная замена в остатке 216 представляет собой P216I, где аминокислотная замена в остатке 217 представляет собой Y217F и где аминокислотная замена в остатке 219 представляет собой D219A; и

домен ионных пор (IPD), выбранный из группы, состоящей из IPD глицинового рецептора (GlyR), IPD серотонинового рецептора 3 типа (5HT₃), IPD глицинового рецептора (GlyR), IPD рецептора гамма-аминомасляной кислоты (GABA) и IPD альфа7 никотинового ацетилхолинового рецептора $\alpha 7$ -nAChR.

3. Нуклеиновая кислота по п.1 или 2, где модифицированный LBD $\alpha 7$ -nAChR содержит аминокислотную замену в аминокислотном остатке 139 и аминокислотную замену в аминокислотном остатке 217, где аминокислотная замена в остатке 139 представляет собой Q139L или Q139G и аминокислотная замена в остатке 217 представляет собой Y217F.

4. Нуклеиновая кислота по п.1 или п.2, где модифицированный LBD $\alpha 7$ -nAChR содержит аминокислотную замену в аминокислотном остатке 131 и аминокислотную замену в аминокислотном остатке 139, где аминокислотная замена в остатке 131 представляет собой L131G, L131A, L131M или L131N и где аминокислотная замена в остатке 139 представляет собой Q139L или Q139G.

5. Нуклеиновая кислота по п.1 или 2, где модифицированный LBD $\alpha 7$ -nAChR содержит аминокислотную замену в аминокислотном остатке 131 и аминокислотную замену в аминокислотном остатке 217, где аминокислотная замена в остатке 131 представляет собой L131G, L131A, L131M или L131N и где аминокислотная замена в остатке 217 представляет собой Y217F.

6. Нуклеиновая кислота по любому из пп.1-5, где модифицированный LBD $\alpha 7$ -nAChR содержит аминокислотную замену L131G, аминокислотную замену Q139L и аминокислотную замену Y217F.

7. Нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированную субъединицу лиганд-управляемого ион-

ного канала (LGIC), где указанная модифицированная субъединица LGIC включает

модифицированный лиганд-связывающий домен (LBD) альфа7 никотинового ацетилхолинового рецептора ($\alpha 7$ -nAChR), который содержит аминокислотную замену L131G, аминокислотную замену Q139L и аминокислотную замену Y217F согласно нумерации последовательностей SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 11, и

домен ионных пор глицинового рецептора.

8. Нуклеиновая кислота, кодирующая гомомерный химерный лиганд-управляемый ионный канал (LGIC), содержащий химерные субъединицы LGIC, где каждая химерная субъединица LGIC содержит модифицированный лиганд-связывающий домен (LBD) альфа7 никотинового ацетилхолинового рецептора ($\alpha 7$ -nAChR), содержащий аминокислотную замену L131G, аминокислотную замену Q139L и аминокислотную замену Y217F согласно нумерации последовательностей SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 11, и

домен ионных пор глицинового рецептора, где лиганд, выбранный из группы, состоящей из варениклина и трописетрона, селективно связывает химерный LGIC и где химерный LGIC минимально связывает ацетилхолин (ACh).

9. Нуклеиновая кислота по любому из пп.1-8, где IPD представляет собой IPD GlyR или модифицированный IPD GlyR, где модифицированный IPD GlyR содержит аминокислотную замену A298G согласно нумерации последовательности SEQ ID NO: 7.

10. Нуклеиновая кислота по любому из пп.1-6, где, когда IPD представляет собой модифицированный IPD GABA и где модифицированный IPD GABA содержит аминокислотную замену W298A согласно нумерации последовательности SEQ ID NO: 10.

11. Нуклеиновая кислота по любому из пп.1-6, где IPD представляет собой модифицированный IPD 5HT3 человека и где модифицированный IPD 5HT3 человека содержит аминокислотную замену R420Q, аминокислотную замену R424D и/или аминокислотную замену R428A согласно нумерации последовательности SEQ ID NO: 8, или модифицированный IPD 5HT3 мыши, где модифицированный IPD 5HT3 мыши содержит аминокислотную замену R425Q, аминокислотную замену R429D и/или R433A согласно нумерации последовательности SEQ ID NO: 6.

12. Нуклеиновая кислота по любому из пп.1-11, где модифицированный LBD $\alpha 7$ -nAChR дополнительно содержит замену R27D и/или замену E41R.

13. Нуклеиновая кислота по любому из пп.1-12, где LBD имеет сниженное связывание с эндогенным лигандом LGIC.

14. Нуклеиновая кислота по п.13, где эндогенный лиганд LGIC представляет собой ацетилхолин (ACh).

15. Нуклеиновая кислота по п.14, где модифицированный LGIC имеет EC50 более 20 мкМ для ACh.

16. Нуклеиновая кислота, кодирующая модифицированную субъединицу лиганд-управляемого ионного канала (LGIC), где указанная модифицированная субъединица LGIC включает модифицированный лиганд-связывающий домен (LBD) альфа7 никотинового ацетилхолинового рецептора ($\alpha 7$ -nAChR) и домен ионных пор глицинового рецептора (GlyR) (субъединица LGIC $\alpha 7$ -GlyR), где указанная субъединица LGIC $\alpha 7$ -GlyR содержит последовательность, представленную SEQ ID NO: 7, которая содержит аминокислотную замену L131G, аминокислотную замену Q139L и аминокислотную замену Y217F.

