

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-530468
(P2019-530468A)

(43) 公表日 令和1年10月24日(2019.10.24)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	Z N A 4 B 0 6 5
A 6 1 K 38/17 (2006.01)	A 6 1 K 38/17	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/439 (2006.01)	A 6 1 K 31/439	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/46 (2006.01)	A 6 1 K 31/46	4 H 0 4 5
A 6 1 K 31/55 (2006.01)	A 6 1 K 31/55	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 66 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2019-520933 (P2019-520933)
 (86) (22) 出願日 平成29年7月7日 (2017.7.7)
 (85) 翻訳文提出日 平成31年2月28日 (2019.2.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2017/041147
 (87) 国際公開番号 W02018/009832
 (87) 国際公開日 平成30年1月11日 (2018.1.11)
 (31) 優先権主張番号 62/359,534
 (32) 優先日 平成28年7月7日 (2016.7.7)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/486,779
 (32) 優先日 平成29年4月18日 (2017.4.18)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(71) 出願人 519003114
 ハワード ヒューズ メディカル インス
 ティテュート
 アメリカ合衆国 20815-6789
 メリーランド州 チェビー チェイス ジ
 ヨーンズ ブリッジ ロード 4000
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 修飾されたリガンド依存性イオンチャネルおよび使用の方法

(57) 【要約】

本明細書は、リガンド依存性イオンチャネル (L G I C) 活性を制御するための材料および方法に関する。例えば、修飾されたリガンド結合ドメイン (L B D) および/または修飾されたイオン細孔ドメイン (I P D) を有する少なくとも1つのL G I Cサブユニットを含む修飾されたL G I Cが供される。修飾L G I Cに結合してそれを活性化することができる外因性L G I Cリガンド、ならびに哺乳動物の細胞の膜を横切るイオン輸送を調節する方法、哺乳動物における細胞の興奮性を調節する方法、およびチャネル障害を有する哺乳動物を治療する方法も供される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

少なくとも 1 つの修飾 L G I C サブユニットを含む修飾リガンド依存性イオンチャネル (L G I C) であって、該修飾 L G I C サブユニットが、
アミノ酸修飾を含むリガンド結合ドメイン (L B D) と、
イオン細孔ドメイン (I P D) と、
を含む、修飾リガンド依存性イオンチャネル。

【請求項 2】

第 1 の L G I C からの L B D および第 2 の L G I C からの I P D を含むキメラ L G I C である、請求項 1 に記載の修飾 L G I C。

10

【請求項 3】

前記 L B D が、アルファ 7 ニコチン性アセチルコリン受容体 (7 - n A C h R) L B D である、請求項 1 に記載の修飾 L G I C。

【請求項 4】

前記アミノ酸修飾が、 7 - n A C h R L B D の残基 7 7、7 9、1 1 5、1 3 1、1 3 9、1 4 1、1 7 5、2 1 0、2 1 6、2 1 7、および 2 1 9 からなる群から選択される 1 つまたは複数のアミノ酸残基におけるアミノ酸置換を含む、請求項 3 に記載の修飾 L G I C。

【請求項 5】

前記アミノ酸置換が、 7 - n A C h R L B D の残基 7 7 にあり、かつ、該アミノ酸置換が、W 7 7 F および W 7 7 Y からなる群から選択される、請求項 4 に記載の修飾 L G I C。

20

【請求項 6】

前記アミノ酸置換が、 7 - n A C h R L B D の残基 7 9 にあり、かつ、該アミノ酸置換が、Q 7 9 A、Q 7 9 G、および Q 7 9 S からなる群から選択される、請求項 4 に記載の修飾 L G I C。

【請求項 7】

前記アミノ酸置換が、 7 - n A C h R L B D の残基 1 1 5 にあり、かつ、該アミノ酸置換が、Y 1 1 5 F 置換である、請求項 4 に記載の修飾 L G I C。

【請求項 8】

前記アミノ酸置換が、 7 - n A C h R L B D の残基 1 3 1 にあり、かつ、該アミノ酸置換が、L 1 3 1 A、L 1 3 1 G、L 1 3 1 M、および L 1 3 1 N からなる群から選択される、請求項 4 に記載の修飾 L G I C。

30

【請求項 9】

前記アミノ酸置換が、 7 - n A C h R L B D の残基 1 3 9 にあり、かつ、該アミノ酸置換が、Q 1 3 9 G および Q 1 3 9 L からなる群から選択される、請求項 4 に記載の修飾 L G I C。

【請求項 10】

前記アミノ酸置換が、 7 - n A C h R L B D の残基 1 7 5 にあり、かつ、該アミノ酸置換が、G 1 7 5 A、G 1 7 5 F、G 1 7 5 H、G 1 7 5 K、G 1 7 5 M、G 1 7 5 R、G 1 7 5 S、および G 1 7 5 V からなる群から選択される、請求項 4 に記載の修飾 L G I C。

40

【請求項 11】

前記アミノ酸置換が、 7 - n A C h R L B D の残基 2 1 0 にあり、かつ、該アミノ酸置換が、Y 2 1 0 F 置換である、請求項 4 に記載の修飾 L G I C。

【請求項 12】

前記アミノ酸置換が、 7 - n A C h R L B D の残基 2 1 6 にあり、かつ、該アミノ酸置換が、P 2 1 6 I 置換である、請求項 4 に記載の修飾 L G I C。

【請求項 13】

前記アミノ酸置換が、 7 - n A C h R L B D の残基 2 1 7 にあり、かつ、該アミノ

50

酸置換が、Y 2 1 7 F 置換である、請求項 4 に記載の修飾 L G I C。

【請求項 1 4】

前記アミノ酸置換が、7 - n A C h R L B D の残基 2 1 9 にあり、かつ、該アミノ酸置換が、D 2 1 9 A 置換である、請求項 4 に記載の修飾 L G I C。

【請求項 1 5】

前記 7 - n A C h R L B D が、L 1 3 1 G アミノ酸置換、Q 1 3 9 L アミノ酸置換、および Y 2 1 7 F アミノ酸置換を含む、請求項 4 に記載の修飾 L G I C。

【請求項 1 6】

前記 7 - n A C h R L B D が、L 1 3 1 M アミノ酸置換および Y 1 1 5 F アミノ酸置換を含む、請求項 4 に記載の修飾 L G I C。

10

【請求項 1 7】

前記 7 - n A C h R L B D が、W 7 7 F アミノ酸置換、Q 7 9 G アミノ酸置換、および G 1 7 5 K アミノ酸置換を含む、請求項 4 に記載の修飾 L G I C。

【請求項 1 8】

前記 7 - n A C h R L B D が、Q 7 9 G アミノ酸置換、Y 1 1 5 F アミノ酸置換、および G 1 7 5 K アミノ酸置換を含む、請求項 4 に記載の修飾 L G I C。

【請求項 1 9】

前記 7 - n A C h R L B D が、Y 1 1 5 F アミノ酸置換および G 1 7 5 K アミノ酸置換を含む、請求項 4 に記載の修飾 L G I C。

【請求項 2 0】

前記 7 - n A C h R L B D が、Q 7 9 G アミノ酸置換および 2 1 6 I アミノ酸置換を含む、請求項 4 に記載の修飾 L G I C。

20

【請求項 2 1】

前記 I P D が、セロトニン 3 受容体 (5 H T 3) I P D、グリシン受容体 (G l y R) I P D、ガンマ - アミノ酪酸 (G A B A) 受容体 I P D、およびアルファ 7 ニコチン性アセチルコリン受容体 (7 - n A C h R) I P D からなる群から選択される受容体からの I P D である、請求項 1 に記載の修飾 L G I C。

【請求項 2 2】

前記 I P D が、残基 2 9 8 にアミノ酸置換を含む、請求項 2 1 に記載の修飾 L G I C。

【請求項 2 3】

前記 I P D が、G l y R I P D であり、かつ、前記アミノ酸置換が、A 2 9 8 G 置換である、請求項 2 2 に記載の修飾 L G I C。

30

【請求項 2 4】

前記 I P D が、G A B A I P D であり、かつ、前記アミノ酸置換が、W 2 9 8 A 置換である、請求項 2 2 に記載の修飾 L G I C。

【請求項 2 5】

外因性 L G I C リガンドが前記修飾 L G I C を活性化し、該外因性 L G I C リガンドが、キヌクリジン、トロパン、9 - アザピシクロ [3 . 3 . 1] ノナン、6 , 7 , 8 , 9 - テトラヒドロ - 6 , 1 0 - メタノ - 6 H - ピラジノ (2 , 3 - h) ベンズアゼピン、および 1 , 4 - ジアザピシクロ [3 . 2 . 2] ノナンからなる群から選択される合成外因性 L G I C リガンドである、請求項 1 に記載の修飾 L G I C。

40

【請求項 2 6】

前記合成外因性 L G I C リガンドが、トロパンであり、かつ、該トロパンが、トロピセトロン、擬似 - トロピセトロン、ノルトロピセトロン、化合物 7 2 3、化合物 7 2 5、化合物 7 3 7、および化合物 7 4 5 からなる群から選択される、請求項 2 5 に記載の修飾 L G I C。

【請求項 2 7】

前記合成外因性 L G I C リガンドが、キヌクリジンであり、該キヌクリジンが、P N U - 2 8 2 9 8 7、P H A - 5 4 3 6 1 3、化合物 0 4 5 6、化合物 0 4 3 4、化合物 0 4 3 6、化合物 0 3 5 4、化合物 0 3 5 3、化合物 0 2 9 5、化合物 0 2 9 6、化合物 0 5