17. Клетка млекопитающего, содержащая нуклеиновую кислоту по любому из пп.1-16.

18. Способ лечения каналопатии у млекопитающего, где способ включает:

введение в клетку млекопитающего нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-16; и

введение экзогенного лиганда LGIC млекопитающему.

19. Способ по п.18, где каналопатия выбрана из группы, состоящей из синдрома Бартера, синдрома Бругада, катехоламинергической полиморфной желудочковой тахикардии (CPVT), врожденного гиперинсулинизма, муковисцидоза, синдрома Драве, эпизодической атаксии, эритромелалгии, генерализованной эпилепсии (например, с фебрильными судорогами), наследственную гемиплегическую мигрень, фибромиалгию, гиперкалиемический периодический паралич, гипокалиемический периодический паралич, миастенический синдром Ламберта-Итона, синдром удлинения интервала QT (например, синдром Романо-Уорда), синдром укороченного QT, злокачественную гипертермию, муколипидоз IV типа, миастению гравис, врожденную миотонию, нейромиелит зрительного нерва, нейромиотонию, внесиндромную глухоту, врожденную парамиотонию, пигментный ретинит, синдром тимоти, шум в ушах, эпилептический припадок, невралгию тройничного нерва и рассеянный склероз.

20. Способ модулирования переноса ионов через клеточную мембрану млекопитающего, где указанный способ включает:

введение в клетку нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-16; и

введение экзогенного лиганда LGIC.

21. Способ по п.20, где модулирование включает активацию переноса ионов или ингибирование переноса ионов.

22. Способ по п.20, где клетка выбрана из группы, состоящей из нейрона, глиальной клетки, миоци-

та, стволовой клетки, эндокринной клетки и иммунной клетки.

23. Способ по п.20, где введение нуклеиновой кислоты в клетку включает *in vivo* введение или *ex vivo* введение.

24. Способ модулирования возбудимости клетки у млекопитающего, где указанный метод включает введение в клетку нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-16; введение экзогенного лиганда LGIC.

25. Способ по п.24, где модулирование включает повышение возбудимости клетки или снижение возбудимости клетки.

26. Способ по п.24, где клетка является возбудимой клеткой и выбрана из группы, состоящей из нейрона, глиальной клетки, миоцита, стволовой клетки, эндокринной клетки и иммунной клетки.

27. Способ по п.24, где введение нуклеиновой кислоты в клетку включает *in vivo* введение или *ex vivo* введение.

28. Способ модулирования активности клетки у млекопитающего, где указанный способ включает введение в клетку нуклеиновой кислоты по любому из пп.1-16; и

введение экзогенного лиганда млекопитающему, где экзогенный лиганд может модулировать модифицированный LGIC.

29. Способ по п.28, где модулирование включает повышение активности клетки или снижение активности клетки.

30. Способ по п.28, где активность выбрана из группы, состоящей из переноса ионов, пассивного переноса, возбуждения, ингибирования и экзоцитоза.

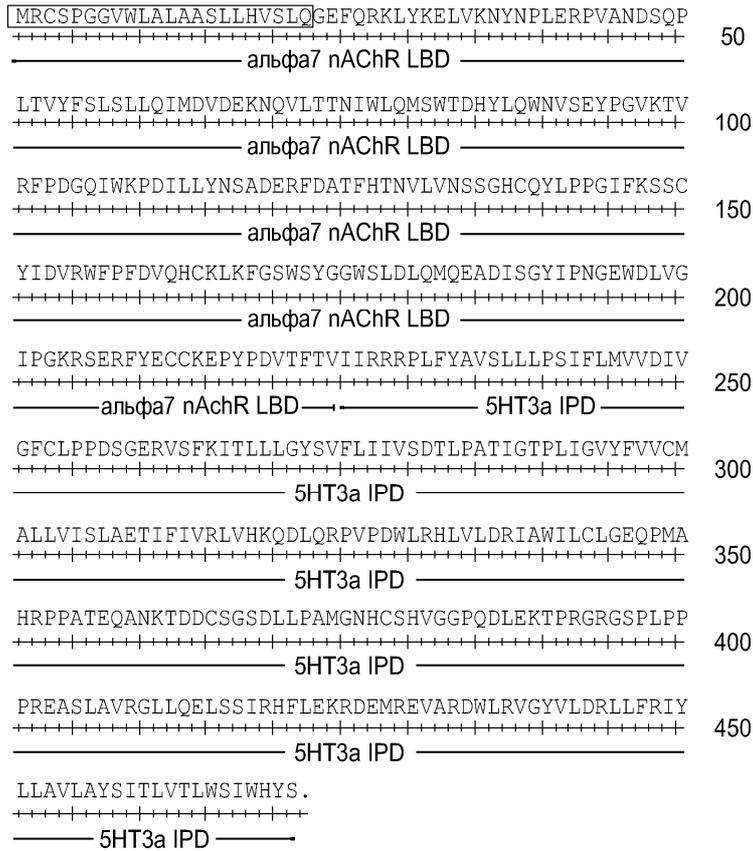
31. Способ по п.28, где клетка выбрана из группы, состоящей из нейрона, глиальной клетки, миоцита, стволовой клетки, эндокринной клетки и иммунной клетки.

32. Способ по п.28, где введение нуклеиновой кислоты в клетку млекопитающего включает *in vivo* введение или *ex vivo* введение.

33. Способ по любому из пп.18-32, где экзогенный лиганд LGIC представляет собой искусственный экзогенный лиганд LGIC, выбранный из группы, состоящей из трописетрона, псевдо-трописетрона, нор-трописетрона, соединения 723, соединения 725, соединения 737 и соединения 745, PNU-282987, PNA-543613, соединения 0456, соединения 0434, соединения 0436, соединения 0354, соединения 0353, соединения 0295, соединения 0296, соединения 0536, соединения 0676 и соединения 702, соединения 536, ваниклина, соединения 765, соединения 770, соединения 773 и соединения 774.

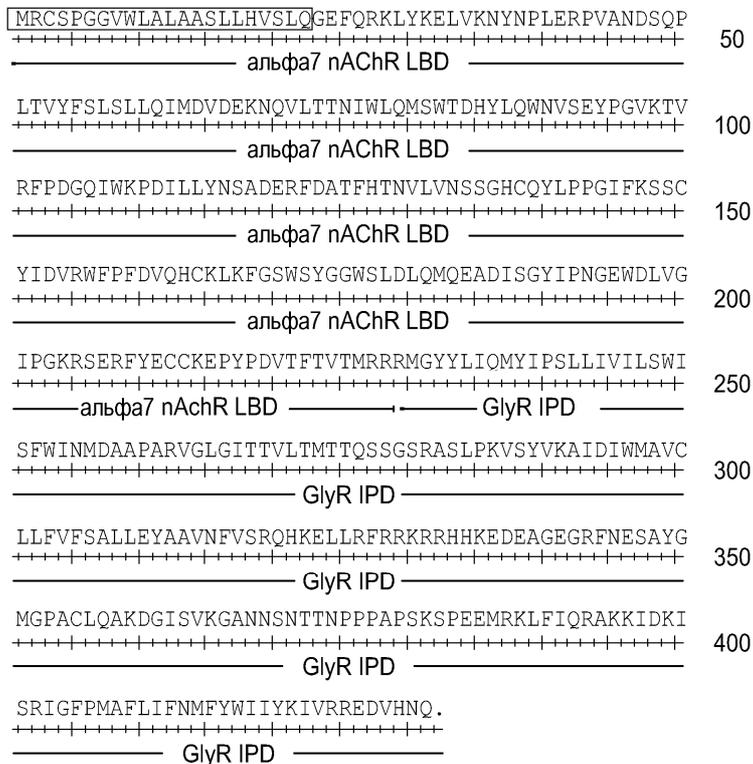
34. Способ по любому из пп.18-33, где модифицированный LBD $\alpha 7$ -nAChR содержит последовательность, имеющую по меньшей мере 93% идентичность, по меньшей мере 95% идентичность, по меньшей мере 97% идентичность или по меньшей мере 99% идентичность с SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 11.