50

36、化合物0676、および化合物702からなる群から選択される、請求項25に記載の修飾LGIC。

【請求項28】

前記合成外因性LGICリガンドが、9-アザビシクロ[3.3.1]ノナンであり、かつ、該9-アザビシクロ[3.3.1]ノナンが、化合物536である、請求項25に記載の修飾LGIC。

【請求項29】

前記合成外因性LGICリガンドが、6,7,8,9-テトラヒドロ-6,10-メタノ-6H-ピラジノ(2,3-h)ベンズアゼピンであり、かつ、該6,7,8,9-テトラヒドロ-6,10-メタノ-6H-ピラジノ(2,3-h)ベンズアゼピンが、バレニクリン、化合物765、および化合物770からなる群から選択される、請求項25に記載の修飾LGIC。

10

【請求項30】

前記合成外因性LGICリガンドが、1,4-ジアザビシクロ[3.2.2]ノナンであり、かつ、該1,4-ジアザビシクロ[3.2.2]ノナンが、3-(1,4-ジアザビシクロ[3.2.2]ノナン-4-イル)ジベンゾ[b,d]チオフェン5,5-ジオキシド、化合物773、および化合物774からなる群から選択される、請求項25に記載の修飾LGIC。

【請求項31】

前記LBDが、7-nAChR LBDであり、かつ、該7-nAChR LBDが、未修飾LGICへの結合よりも、少なくとも1つの修飾アミノ酸を有する別の7-nAChR LBDへ選択的な結合を付与する少なくとも1つの修飾アミノ酸をさらに含む、請求項1に記載の修飾LGIC。

20

【請求項32】

前記未修飾LGICが内因性LGICである、請求項31に記載の修飾LGIC。

【請求項33】

前記内因性LGICが内因性7-nAChRである、請求項32に記載の修飾LGIC。

【請求項34】

前記選択的結合を付与する少なくとも1つの修飾アミノ酸が、7-nAChR LBDの残基27および/または残基41のアミノ酸残基におけるアミノ酸置換を含む、請求項31に記載の修飾LGIC。

30

【請求項35】

前記少なくとも1つの修飾アミノ酸が、R27D置換および/またはE41R置換を含む、請求項34に記載の修飾LGIC。

【請求項36】

前記IPDが、マウス5HT3 IPDであり、かつ、該マウス5HT3 IPDが、前記修飾LGICに増加したイオン伝導性を付与する少なくとも1つの修飾アミノ酸をさらに含む、請求項1に記載の修飾LGIC。

【請求項37】

前記修飾LGICに増加したイオン伝導性を付与するマウス5HT3 IPD中の少なくとも1つの修飾アミノ酸が、マウス5HT3 IPDの残基425、429、および/または433のアミノ酸残基におけるアミノ酸置換を含む、請求項36に記載の修飾LGIC。

40

【請求項38】

少なくとも1つの修飾アミノ酸が、R425Q置換、R429D置換、および/またはR433A置換を含む、請求項37に記載の修飾LGIC。

【請求項39】

前記IPDが、ヒト5HT3 IPDであり、かつ、該ヒト5HT3 IPDが、前記修飾LGICに増加したイオン伝導性を付与する少なくとも1つの修飾アミノ酸をさらに

50

含む、請求項 1 に記載の修飾 L G I C。

【請求項 4 0】

前記修飾 L G I C に増加したイオン伝導性を付与するヒト 5 H T 3 I P D 中の少なくとも 1 つの修飾アミノ酸が、ヒト 5 H T 3 I P D の残基 4 2 0、4 2 4、および / または 4 2 8 のアミノ酸残基におけるアミノ酸置換を含む、請求項 3 9 に記載の修飾 L G I C。

【請求項 4 1】

少なくとも 1 つの修飾アミノ酸が、R 4 2 0 Q 置換、R 4 2 4 D 置換、および / または R 4 2 8 A 置換を含む、請求項 4 0 に記載の修飾 L G I C。

【請求項 4 2】

前記 L B D が、内因性 L G I C リガンドとの減少した結合を有する、請求項 1 に記載の修飾 L G I C。

【請求項 4 3】

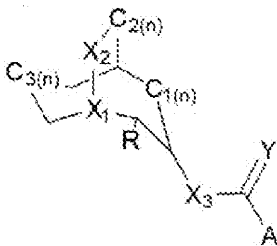
前記内因性 L G I C リガンドが、アセチルコリン (A C h) である、請求項 4 2 に記載の修飾 L G I C。

【請求項 4 4】

前記修飾 L G I C が、A c h について 2 0 μ M 超の E C 5 0 を有する、請求項 4 3 に記載の修飾 L G I C。

【請求項 4 5】

修飾リガンド依存性イオンチャネル (L G I C) に対して増加した効力を有するリガンドであって、式 I :



(式中、

X 1、X 2、および X 3 の各々は、独立して、C H、C H 2、O、N H、または N M e であり、

各 n は、独立して、0 または 1 であり、

Y は、O または S であり、

A は、芳香族置換基であり、

R は、H またはピリジニルメチレンである)

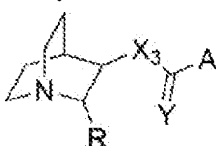
を含む、リガンド。

【請求項 4 6】

前記芳香族置換基が、1 H - インドール、4 - (トリフルオロメチル) ベンゼン、2 , 5 - ジメトキシベンゼン、4 - クロロアニリン、アニリン、5 - (トリフルオロメチル) ピリジン - 2 - イル、6 - (トリフルオロメチル) ニコチン、および 4 - クロロ - ベンゼンからなる群から選択される、請求項 4 5 に記載のリガンド。

【請求項 4 7】

式 I I :



(式中、

X 3 は、O、N H、または C H 2 であり、

Y は、O または S であり、

10

20

30

40

50

A は、芳香族置換基であり、

R は、H またはピリジニルメチレンである)

を有するキヌクリジンである、請求項 45 に記載のリガンド。

【請求項 48】

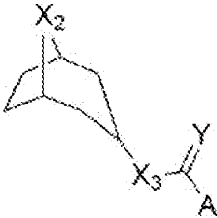
前記芳香族置換基が、1H-インドール、4-(トリフルオロメチル)ベンゼン、4-クロロベンゼン、2,5-ジメトキシベンゼン、4-(トリフルオロメチル)ベンゼン、4-クロロアニリン、アニリン、5-(トリフルオロメチル)ピリジン-2-イル、6-(トリフルオロメチル)ニコチン、3-クロロ-4-フルオロベンゼン、および1H-インドールからなる群から選択される、請求項 47 に記載のリガンド。

【請求項 49】

前記キヌクリジンが、PNU-282987、PHA-543613、化合物0456、化合物0434、化合物0436、化合物0354、化合物0353、化合物0295、化合物0296、化合物0536、化合物0676、および化合物0702 からなる群から選択される、請求項 47 に記載のリガンド。

【請求項 50】

式 III :



(式中、

X2 は、NH または NMe であり、

X3 は、O、NH、または CH2 であり、

Y は、O または S であり、

A は、芳香族置換基である)

を有するトロパンである、請求項 45 に記載のリガンド。

【請求項 51】

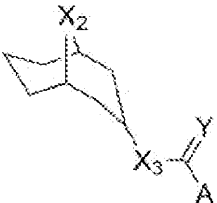
前記芳香族置換基が、1H-インドール、1H-インダゾール、7-メトキシ-1H-インドール、7-メチル-1H-インドール、および5-クロロ-1H-インドールからなる群から選択される、請求項 50 に記載のリガンド。

【請求項 52】

前記トロパンが、トロピセトロン、擬似-トロピセトロン、ノルトロピセトロン、化合物723、化合物725、化合物737、および化合物745 からなる群から選択される、請求項 50 に記載のリガンド。

【請求項 53】

式 IV :



(式中、

X2 は、NH または NMe であり、

X3 は、O、NH、又は CH であり、

Y は、O または S であり、

A は、芳香族置換基である)

を有する 9-アザビシクロ[3.3.1]ノナンである、請求項 45 に記載のリガンド。

【請求項 5 4】

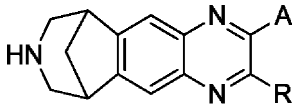
前記芳香族置換基が、4-クロロ-ベンゼン、1H-インドール、1H-インダゾール、7-メトキシ-1H-インダゾールからなる群から選択される、請求項 5 4 に記載のリガンド。

【請求項 5 5】

前記 9-アザビシクロ[3.3.1]ノナンが、化合物 0 5 3 6、化合物 0 7 4 9、化合物 0 7 5 1、化合物 0 7 6 0、および化合物 0 7 6 3 からなる群から選択される、請求項 5 4 に記載のリガンド。

【請求項 5 6】

修飾リガンド依存性イオンチャネル(LGIC)に対して増加した効力を有するリガンドであって、式 V :



(式中、

R は、H または CH₃ であり、

A は、H または芳香族置換基である)

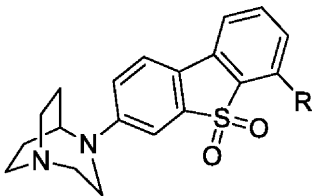
を含む、リガンド。

【請求項 5 7】

前記 6, 7, 8, 9-テトラヒドロ-6, 10-メタノ-6H-ピラジノ(2, 3-h)ベンズアゼピンが、バレニクリン、化合物 0 7 6 5、および化合物 0 7 7 0 からなる群から選択される、請求項 5 6 に記載のリガンド。

【請求項 5 8】

修飾リガンド依存性イオンチャネル(LGIC)に対して増加した効力を有するリガンドであって、式 VI :



(式中、R は、H、F、または NO₂ である)

を含む、リガンド。

【請求項 5 9】

前記 1, 4-ジアザビシクロ[3.2.2]ノナンが、3-(1, 4-ジアザビシクロ[3.2.2]ノナン-4-イル)ジベンゾ[b, d]チオフェン 5, 5-ジオキシド、化合物 0 7 7 3、および化合物 0 7 7 4 からなる群から選択される、請求項 5 8 に記載のリガンド。

【請求項 6 0】

哺乳動物においてチャネル障害を治療する方法であって、

該哺乳動物において細胞に修飾リガンド依存性イオンチャネル(LGIC)を投与する段階であって、外因性 LGIC リガンドが、該修飾 LGIC に選択的に結合し、該修飾 LGIC が、少なくとも 1 つの修飾された LGIC サブユニットを含み、該修飾 LGIC サブユニットが、

少なくとも 1 つの修飾アミノ酸を含むリガンド結合ドメイン、および
イオン細孔ドメイン

を含む、段階と、

前記外因性リガンドを哺乳動物に投与する段階と、

を含む、方法。

【請求項 6 1】

前記チャネル障害が、パーター症候群、ブルガダ症候群、カテコールアミン作動性多形

10

20

30

40

50

性心室頻拍症（C P V T）、先天性高インスリン血症、嚢胞性線維症、ドラベ症候群、一過性運動失調症、先端紅痛症、全般てんかん（たとえば、熱性発作を伴うもの）、家族性片麻痺性片頭痛、線維筋痛症、高カリウム血性周期性四肢麻痺、低カリウム血性周期性四肢麻痺、ランバート-イトン（Lambert-Eaton）筋無力症候群、QT延長症候群（たとえば、ロマノ-ワード（Romano-Ward）症候群）、QT短縮症候群、悪性高熱症、ムコリビドーシスIV型、重症筋無力症、先天性ミオトニー、視神経脊髄炎、神経ミオトニー、非症候性難聴、先天性パラミオトニア、網膜色素変性症、チモシー症候群、耳鳴り、発作、三叉神経痛、および多発性硬化症からなる群から選択される、請求項60に記載の方法。

【請求項62】

哺乳動物の細胞膜を横切るイオン輸送を調節する方法であって、

修飾リガンド依存性イオンチャネル（L G I C）を細胞に投与する段階であって、外因性L G I Cリガンドが、修飾L G I Cに選択的に結合し、該修飾L G I Cが、少なくとも1つの修飾されたL G I Cサブユニットを含み、該修飾L G I Cサブユニットが、
少なくとも1つの修飾アミノ酸を含むリガンド結合ドメイン、および
イオン細孔ドメイン

を含む、段階と、

前記外因性リガンドを哺乳動物に投与する段階と、

を含む、方法。

【請求項63】

前記調節が、イオン輸送を活性化することを含む、請求項62に記載の方法。

【請求項64】

前記調節が、イオン輸送を阻害することを含む、請求項62に記載の方法。

【請求項65】

前記細胞が、ニューロン、グリア細胞、筋細胞、幹細胞、内分泌細胞、および免疫細胞からなる群から選択される、請求項62に記載の方法。

【請求項66】

前記修飾L G I Cの細胞への投与が、インビボ投与を含む、請求項62に記載の方法。

【請求項67】

前記修飾L G I Cの細胞への投与が、エクスピボ投与を含む、請求項62に記載の方法

。

【請求項68】

哺乳動物において細胞の興奮性を調節する方法であって、

哺乳動物由来の細胞に修飾リガンド依存性イオンチャネル（L G I C）を投与する段階であって、外因性L G I Cリガンドが、修飾L G I Cに選択的に結合し、該修飾L G I Cが、少なくとも1つの修飾されたL G I Cサブユニットを含み、該修飾L G I Cサブユニットが、

少なくとも1つの修飾アミノ酸を含むリガンド結合ドメイン、および
イオン細孔ドメイン

を含む、段階と、

前記外因性リガンドを哺乳動物に投与する段階と、

を含む、方法。

【請求項69】

前記調節が、細胞の興奮性を増大させることを含む、請求項68に記載の方法。

【請求項70】

前記調節が、細胞の興奮性を低下させることを含む、請求項68に記載の方法。

【請求項71】

前記細胞が、興奮性細胞である、請求項68に記載の方法。

【請求項72】

前記細胞が、ニューロン、グリア細胞、筋細胞、幹細胞、内分泌細胞、および免疫細胞からなる群から選択される、請求項68に記載の方法。

10

20

30

40

50

- 【請求項 7 3】
前記修飾 L G I C の細胞への投与が、インビボ投与を含む、請求項 6 8 に記載の方法。
- 【請求項 7 4】
前記修飾 L G I C の細胞への投与が、エクスピボ投与を含む、請求項 6 8 に記載の方法。
- 【請求項 7 5】
哺乳動物において細胞の活性を調節する方法であって、
細胞に修飾リガンド依存性イオンチャネル (L G I C) を投与する段階であって、外因性 L G I C リガンドが、修飾 L G I C に選択的に結合し、該修飾 L G I C が、少なくとも 1 つの修飾された L G I C サブユニットを含み、該修飾 L G I C サブユニットが、
少なくとも 1 つの修飾アミノ酸を含むリガンド結合ドメイン、および
イオン細孔ドメイン
を含む、段階と、
前記外因性リガンドを哺乳動物に投与する段階と、
を含む、方法。
- 【請求項 7 6】
前記調節が、細胞の活性を増大させることを含む、請求項 7 5 に記載の方法。
- 【請求項 7 7】
前記調節が、細胞の活性を低下させることを含む、請求項 7 5 に記載の方法。
- 【請求項 7 8】
前記活性が、イオン輸送、受動輸送、興奮、阻害、およびエキソサイトーシスからなる群から選択される、請求項 7 5 に記載の方法。
- 【請求項 7 9】
前記細胞が、ニューロン、グリア細胞、筋細胞、幹細胞、内分泌細胞、および免疫細胞からなる群から選択される、請求項 7 5 に記載の方法。
- 【請求項 8 0】
前記修飾 L G I C の哺乳動物由来細胞への投与が、インビボ投与を含む、請求項 7 5 に記載の方法。
- 【請求項 8 1】
前記修飾 L G I C の哺乳動物由来細胞への投与が、エクスピボ投与を含む、請求項 7 5 に記載の方法。
- 【請求項 8 2】
前記修飾 L G I C が、第 1 の L G I C からの L B D および第 2 の L G I C からの I P D を含むキメラ L G I C である、請求項 6 0、6 2、6 8、または 7 5 のいずれか一項に記載の修飾 L G I C 。
- 【請求項 8 3】
前記キメラ L G I C が、ホモマーのキメラ L G I C である、請求項 8 2 に記載の方法。
- 【請求項 8 4】
前記修飾 L G I C の細胞への投与が、該修飾 L G I C をコードする核酸を投与することを含む、請求項 6 0、6 2、6 8、または 7 5 のいずれか一項に記載の方法。
- 【請求項 8 5】
前記修飾 L G I C が、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、または配列番号：1 0 に対して少なくとも 8 5 % の同一性を有する配列を含む、請求項 8 4 に記載の方法。
- 【請求項 8 6】
前記修飾 L G I C が、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、または配列番号：1 0 に対して少なくとも 9 0 % の同一性を有する配列を含む、請求項 8 5 に記載の方法。
- 【請求項 8 7】
前記修飾 L G I C が、配列番号：6、配列番号：7、配列番号：8、配列番号：1 0 に対して少なくとも 9 5 % の同一性を有する配列を含む、請求項 8 6 に記載の方法。
- 【請求項 8 8】

10

20

30

40

50

前記修飾 L G I C が、配列番号： 6、配列番号： 7、配列番号： 8、配列番号： 10 に記載の配列を含む、請求項 87 に記載の方法。

【請求項 89】

前記 L B D が、アルファ7ニコチン性アセチルコリン受容体 (7 - n A C h R) L B D である、請求項 60、62、68、または75のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 90】

7 - n A C h R L B D 中の少なくとも1つの修飾アミノ酸が、7 - n A C h R L B D の残基 77、79、115、131、139、141、175、210、216、217、および219からなる群から選択される少なくとも1つのアミノ酸残基においてアミノ酸置換を含む、請求項 89 に記載の方法。

10

【請求項 91】

前記アミノ酸置換が、7 - n A C h R L B D の残基 77 にあり、かつ、該アミノ酸置換が、W77F および W77Y からなる群から選択される、請求項 90 に記載の方法。

【請求項 92】

前記アミノ酸置換が、7 - n A C h R L B D の残基 79 にあり、かつ、該アミノ酸置換が、Q79A、Q79G、およびQ79S からなる群から選択される、請求項 90 に記載の方法。

【請求項 93】

前記アミノ酸置換が、7 - n A C h R L B D の残基 115 にあり、かつ、該アミノ酸置換が、Y115F 置換である、請求項 90 に記載の方法。

20

【請求項 94】

前記アミノ酸置換が、7 - n A C h R L B D の残基 131 にあり、かつ、該アミノ酸置換が、L131A、L131G、L131M、およびL131N からなる群から選択される、請求項 90 に記載の方法。

【請求項 95】

前記アミノ酸置換が、7 - n A C h R L B D の残基 139 にあり、かつ、該アミノ酸置換が Q139G または Q139L 置換である、請求項 90 に記載の方法。

【請求項 96】

前記アミノ酸置換が、7 - n A C h R L B D の残基 175 にあり、かつ、該アミノ酸置換が、G175A、G175F、G175H、G175K、G175M、G175R、G175S、およびG175V からなる群から選択される、請求項 90 に記載の方法。