Сигнальный пептид 1-22

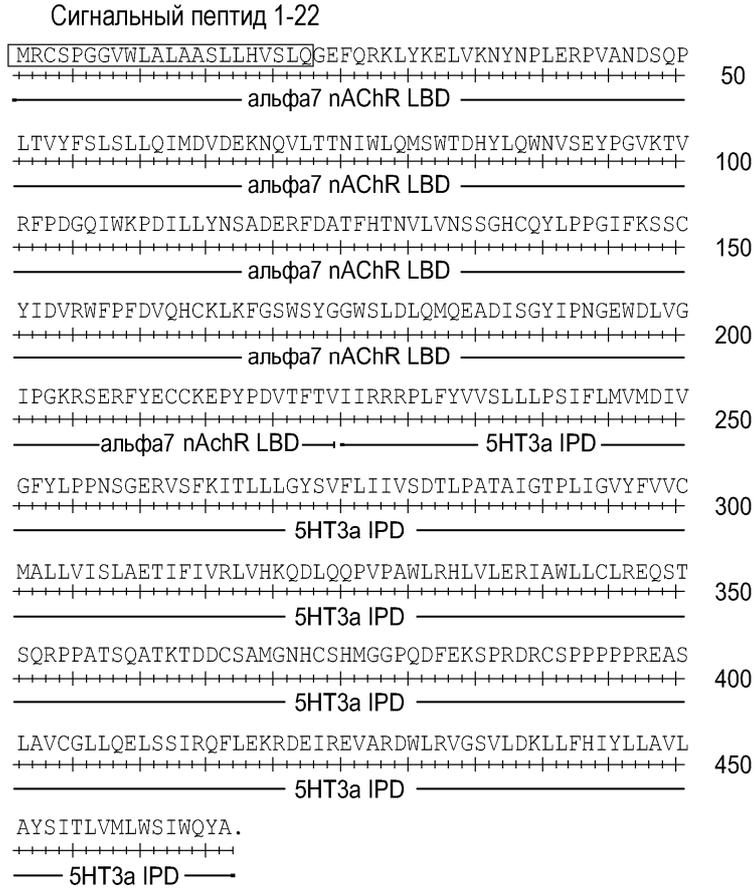


Фиг. 1A

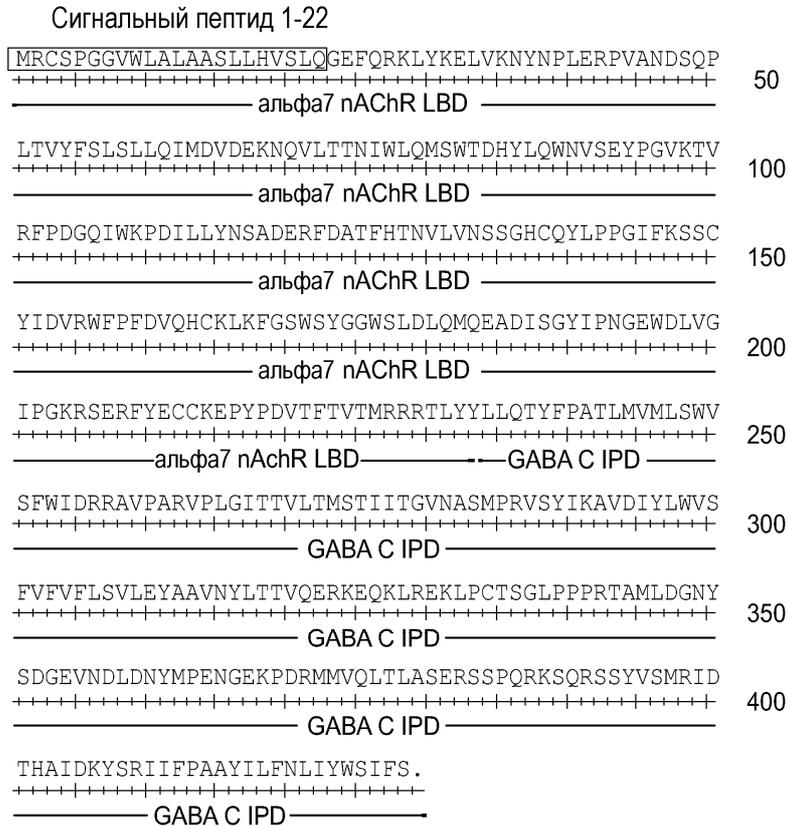
Сигнальный пептид 1-22



Фиг. 1B



Фиг. 1С

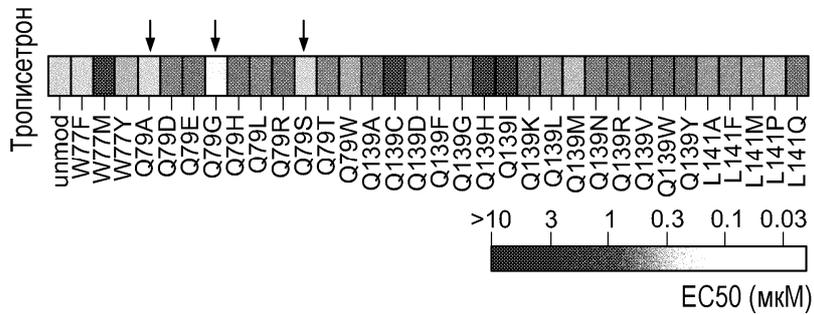


Фиг. 1D

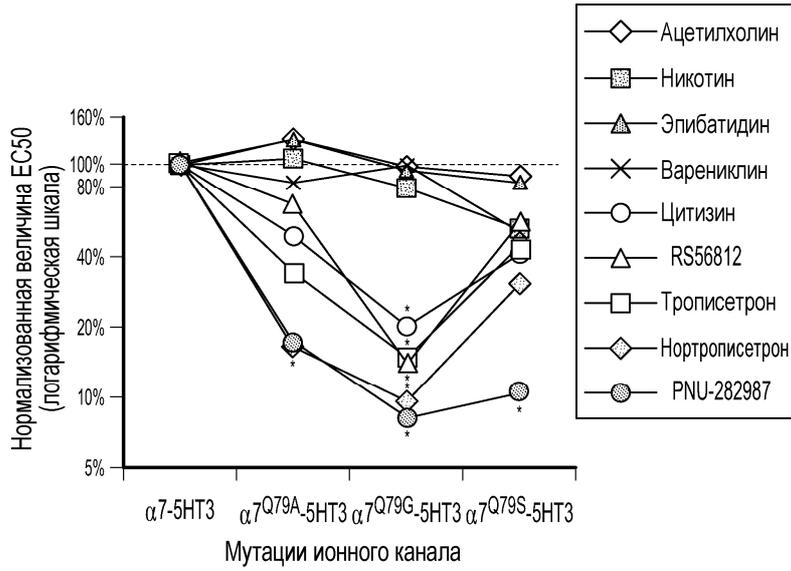
Сигнальный пептид 1-22



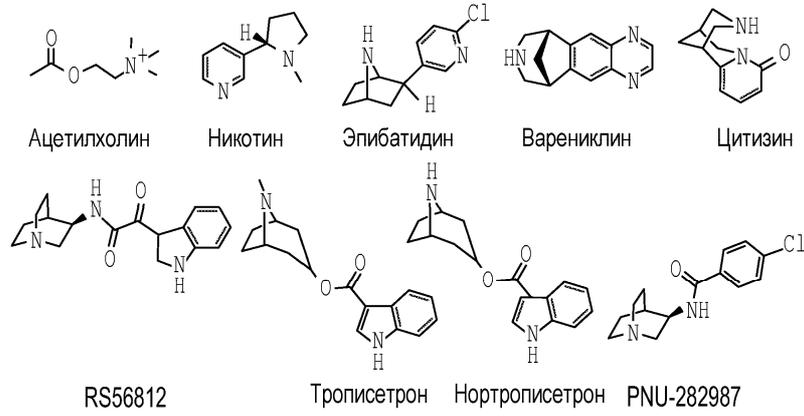
Фиг. 1Е



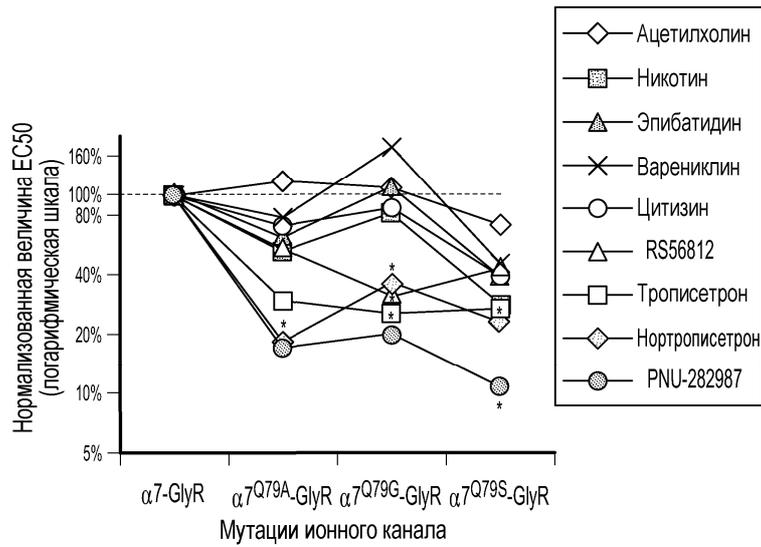
Фиг. 2



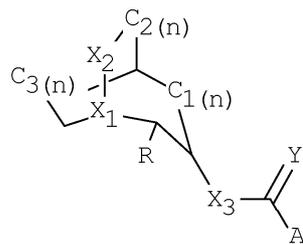
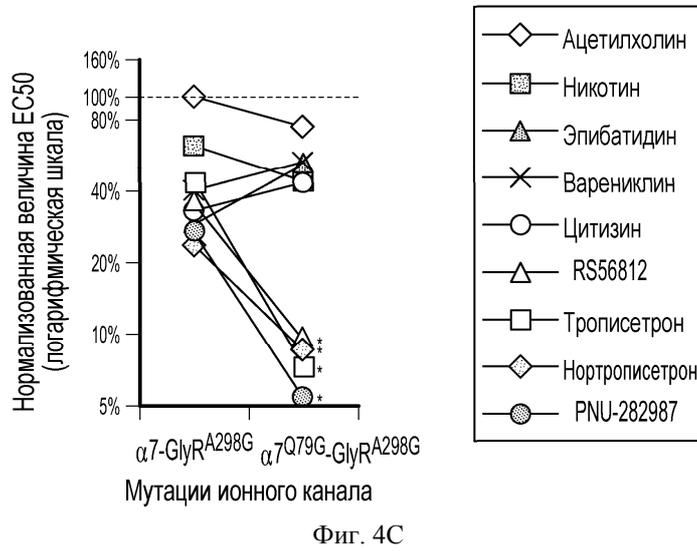
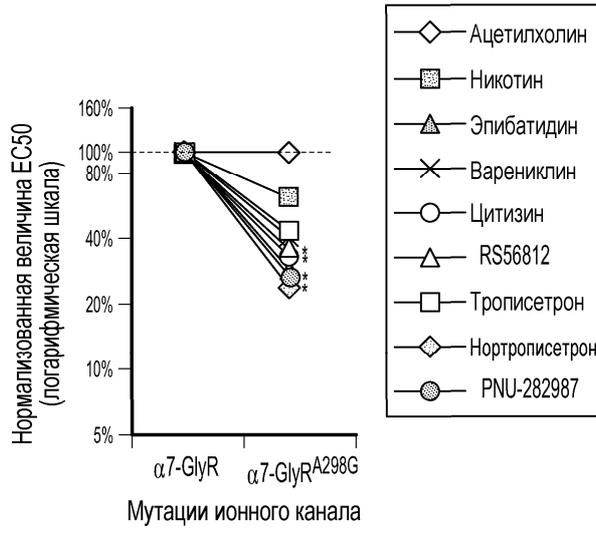
Фиг. 3А