30

【請求項 97】

前記アミノ酸置換が、7 - n A C h R L B D の残基 210 にあり、かつ、該アミノ酸置換が、Y210F 置換である、請求項 90 に記載の方法。

【請求項 98】

前記アミノ酸置換が、7 - n A C h R L B D の残基 216 にあり、かつ、該アミノ酸置換が、P216I である、請求項 90 に記載の方法。

【請求項 99】

前記アミノ酸置換が、7 - n A C h R L B D の残基 217 にあり、かつ、該アミノ酸置換が、Y217F である、請求項 90 に記載の方法。

40

【請求項 100】

前記アミノ酸置換が、7 - n A C h R L B D の残基 219 にあり、かつ、アミノ酸置換が D219A である、請求項 90 に記載の方法。

【請求項 101】

前記 I P D が少なくとも1つの修飾アミノ酸を含む、請求項 60、62、68、または75のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 102】

前記 I P D が、セロトニン3受容体 (5 H T 3) I P D、グリシン受容体 (G l y R) I P D、G A B A 受容体 I P D、およびアルファ7ニコチン性アセチルコリン受容体 (7 - n A C h R) I P D からなる群から選択される、請求項 101 に記載の方法。

50

【請求項 103】

前記 IPD が GlyR IPD であり、かつ、少なくとも1つの修飾アミノ酸が、修飾 LGIC の残基 298 のアミノ酸置換を含む、請求項 102 に記載の方法。

【請求項 104】

前記修飾 LGIC の残基 298 におけるアミノ酸置換が、A298G 置換である、請求項 103 に記載の方法。

【請求項 105】

前記 IPD が GABA IPD であり、かつ、GABA IPD 中の少なくとも1つの修飾アミノ酸が、修飾 LGIC の残基 298 のアミノ酸置換を含む、請求項 102 に記載の修飾 LGIC。

10

【請求項 106】

前記キメラ LGIC の残基 298 のアミノ酸置換が、W298A 置換である、請求項 105 に記載の修飾 LGIC。

【請求項 107】

前記外因性 LGIC リガンドが、合成外因性 LGIC リガンドである、請求項 60、62、68、または 75 のいずれか一項に記載の修飾 LGIC。

【請求項 108】

前記合成外因性 LGIC リガンドが、トロパン、キヌクリジン、9 - アザビシクロ [3 . 3 . 1] ノナン、1 , 4 - ジアザビシクロ [3 . 2 . 2] ノナン、および 6 , 7 , 8 , 9 - テトラヒドロ - 6 , 10 - メタノ - 6 H - ピラジノ (2 , 3 - h) ベンズアゼピンからなる群から選択される、請求項 107 に記載の方法。

20

【請求項 109】

前記合成外因性 LGIC リガンドが、トロパンであり、かつ、該トロパンが、トロピセトロン、擬似トロピセトロン、ノルトロピセトロン、化合物 723、化合物 725、化合物 737、および化合物 745 からなる群より選択される、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 110】

前記合成外因性 LGIC リガンドが、キヌクリジンであり、かつ、該キヌクリジンが、PNU - 282987、PHA - 543613、化合物 0456、化合物 0434、化合物 0436、化合物 0354、化合物 0353、化合物 0295、化合物 0296、化合物 0536、化合物 0676、および化合物 702 からなる群から選択される、請求項 108 に記載の方法。

30

【請求項 111】

前記合成外因性 LGIC リガンドが、9 - アザビシクロ [3 . 3 . 1] ノナンであり、かつ、該 9 - アザビシクロ [3 . 3 . 1] ノナンが、化合物 0536、化合物 0749、化合物 0751、化合物 0760、および化合物 0763 からなる群から選択される、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 112】

前記合成外因性 LGIC リガンドが、1 , 4 - ジアザビシクロ [3 . 2 . 2] ノナンであり、かつ、該 1 , 4 - ジアザビシクロ [3 . 2 . 2] ノナンが、3 - (1 , 4 - ジアザビシクロ [3 . 2 . 2] ノナン - 4 - イル) ジベンゾ [b , d] チオフェン 5 , 5 - ジオキシド、化合物 0773、および化合物 0774 からなる群から選択される、請求項 108 に記載の方法。

40

【請求項 113】

前記合成外因性 LGIC リガンドが、6 , 7 , 8 , 9 - テトラヒドロ - 6 , 10 - メタノ - 6 H - ピラジノ (2 , 3 - h) ベンズアゼピンであり、かつ、該 6 , 7 , 8 , 9 - テトラヒドロ - 6 , 10 - メタノ - 6 H - ピラジノ (2 , 3 - h) ベンズアゼピンが、パレニクリン、化合物 0765、および化合物 0770 からなる群から選択される、請求項 108 に記載の方法。

【請求項 114】

修飾リガンド依存性イオンチャネル (LGIC) に選択的に結合するリガンドを同定す

50

るための方法であって、

請求項 1 に記載の修飾 L G I C に 1 つまたは複数の候補リガンドを供する段階と、

該候補リガンドと該修飾 L G I C との間の結合を検出し、それにより修飾 L G I C に選択的に結合するリガンドを同定する段階と、
を含む、方法。

【請求項 1 1 5】

前記修飾 L G I C が、第一の L G I C からの L B D および第二の L G I C からの I P D を含むキメラ L G I C である、請求項 1 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 1 6】

少なくとも 1 つの修飾された L G I C サブユニットを含む修飾リガンド依存性イオンチャンネル (L G I C) を検出する方法であって、

請求項 1 に記載の 1 つまたは複数の修飾された L G I C サブユニットを供する段階と、
該修飾 L G I C に選択的に結合する剤を供する段階と、

該修飾 L G I C と該修飾 L G I C に選択的に結合する剤との間の結合を検出し、それにより修飾 L G I C を検出する段階と、
を含む、方法。

【請求項 1 1 7】

前記修飾 L G I C に選択的に結合する剤が、抗体、タンパク質、または小分子を含む、請求項 1 1 6 に記載の方法。

【請求項 1 1 8】

前記修飾 L G I C に選択的に結合する剤が、検出可能な標識を含む、請求項 1 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 1 9】

前記検出可能な標識が、蛍光標識、放射性標識、および陽電子放出標識からなる群から選択される標識を含む、請求項 1 1 8 に記載の方法。

【請求項 1 2 0】

請求項 1 に記載の修飾 L G I C を含む哺乳動物細胞。

【請求項 1 2 1】

請求項 1 に記載の修飾された L G I C サブユニットを発現する核酸。

【請求項 1 2 2】

キメラ L G I C サブユニットを含む、ホモマーのキメラのリガンド依存性イオンチャンネル (L G I C) であって、各キメラ L G I C サブユニットが、

Q 7 9 G アミノ酸置換を有し、かつ、W 7 7 F アミノ酸置換、Q 1 3 9 G アミノ酸置換、Y 1 1 5 F アミノ酸置換、G 1 7 5 K アミノ酸置換、Y 2 1 0 F アミノ酸置換、P 2 1 6 I アミノ酸置換、R 2 7 D アミノ酸置換、および E 4 1 R アミノ酸置換のうち少なくとも 1 つを有する、アルファ 7 ニコチン性アセチルコリン受容体リガンド結合ドメインと、

グリシン受容体イオン細孔ドメインと、
を含む、

ここで、トロピセトロンおよびグラニセトロンからなる群から選択されるリガンドが、キメラ L G I C に選択的に結合し、かつ、該キメラ L G I C が、アセチルコリン (A C h) に最小結合する、

ホモマーのキメラのリガンド依存性イオンチャンネル (L G I C) 。

【請求項 1 2 3】

キメラ L G I C サブユニットを含む、ホモマーのキメラのリガンド依存性イオンチャンネル (L G I C) であって、各キメラ L G I C サブユニットが、

L 1 3 1 G アミノ酸置換を有し、かつ、Q 7 9 S アミノ酸置換、Q 1 3 9 L アミノ酸置換、Y 2 1 7 F アミノ酸置換、R 2 7 D アミノ酸置換、および E 4 1 R アミノ酸置換のうち少なくとも 1 つを有する、アルファ 7 ニコチン性アセチルコリン受容体リガンド結合ドメインと、

10

20

30

40

50

グリシン受容体イオン細孔ドメインおよびセロトニン3受容体イオン細孔ドメインからなる群から選択されるイオン細孔ドメインと、
を含み、

ここで、バレニクリンおよびトロピセトロンからなる群から選択されるリガンドが、キメラLGICに選択的に結合し、かつ、該キメラLGICが、アセチルコリン(ACH)に最小結合する、
ホモマーのキメラのリガンド依存性イオンチャネル(LGIC)。

【請求項124】

哺乳動物においてチャネル障害を治療する方法であって、
哺乳動物において細胞に請求項122または123に記載のLGICを投与する段階と

10

、
該哺乳動物にリガンドを投与する段階と、
を含む、方法。

【請求項125】

哺乳動物において細胞の興奮性を調節する方法であって、
哺乳動物において細胞に請求項122または123に記載のLGICを投与する段階と

、
該哺乳動物にリガンドを投与する段階と、
を含む、方法。

【請求項126】

哺乳動物において細胞の活性を調節する方法であって、
哺乳動物において細胞に請求項122または123に記載のLGICを投与する段階と

20

、
該哺乳動物にリガンドを投与する段階と、
を含む、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願との相互参照

本出願は、2016年7月7日に出願された米国特許出願第62/359,534号の利益を主張し、2017年4月18日に出願された米国特許出願第62/486,779号の利益を主張する。これら先の出願の開示は、この出願の開示の一部とみなされる(そして、本願の開示において引用により組み込まれる)。