Фиг. 3В

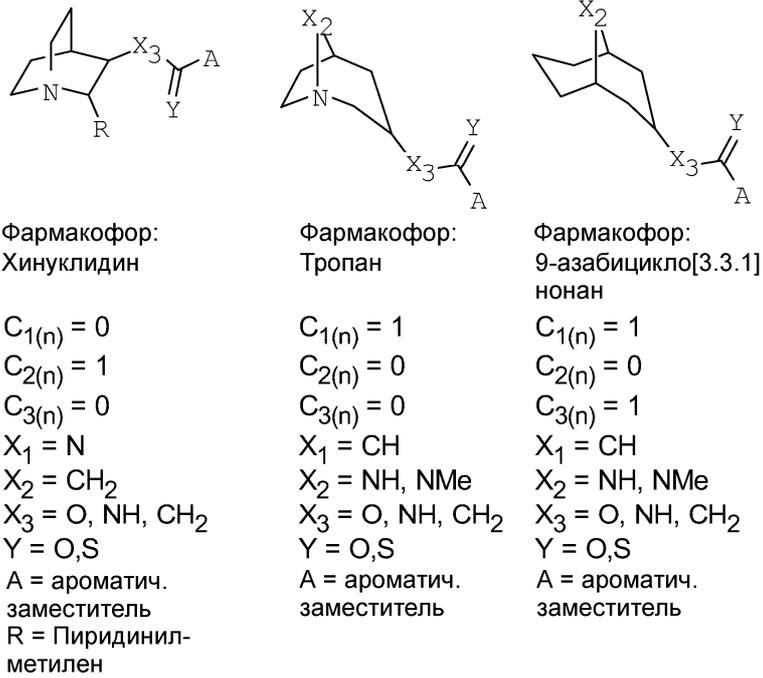


Фиг. 4А

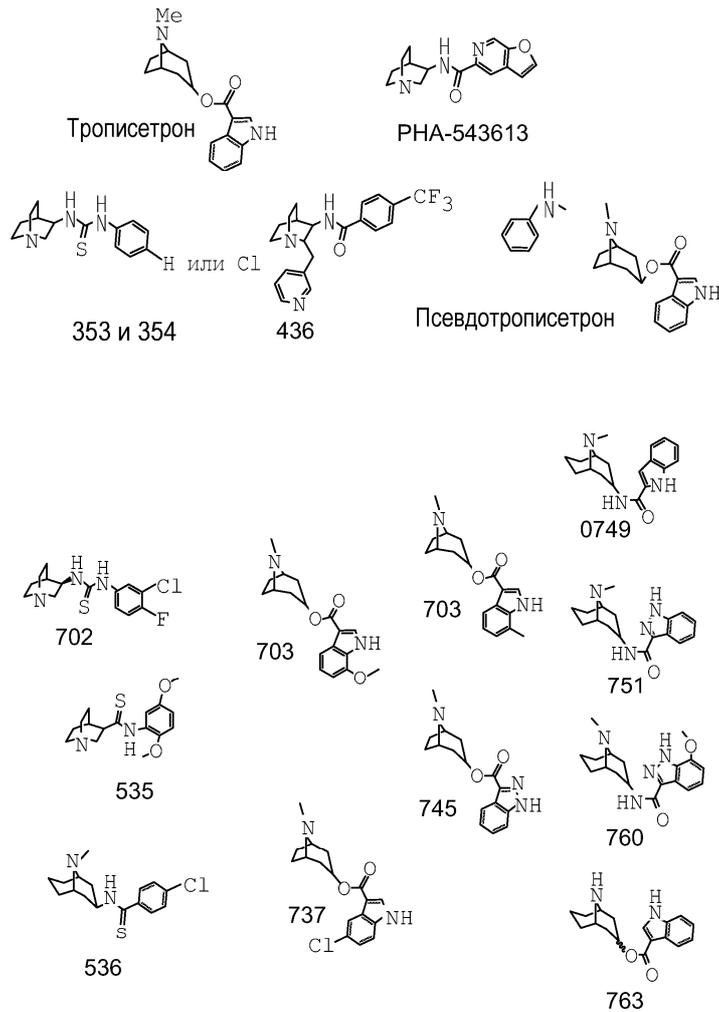


X = CH, CH₂, O, NH, NMe
 n = 0 или 1
 Y = O, S
 A = ароматический заместитель
 R = Пиридинилметилен

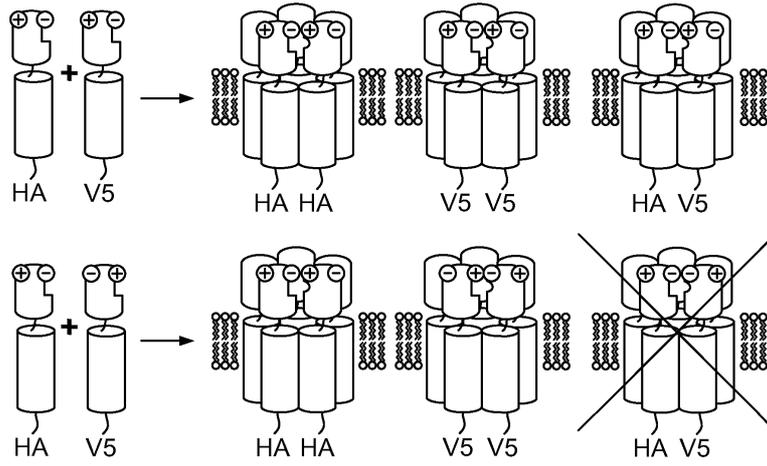
Фиг. 5А



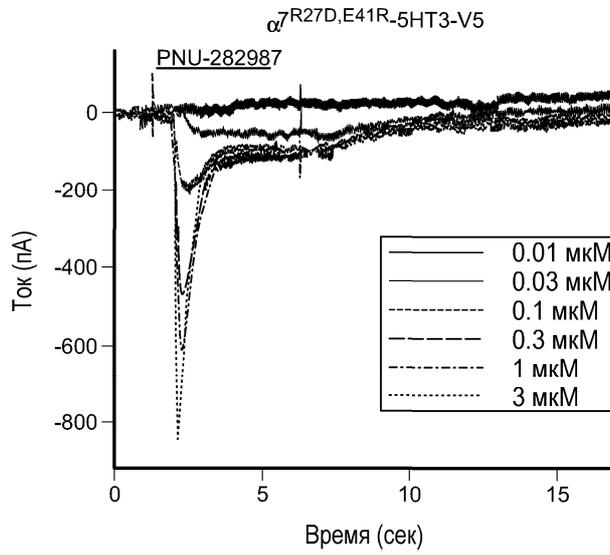
Фиг. 5В



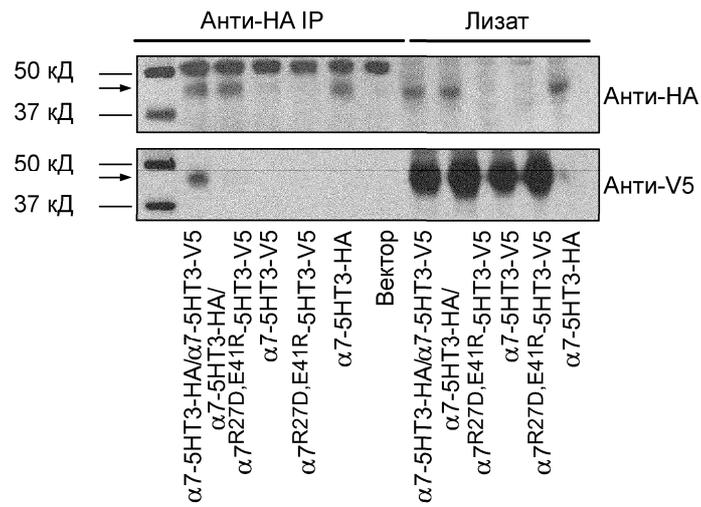
Фиг. 5С



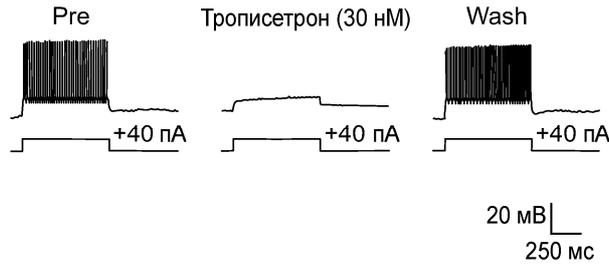
Фиг. 6А



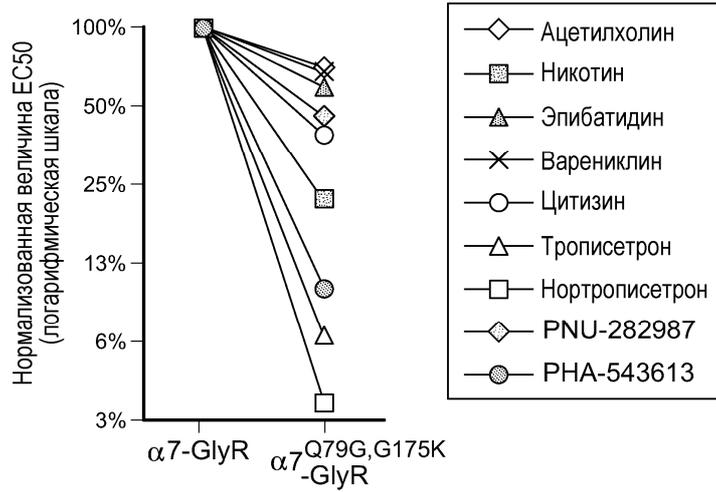
Фиг. 6В



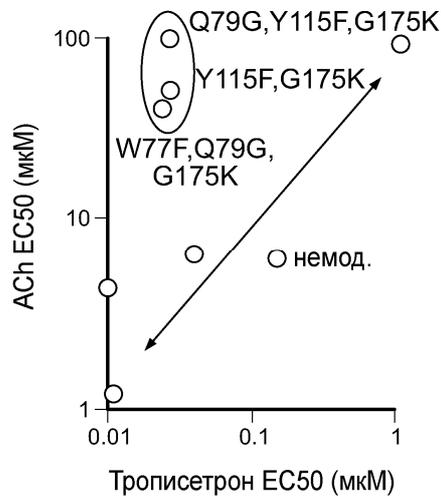
Фиг. 6С



Фиг. 7



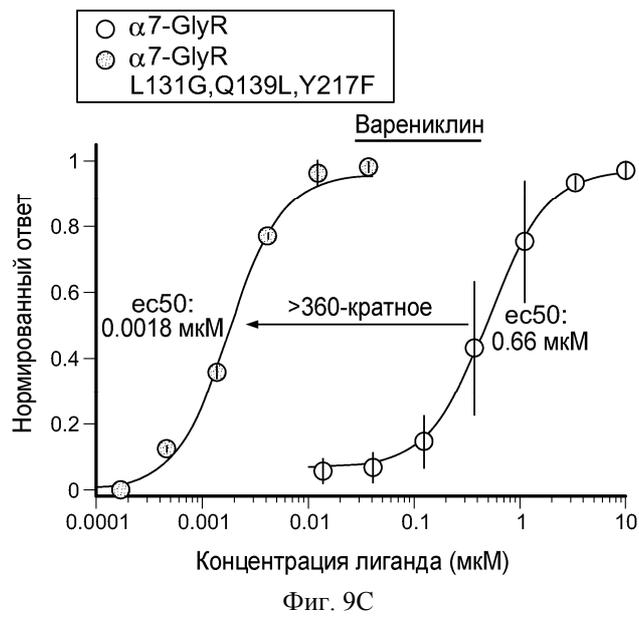