30

【0002】

1. 技術分野

本明細書は、リガンド依存性イオンチャネル(LGIC)活性を制御するための材料および方法に関する。例えば、本明細書は、修飾リガンド結合ドメイン(LBD)および/または修飾イオン細孔ドメイン(IPD)を有する少なくとも1つのLGICサブユニットを含む修飾LGICを供する。修飾LGICに結合してそれを活性化することができる外因性LGICリガンドも供される。特定の場合、修飾LGICおよび外因性リガンドは、チャネル障害(例えば、神経チャネル障害または筋肉チャネル障害)を有する哺乳動物を治療するのに用いることができる。特定の場合、修飾LGICおよび外因性LGICリガンドは、哺乳動物の細胞の膜を横切るイオン輸送を調節(例えば、活性化または阻害)するのに用いることができる。特定の場合、修飾LGICおよび外因性LGICリガンドは、哺乳動物における細胞の興奮性を調節する(例えば、増加または減少させる)のに用いることができる。

40

【背景技術】

【0003】

2. 背景情報

イオンチャネルは細胞内のイオンフラックスを媒介し、それはそれらの生物学的機能に

50

深く影響を及ぼす。これの顕著な例はニューロンにあり、ここでは、イオンチャネルが生理学、感覚、行動、気分、および認知に影響を与えるためにニューロン間の電気信号伝達を制御する。

【0004】

異なるLGICは、明確なリガンド結合特性および特定のイオン伝導特性を有する (Hille 2001 Ion Channels of Excitable Membranes. pp. 814. Sunderland, MA: Sinauer Associates (非特許文献1); Kandel et al 2000 Principles of Neural Science. USA: McGraw-Hill Co. 1414 pp (非特許文献2))。たとえば、ニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) は、内因性リガンドアセチルコリン (ACh) に結合し、それがカチオンのコンダクタンスを活性化し、典型的には細胞を脱分極し、それによって細胞の興奮性を増加させる。対照的に、グリシン受容体 (GlyR) は、内因性リガンドであるグリシンに結合し、それは塩化物アニオンのコンダクタンスを活性化し、典型的には過分極および/または細胞膜抵抗の電気シャントによって細胞の興奮性を低下させる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Hille 2001 Ion Channels of Excitable Membranes. pp. 814. Sunderland, MA: Sinauer Associates

【非特許文献2】Kandel et al 2000 Principles of Neural Science. USA: McGraw-Hill Co. 1414 pp

【発明の概要】

【0006】

概要

AChなどの内因性LGICアゴニストのレベルは、容易には制御されない。

本明細書は、LGIC活性を制御する (例えば、外因性リガンドに対するLGICの感度を高める、および/またはAChなどの内因性リガンドに対する感度を低下させる) ための材料および方法を供する。例えば、本明細書は、LBDおよびIPDを有し、かつ、少なくとも1つの修飾されたアミノ酸 (例えば、アミノ酸置換) を有する、少なくとも1つの修飾されたLGICサブユニットを含む、修飾されたLGICを供する。修飾LGICに結合してそれを活性化することができる外因性LGICリガンドも供される。特定の場合には、修飾LGICおよび外因性リガンドは、チャネル障害 (例えば、神経チャネル障害または筋肉チャネル障害) を有する哺乳動物を治療するのに用いることができる。特定の場合、修飾LGICおよび外因性LGICリガンドは、哺乳動物の細胞の膜を横切るイオン輸送を調節 (例えば、活性化または阻害) するのに用いることができる。特定の場合、修飾LGICおよび外因性LGICリガンドは、哺乳動物における細胞の興奮性を調節する (例えば、増加または減少させる) のに用いることができる。

【0007】

LGIC活性を制御する能力を有することは、細胞内のイオン輸送の制御を達成するためのユニークでまだ実現されていない機会を提供する。たとえば、1つまたは複数の外因性LGICリガンドに対して増加された感度を有する修飾LGICは、外因性LGICリガンドの送達に基づいてイオン輸送および/または細胞興奮性の時間的および空間的制御を提供するのに用いることができる。たとえば、内因性LGICリガンドに対して低下された感度を有する修飾LGICは、修飾LGICの望ましくない活性化を防ぎ、外因性リガンドによる修飾LGICに対する選択的制御を可能にする。さらに、修飾LGICに対して増強された効力を有する外因性LGICリガンドは、内因性イオンチャネルに対する修飾LGICの標的化の選択性を改善する。したがって、本明細書で供される修飾LGICおよび外因性LGICリガンドは、意図しない標的に対する小分子からの副作用を軽減しながら治療効果を達成するのに有用である。

【0008】

本明細書中に記載されるように、修飾LGICにおける1つまたは複数の変異は、外因

性 L G I C リガンドに対する効力を増強することができる。残基 L 1 3 1 での 7 - G l y R の 7 L B D の突然変異（例えば、L e u を G l y または A l a で置換する）は、パレニクリン（16倍）およびトロピセトロン（3.6倍）について効力を増加させながら、7 - G l y R に対する A C h 効力（-6.4倍）を減少させた。残基 G 1 7 5（例えば、G 1 7 5 K）または P 2 1 6（例えば、P 2 1 6 I）での 7 - G l y R の 7 L B D の突然変異は、A C h、ニコチン、トロピセトロン、パレニクリン、ならびに他のキヌクリジンおよびトロパンアゴニストに対する効力を増強した。残基 G 1 7 5 K での変異を内因性アゴニスト A C h の効力を低下させる変異（例えば、Y 1 1 5 F）と組み合わせると、トロピセトロンに対する効力が上昇し（5.5倍）、A C h からの効力が低下する（-8倍）7 - G l y R Y 1 1 5 F G 1 7 5 K が生成された。さらに、これらのキメラチャンネルにおける残基 7 7（例えば、T r p を P h e または T y r に置換する）および/または 7 9（例えば、G l n を G l y、A l a、または S e r に置換する）および/または 1 3 1（例えば L e u を G l y または A l a に置換する）および/または 1 4 1（例えば、L e u を P h e または P r o に置換する）における 7 L B D における変異を、残基 G 1 7 5（例えば、G 1 7 5 K）または P 2 1 6（例えば、P 2 1 6 I）における効力を増強する変異と組み合わせると、異なるリガンドに対する効力を高め、および/または A C h 効力を低下させる。例えば、残基 7 9 の突然変異（例えば G l n を G l y に置換）、残基 1 1 5 の突然変異（例えば T y r を P h e に置換）、および残基 1 7 5 の突然変異（例えば G l y を L y s に置換）を有する 7 n A C h R L B D（7 L B D）を有するキメラ 7 - G l y R L G I C は、外因性トロパン L G I C リガンド化合物 7 2 3（トロパン）に対して 1 0 0 倍を超える増加した感度を有し、未修飾キメラ 7 - G l y R L G I C に対して減少した A C h 感度（-15倍）を有する。さらに、残基 7 9 に突然変異を有する（例えば、G l n を A l a、G l y、または S e r に置換する）7 n A C h R L B D（7 L B D）、および残基 2 9 8 に突然変異を有する（例えば、A l a を G l y に置換する）G l y R I P D を有する少なくとも 1 つのキメラ L G I C サブユニットを含む修飾 L G I C は、キヌクリジンまたはトロパンのような外因性 L G I C リガンドに対してほぼ 2 0 倍増加した感度を有する。7 L B D の残基 2 7（例えば、A r g を A s p に置換する）および 4 1（例えば、G l u を A r g に置換する）におけるさらなる変異は、修飾キメラ L G I C と未修飾イオンチャンネルとの会合を減少させた。7 L B D の残基 1 1 5（例えば、T y r を P h e に置換する）、1 3 9（例えば、G l n を G l y または L e u に置換する）、2 1 0（例えば、T y r を P h e に置換する）、2 1 7（例えば、T y r を P h e に置換する）、および/または 2 1 9（例えば、A s p を A l a で置換する）におけるさらなる変異は、内因性リガンド A C h に対するキメラ L G I C の感受性を低下させた。これらのキメラ L G I C は、哺乳動物における内因性シグナル伝達系との交差反応性を最小にしながら、哺乳動物の細胞における細胞機能に対する高度に選択的な制御を可能にする。

【0009】

概して、本明細書の一態様は、アミノ酸修飾を有する L B D と I P D とを含む少なくとも 1 つの修飾された L G I C サブユニットを有する修飾された L G I C であって、外因性 L G I C リガンドが修飾された L G I C を活性化する、修飾された L G I C を特徴とする。その修飾 L G I C は、第一の L G I C からの L B D および第二の L G I C からの I P D を有するキメラ L G I C であり得る。L B D は、アルファ 7 ニコチン性アセチルコリン受容体（7 - n A C h R）L B D であり得る。7 - n A C h R L B D 中の少なくとも 1 つの修飾アミノ酸が、7 - n A C h R L B D の残基 7 7、7 9、1 3 1、1 3 9、1 4 1、1 7 5、および 2 1 6 からなる群から選択されるアミノ酸残基におけるアミノ酸置換を含む、請求項 3 に記載の修飾 L G I C。アミノ酸置換は、7 L B D の残基 7 9 であり得、アミノ酸置換は、Q 7 9 A、Q 7 9 G、または Q 7 9 S であり得る。例えば、7 L B D の残基 7 9 におけるアミノ酸置換は、Q 7 9 G であり得る。I P D は、セロトニン 3 受容体（5 H T 3）I P D、グリシン受容体（G l y R）I P D、ガンマ - アミノ酪酸（G A B A）受容体 I P D、または 7 - n A C h R I P D であり得る。I P D

10

20

30

40

50

はGlyR IPDであり得、GlyR IPDはキメラLGICの残基298にアミノ酸置換（例えば、A298G置換）を含み得る。IPDはGABA IPDであり得、GABA IPDは修飾LGICの残基298にアミノ酸置換（例えば、W298A置換）を含み得る。修飾LGICは、Q79Gアミノ酸置換を有する7 LBD、およびA298Gアミノ酸置換を有するGlyR IPDを含むキメラLGICであり得る。外因性LGICリガンドは、キヌクリジン、トロパン、9 - アザピシクロ[3.3.1]ノナン、6, 7, 8, 9 - テトラヒドロ - 6, 10 - メタノ - 6H - ピラジノ(2, 3 - h)ベンズアゼピン、および1, 4 - ジアザピシクロ[3.2.2]ノナンからなる群から選択される合成外因性LGICリガンドであり得る。合成外因性LGICリガンドがトロパンである場合、トロパンは、トロピセトロン、擬似トロピセトロン、ノルトロピセトロン、化合物723、化合物725、化合物737、または化合物745であり得る。合成外因性LGICリガンドがキヌクリジンである場合、キヌクリジンは、PNU - 282987、PHA - 543613、化合物0456、化合物0434、化合物0436、化合物0354、化合物0353、化合物0295、化合物0296、化合物0536、化合物0676、または化合物702であり得る。合成外因性LGICリガンドが6, 7, 8, 9 - テトラヒドロ - 6, 10 - メタノ - 6H - ピラジノ(2, 3 - h)ベンズアゼピンである場合、リガンドは化合物765または化合物770であり得る。合成外因性LGICリガンドが1, 4 - ジアザピシクロ[3.2.2]ノナンである場合、リガンドは化合物773または化合物774であり得る。特定の場合において、LBDは7 LBDであり得、7 LBDはまた、非修飾LGICへの結合に勝る、少なくとも1つの修飾アミノ酸を有する別の7 LBDへの選択的結合を付与する少なくとも1つの修飾アミノ酸を含み得る。未修飾LGICは、内因性LGIC（例えば、内因性7 - nAChR）であり得る。非修飾LGICへの結合の減少をもたらす7 LBD中の少なくとも1つの修飾アミノ酸は、残基27（例えばR27D置換）および/または残基41（例えばE41R置換）でのアミノ酸置換を含み得る。場合によっては、IPDは5HT3 IPDであり得、5HT3 IPDは、修飾LGICに増大したイオン伝導性（コンダクタンス）を付与する少なくとも1つの修飾アミノ酸を含み得る。修飾LGICにイオン伝導度の増加を付与する5HT3 IPD中の少なくとも1つの修飾アミノ酸は、残基425（例えば、R425Q置換）、429（例えば、R429D置換）、および/または433（例えば、R433A置換）のアミノ酸残基におけるアミノ酸置換を含み得る。

10

20

30

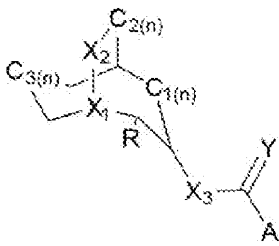
40

【0010】

別の態様では、本明細書は、少なくとも1つの修飾アミノ酸を有するLBDおよびIPDを含む少なくとも1つの修飾されたLGICサブユニットを有する修飾LGICを特徴とし、ここで、LBD中の少なくとも1つの修飾アミノ酸は内因性LGICリガンドとの結合を低減させる。修飾LGICは、第一のLGICからのLBDおよび第二のLGICからのIPDを有するキメラLGICであり得る。内因性LGICリガンドはAChであり得る。修飾LGICは、AChに対して20 μMを超えるEC50を有し得る。少なくとも1つの修飾アミノ酸は、残基115、139、210、217、および/または219でのアミノ酸置換を含み得る。少なくとも1つの修飾アミノ酸が残基115でのアミノ酸置換を含む場合、アミノ酸置換はY115F置換であり得る。少なくとも1つの修飾アミノ酸が残基139にアミノ酸置換を含む場合、アミノ酸置換はQ139GまたはQ139L置換であり得る。少なくとも1つの修飾アミノ酸が残基210にアミノ酸置換を含む場合、アミノ酸置換はY210F置換であり得る。少なくとも1つの修飾アミノ酸が残基217にアミノ酸置換を含む場合、アミノ酸置換はY217F置換であり得る。少なくとも1つの修飾アミノ酸が残基219にアミノ酸置換を含む場合、アミノ酸置換はD219A置換であり得る。

【0011】

別の態様では、本明細書は、修飾されたリガンド依存性イオンチャネル（LGIC）に対して増加した効力を有するリガンドを特徴とし、ここで、そのリガンドは式I：

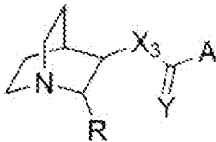


(式中、X₁、X₂、およびX₃のそれぞれは、独立して、CH、CH₂、O、NH、またはNMeであり得、各nは独立して0または1であり得、YはOまたはSであり、Aは芳香族置換基であり、RはHまたはピリジニルメチレンである)

を含む。芳香族置換基は、1H-インドール、4-(トリフルオロメチル)ベンゼン、2,5-ジメトキシベンゼン、4-クロロアニリン、アニリン、5-(トリフルオロメチル)ピリジン-2-イル、6-(トリフルオロメチル)ニコチン(nicotinic)、または4-クロロベンゼンであり得る。

【0012】

特定の場合、LGICリガンドはキヌクリジンであり得、式II:

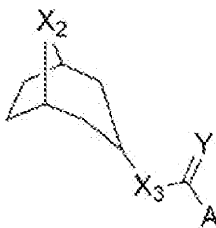


(式中、X₃は、O、NH、またはCH₂であり、Yは、OまたはSであり、Aは芳香族置換基であり、RはHまたはピリジニルメチレンである)

に示される構造を有し得る。芳香族置換基は、1H-インドール、4-(トリフルオロメチル)ベンゼン、4-クロロベンゼン、2,5-ジメトキシベンゼン、4-(トリフルオロメチル)ベンゼン、4-クロロアニリン、アニリン、5-(トリフルオロメチル)ピリジン-2-イル、6-(トリフルオロメチル)ニコチン、3-クロロ-4-フルオロベンゼン、または1H-インドールであり得る。キヌクリジンは、PNU-282987、PHA-543613、化合物0456、化合物0434、化合物0436、化合物0354、化合物0353、化合物0295、化合物0296、化合物0536、化合物0676、または化合物702であり得る。

【0013】

特定の場合、LGICリガンドトロパンであり得、式III:



(式中、X₂はNHまたはNMeであり、X₃はO、NH、またはCH₂であり、YはOまたはSであり、Aは芳香族置換基である)

に示す構造を有し得る。芳香族置換基は、1H-インドール、7-メトキシ-1H-インドール、7-メチル-1H-インドール、5-クロロ-1H-インドール、または1H-インダゾールであり得る。トロパンは、トロピセトロン、擬似トロピセトロン、ノルトロピセトロン、化合物723、化合物725、化合物737、または化合物745であり得る。

【0014】

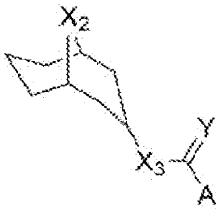
特定の場合、LGICリガンドは、9-アザビシクロ[3.3.1]ノナンであり得、そして式IV:

10

20

30

40

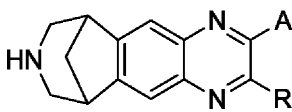


(式中、X₁はCHであり得、X₂はNHまたはNMeであり得、X₃はO、NH、またはCHであり得、YはOまたはSであり得、Aは芳香族置換基であり得る) に示される構造を有し得る。芳香族置換基は、4-クロロ-ベンゼンであり得る。9-アザビシクロ[3.3.1]ノナンは化合物0536であり得る。

10

【0015】

別の態様では、本明細書は、修飾されたりガンド依存性イオンチャネル(LGIC)に対して増大した効力を有するリガンドを特徴とする。ここで、そのリガンドは、6,7,8,9-テトラヒドロ-6,10-メタノ-6H-ピラジノ(2,3-h)ベンズアゼピンであり得、式V:

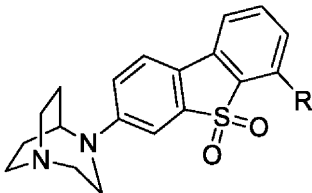


(式中、RはHまたはCH₃であり得、AはHまたは芳香族置換基であり得る) に示す構造を有し得る。6,7,8,9-テトラヒドロ-6,10-メタノ-6H-ピラジノ(2,3-h)ベンズアゼピンは、パレニクリン、化合物0765、または化合物0770であり得る。

20

【0016】

別の態様では、本明細書は、修飾リガンド依存性イオンチャネル(LGIC)に対して増大した効力を有するリガンドを特徴とする。ここで、そのリガンドは、1,4-ジアザビシクロ[3.2.2]ノナンであり得、式VI:



30

(式中、RはH、F、またはNO₂であり得る) に示す構造を有し得る。1,4-ジアザビシクロ[3.2.2]ノナンは、3-(1,4-ジアザビシクロ[3.2.2]ノナン-4-イル)ジベンゾ[b,d]チオフェン5,5-ジオキソド、化合物0773、または化合物0774であり得る。