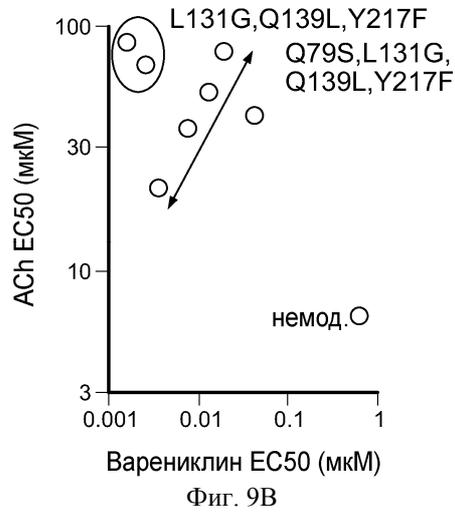
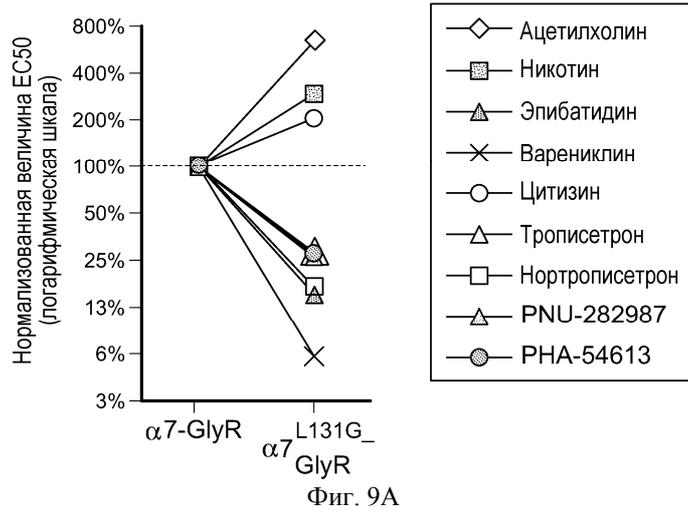
Фиг. 8А

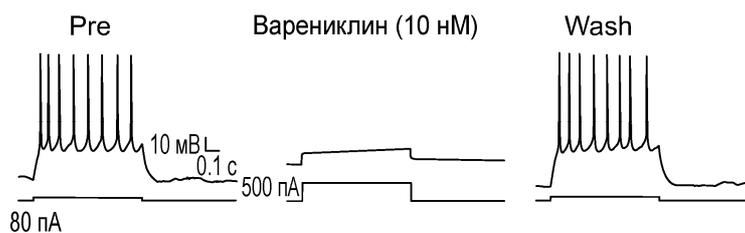


Фиг. 8В



Фиг. 8С

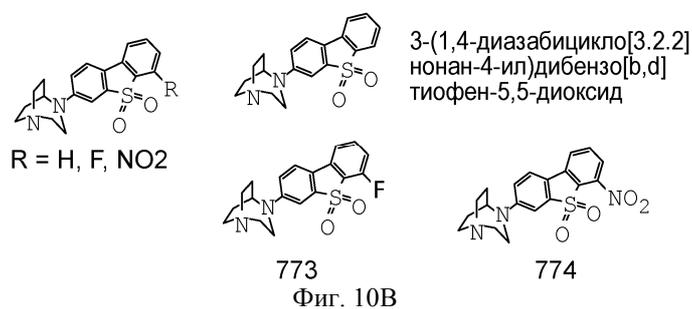




Фиг. 9D



Фиг. 10А



Фиг. 10В



Евразийская патентная организация, ЕАПО

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