【0017】

別の態様では、本明細書は、哺乳動物においてチャネル障害を治療する方法を特徴とする。この方法は、哺乳動物において細胞に修飾LGICを投与することを含み、または本質的にそれからなり、ここで、外因性LGICリガンドは修飾LGICに選択的に結合する。修飾LGICは、少なくとも1つの修飾アミノ酸を含むLBDおよびIPDを含む少なくとも1つの修飾されたLGICサブユニットを有する。そして外因性リガンドが哺乳動物に投与される。チャネル障害は、パーター症候群、ブルガダ症候群、カテコールアミン作動性多形性心室頻拍症(CPVT)、先天性高インスリン血症、嚢胞性線維症、ドラベ症候群、一過性運動失調症(episodic ataxia)、先端紅痛症、全般てんかん(たとえば、熱性発作を伴うもの)、家族性片麻痺性片頭痛、線維筋痛症、高カリウム血性周期性四肢麻痺、低カリウム血性周期性四肢麻痺、ランバート-イトン(Lambert-Eaton)筋無力症候群、QT延長症候群(たとえば、ロマノ-ワード(Romano-Ward)症候群)、QT短縮症候群、悪性高熱症、ムコリピドーシスIV型、重症筋無力症、先天性ミオトニー、視神経脊髄炎、神経ミオトニー、非症候性難聴、先天性パラミオトニア、網膜色素変性症、チモシー症候群、耳鳴り、発作、三叉神経痛、および多発性硬化症であり得る。

40

50

【0018】

別の態様において、本明細書は、哺乳動物の細胞膜を横切るイオン輸送を調節する方法を特徴とする。この方法は、修飾L G I Cを細胞に投与することを含むか、または本質的にそれからなり、ここで、外因性L G I Cリガンドは修飾L G I Cに選択的に結合する。修飾L G I Cは、少なくとも1つの修飾アミノ酸を含むL B DおよびI P Dを含む少なくとも1つの修飾L G I Cサブユニットを有する。そして、外因性リガンドは哺乳動物に投与される。調節は、イオン輸送を活性化または阻害することを含み得る。細胞は、ニューロン、グリア細胞、筋細胞、幹細胞、内分泌細胞、または免疫細胞であり得る。細胞への修飾L G I Cの投与は、インビボ投与またはエクスピボ投与であり得る。修飾L G I Cの細胞への投与は、修飾L G I Cをコードする核酸の投与を含み得る。

10

【0019】

別の態様において、本明細書は、哺乳動物において細胞の興奮性を調節する方法を特徴とする。この方法は、哺乳動物由来の細胞に修飾L G I Cを投与することを含むか、または本質的にそれからなり、ここで、外因性L G I Cリガンドは修飾L G I Cに選択的に結合する。修飾L G I Cは、少なくとも1つの修飾アミノ酸を含むL B DおよびI P Dを含む少なくとも1つの修飾L G I Cサブユニットを有する。そして、外因性リガンドが哺乳動物に投与される。調節は、細胞の興奮性を増加させること、または細胞の興奮性を減少させることを含み得る。細胞は興奮性細胞であり得る。細胞は、ニューロン、グリア細胞、筋細胞、幹細胞、内分泌細胞、または免疫細胞であり得る。細胞への修飾L G I Cの投与は、インビボ投与またはエクスピボ投与であり得る。修飾L G I Cの細胞への投与は、修飾L G I Cをコードする核酸の投与を含み得る。

20

【0020】

別の態様において、本明細書は、哺乳動物において細胞の活性を調節する方法を特徴とする。この方法は、修飾L G I Cを細胞に投与することを含むか、または本質的にそれからなり、ここで、外因性L G I Cリガンドは修飾L G I Cに選択的に結合する。修飾L G I Cは、少なくとも1つの修飾アミノ酸を含むL B DおよびI P Dを含む少なくとも1つの修飾L G I Cサブユニットを有する。そして、外因性リガンドが哺乳動物に投与される。調節は、細胞の活性を増加させることまたは細胞の活性を減少させることを含み得る。活性は、イオン輸送、受動輸送、興奮、阻害、またはエキソサイトーシスであり得る。細胞は、ニューロン、グリア細胞、筋細胞、幹細胞、内分泌細胞、または免疫細胞であり得る。細胞への修飾L G I Cの投与は、インビボ投与またはエクスピボ投与であり得る。修飾L G I Cの細胞への投与は、修飾L G I Cをコードする核酸の（例えば、アデノ関連性ウイルス、単純ヘルペスウイルス、またはレンチウイルスなどのウイルスベクターを介しての）投与を含み得る。

30

【0021】

他の態様では、本文献は、修飾L G I Cに選択的に結合するリガンドを同定するための方法の特徴とする。この方法は、本明細書に記載の修飾L G I Cに対する1つまたは複数の候補リガンドを供し、そして、候補リガンドと修飾L G I Cとの間の結合を検出し、それによって修飾L G I Cに選択的に結合するリガンドを同定することを含むか、またはそれらから本質的になる。修飾L G I Cはホモマー修飾L G I Cであり得る。

40

【0022】

他の態様では、本明細書は、修飾L G I Cを検出するための方法の特徴とする。この方法は、本明細書に記載の1つまたは複数の修飾L G I Cサブユニットを供し、修飾L G I Cに選択的に結合する剤を供し、そして、修飾L G I Cと修飾L G I Cに選択的に結合する剤との間の結合を検出することによって修飾L G I Cを検出することを含むか、またはそれらから本質的になる。修飾L G I Cを選択的に結合する剤は、抗体、タンパク質（例えば、ブンガロトキシン）、または小分子（例えば、陽電子放出断層撮影（PET）リガンド）であり得る。修飾L G I Cに選択的に結合する剤は、検出可能な標識（例えば、蛍光標識、放射性標識、または陽電子放出標識）を含み得る。

【0023】

50

他に定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術的および科学的用語は、本開示が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。方法および材料は、本開示における使用のために本明細書に記載される。当該分野で公知の他の適切な方法および材料もまた使用され得る。材料、方法、および例は例示にすぎず、限定することを意図しない。本明細書で言及される全ての刊行物、特許出願、特許、配列、データベースエントリー、および他の参考文献は、その全体が引用により組み込まれる。矛盾がある場合は、定義を含め、本明細書が優先するであろう。

【0024】

本発明の1つまたは複数の実施形態の詳細は、添付の図面および以下の説明に記載される。本発明の他の特徴、目的、および利点は、説明および図面から、そして特許請求の範囲から明らかになる。

【図面の簡単な説明】

【0025】

【図1A】図1は、キメラLGICの例示的なアミノ酸配列を示す。アミノ酸残基77の突然変異（例えば、W77FまたはW77Y）は、グラニセトロンおよびトロピセトロンに対する感受性をもたらした。アミノ酸残基79の突然変異（例えば、Q79G）は、いくつかのアゴニストに最も効果的であった。アミノ酸残基131の変異（例えば、L131G、L131A、L131M、またはL131N）は、バレニクリン、トロピセトロン、グラニセトロン、およびAChに対する感受性を変化させた。LBD突然変異をGlyRまたはGABAC/IPDのアミノ酸残基298の突然変異と組み合わせた場合、効力はかなり増強された。7nAChR LBD変異をアミノ酸残基G175およびP216での変異と組み合わせた場合も、効力が増強された。A) ヒト7nAChR LBD（配列番号：1）およびマウス5HT3/IPD（配列番号：3）構成物を含む、7-5HT3キメラ受容体のアミノ酸配列（配列番号：6）。

【図1B】図1は、キメラLGICの例示的なアミノ酸配列を示す。アミノ酸残基77の突然変異（例えば、W77FまたはW77Y）は、グラニセトロンおよびトロピセトロンに対する感受性をもたらした。アミノ酸残基79の突然変異（例えば、Q79G）は、いくつかのアゴニストに最も効果的であった。アミノ酸残基131の変異（例えば、L131G、L131A、L131M、またはL131N）は、バレニクリン、トロピセトロン、グラニセトロン、およびAChに対する感受性を変化させた。LBD突然変異をGlyRまたはGABAC/IPDのアミノ酸残基298の突然変異と組み合わせた場合、効力はかなり増強された。7nAChR LBD変異をアミノ酸残基G175およびP216での変異と組み合わせた場合も、効力が増強された。B) ヒト7nAChR LBD（配列番号：2）およびヒトGlyR/IPD（配列番号：5）構成物を含む、7-GlyRキメラ受容体のアミノ酸配列（配列番号：7）。

【図1C】図1は、キメラLGICの例示的なアミノ酸配列を示す。アミノ酸残基77の突然変異（例えば、W77FまたはW77Y）は、グラニセトロンおよびトロピセトロンに対する感受性をもたらした。アミノ酸残基79の突然変異（例えば、Q79G）は、いくつかのアゴニストに最も効果的であった。アミノ酸残基131の変異（例えば、L131G、L131A、L131M、またはL131N）は、バレニクリン、トロピセトロン、グラニセトロン、およびAChに対する感受性を変化させた。LBD突然変異をGlyRまたはGABAC/IPDのアミノ酸残基298の突然変異と組み合わせた場合、効力はかなり増強された。7nAChR LBD変異をアミノ酸残基G175およびP216での変異と組み合わせた場合も、効力が増強された。C) ヒト7nAChR LBD（配列番号：1）およびヒト5HT3/IPD（配列番号：4）構成物を含む、7-5HT3キメラ受容体のアミノ酸配列（配列番号：8）。

【図1D】図1は、キメラLGICの例示的なアミノ酸配列を示す。アミノ酸残基77の突然変異（例えば、W77FまたはW77Y）は、グラニセトロンおよびトロピセトロンに対する感受性をもたらした。アミノ酸残基79の突然変異（例えば、Q79G）は、いくつかのアゴニストに最も効果的であった。アミノ酸残基131の変異（例えば、L131

10

20

30

40

50

1 G、L 1 3 1 A、L 1 3 1 M、またはL 1 3 1 N)は、バレニクリン、トロピセトロン、グラニセトロン、およびAChに対する感受性を変化させた。LBD突然変異をGly RまたはGABAC IPDのアミノ酸残基298の突然変異と組み合わせた場合、効力はかなり増強された。7 nAChR LBD変異をアミノ酸残基G175およびP216での変異と組み合わせた場合も、効力が増強された。D)ヒト7 nAChR LBD(配列番号:2)およびヒトGABAC IPD(配列番号:9)構成物を含む、7-GABA α キメラ受容体のアミノ酸配列(配列番号:10)。

【図1E】図1は、キメラLGICの例示的なアミノ酸配列を示す。アミノ酸残基77の突然変異(例えば、W77FまたはW77Y)は、グラニセトロンおよびトロピセトロンに対する感受性をもたらした。アミノ酸残基79の突然変異(例えば、Q79G)は、いくつかのアゴニストに最も効果的であった。アミノ酸残基131の変異(例えば、L131G、L131A、L131M、またはL131N)は、バレニクリン、トロピセトロン、グラニセトロン、およびAChに対する感受性を変化させた。LBD突然変異をGly RまたはGABAC IPDのアミノ酸残基298の突然変異と組み合わせた場合、効力はかなり増強された。7 nAChR LBD変異をアミノ酸残基G175およびP216での変異と組み合わせた場合も、効力が増強された。E)ラットnAChR配列のアミノ酸配列(配列番号12)。

【図2】図2は、7-5HT3キメラLGIC、および図1に示す位置にLBD変異を有するキメラLGICの変異体に対するトロピセトロンのEC50を示す。Gln79における複数の変異は、未修飾7-5HT3チャンネルと比較して類似または改善された効力を示した(矢印)。

【図3A】図3は、7-5HT3キメラLGICに対する既知のnAChRアゴニストの相対的効力を示す。A)未修飾の7-5HT3キメラチャンネルに対して正規化したEC50のグラフ(対数目盛)。* $P < 0.05$ 、統計的に有意な効力の変化が認められる(ANOVAとそれに続くダン検定)。

【図3B】図3は、7-5HT3キメラLGICに対する既知のnAChRアゴニストの相対的効力を示す。B)既知のnAChRアゴニストの化学構造。

【図4A】図4は、7-GlyRキメラLGICに対する既知のnAChRアゴニストの相対的効力を示す。A)未修飾7-GlyRキメラチャンネルに対して正規化したQ79 LBD突然変異体についてのEC50のグラフ(対数目盛)。

【図4B】図4は、7-GlyRキメラLGICに対する既知のnAChRアゴニストの相対的効力を示す。B)未修飾7-GlyRキメラチャンネルに対して正規化したA298G IPD突然変異についてのEC50のグラフ(対数目盛)。

【図4C】図4は、7-GlyRキメラLGICに対する既知のnAChRアゴニストの相対的効力を示す。C)未修飾7-GlyRキメラチャンネルに対して正規化し、二重変異体チャンネル7Q79G-GlyR^{A298G}と比較した、7-GlyR^{A298G}についてのEC50のグラフ(対数目盛)。* $P < 0.05$ 、統計的に有意な効力の変化が認められる(ANOVAとそれに続くダン検定)。

【図5A】図5は、7^{Q79G}-5HT3および7^{Q79G}-GlyR^{A298G}についての効力増強と最も適合する置換パターンを有するLGICアゴニストの概略構造を示す。A)強化された効力に関連する特性を示す一般化構造。

【図5B】図5は、7^{Q79G}-5HT3および7^{Q79G}-GlyR^{A298G}についての効力増強と最も適合する置換パターンを有するLGICアゴニストの概略構造を示す。B)(A)で表される特定のファーマコフォアは、キヌクリジン、トロパン、および9-アザピシクロ[3.3.1]ノナンコア構造である。

【図5C】図5は、7^{Q79G}-5HT3および7^{Q79G}-GlyR^{A298G}についての効力増強と最も適合する置換パターンを有するLGICアゴニストの概略構造を示す。C)7^{Q79G}-GlyR^{A298G}、7^{Q79G}、Y115F、G175K-GlyR、7^{W77F}、Q79G、G175K-GlyRに対して高い効力を示す例示的合成分子。

10

20

30

40

50

【図6A】図6は、キメラLCIG 7nAChR LBDと未修飾LBDとの会合を減少させる突然変異を示す。A) 7-5HT3をコードする2つのエピトープタグ付き(HAおよびV5)コンストラクト(上側)、または7-5HT3-HAおよび7^R21D、E41R-5HT3-V5をコードする2つのコンストラクトのトランスフェクションの電荷反転概略ポテンシャル配置。ここで、2つの異なるエピトープタグ付きサブユニット間の会合は、サブユニット界面での電荷反転突然変異のために好ましくないであろう。

【図6B】図6は、キメラLCIG 7nAChR LBDと未修飾LBDとの会合を減少させる突然変異を示す。B) V5エピトープタグを有する7^R21D、E41R-5HT3を発現するHEK細胞における全細胞記録は、PNU-282987に対する強力な応答を示す。

【図6C】図6は、キメラLCIG 7nAChR LBDと未修飾LBDとの会合を減少させる突然変異を示す。C) HEK細胞中の7-5HT3 LGICとHAおよびV5エピトープタグとの会合を、HA免疫沈降(左)または全溶解物単離、続いて抗HA(上)または抗V5抗体(下)のいずれかを用いたウエスタンブロッティングによって調べた。HAおよびV5エピトープとチャンネルを共発現する細胞において、抗HA IPとそれに続く抗V5イムノブロッティングは、各タイプの未修飾チャンネルの共免疫沈降を示すが、LBD 7^R21D、E41R-5HT3 V5における電荷反転突然変異は免疫沈降しなかった。7-5HT3のMWは、約48kDである(矢印)。

【図7】図7は、キメラLGICが外因性リガンドを用いて制御され得ることを示す。アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクターを介して7^Q7⁹G-GlyR^{A298G}キメラLGICを形質導入したマウス脳からの皮質ニューロンは、30nMのトロピセトロンによって強力的に抑制される40pAの電流注入(PRE)に反応して活動電位を発火する。トロピセトロンの洗い流し(WASH)後、ニューロンの発火は回復する。

【図8A】図8は、G175K変異を有するキメラLGICに対するアゴニストの活性を示す。A) 未修飾7-GlyRキメラチャンネルに対して正規化した、既知のアゴニストに対するQ79G G175K LBD変異体についてのEC50のグラフ(対数目盛)。

【図8B】図8は、G175K変異を有するキメラLGICに対するアゴニストの活性を示す。B) 7-GlyRキメラLGICに変異を有するチャンネルについてのAChおよびトロピセトロンについてのEC50のグラフ。トロピセトロンに対して高い効力および内因性リガンドであるアセチルコリン(ACh)に対して低い効力を有するチャンネルをもたらす突然変異が最適である(灰色の陰影)。Unmod: 未変更の7-GlyRキメラLGIC。

【図8C】図8は、G175K変異を有するキメラLGICに対するアゴニストの活性を示す。C) 7^Q7⁹G、Y115F、G175K-GlyRキメラLGICを形質導入したマウス脳からの皮質ニューロンの活動電位。ニューロンは電流注入(PRE)に反応して発火し、100nMトロピセトロンによって強力的に抑制される。トロピセトロンの洗い流し(WASH)後、ニューロンの発火は回復する。

【図9A】図9は、L131G変異を有するキメラLGICに対するアゴニストの活性を示す。A) 未修飾7-GlyRキメラチャンネルに対して正規化した、既知のアゴニストに対するL131 LBD変異体についてのEC50のグラフ(対数目盛)。

【図9B】図9は、L131G変異を有するキメラLGICに対するアゴニストの活性を示す。B) 7^L1³1^G-GlyRキメラLGICに変異を有するチャンネルについてのAChおよびトロピセトロンについてのEC50のグラフ。

【図9C】図9は、L131G変異を有するキメラLGICに対するアゴニストの活性を示す。C) パレニクリンに対する高い効力および内因性リガンドであるアセチルコリン(ACh)に対する低い効力を有するチャンネルをもたらす突然変異が最適であることを示すグラフ(灰色の陰影)。Unmod: 未修飾の7-GlyRキメラLGIC。

【図9D】図9は、L131G変異を有するキメラLGICに対するアゴニストの活性を

10

20

30

40

50

示す。D) $7^L 13^1 G$ 、 $Q 13^9 L$ 、 $Y 21^7 F$ - Gly RキメラLGICを形質導入したマウス脳由来の皮質ニューロンの活動電位。ニューロンは電流注入(PRE)に反応して発火し、6倍を超える注入電流でも10nMバレニクリンによって強力に抑制される。トロピセトロンの洗い流し(WASH)後、ニューロンの発火は回復する。

【図10】図10は、LGICアゴニストの化学構造を示す。A) $7^Q 7^9 G$ 、 $Y 11^5 F$ 、 $G 17^5 K$ - Gly Rについての効力増強と最も適合する置換パターンを有するLGICアゴニストの化学構造。B) $7^L 13^1 G$ 、 $Q 13^9 L$ 、 $Y 21^7 F$ - Gly Rまたは $7^L 13^1 G$ 、 $Q 13^9 L$ 、 $Y 21^7 F$ - 5HT₃ HCに対する効力増強に最も適合する置換パターンを有するLGICアゴニストの化学構造。

【発明を実施するための形態】

【0026】

詳細な説明

本明細書は、修飾されたLGIC、およびそれを用いる方法を供する。例えば、本明細書は、LBDおよびIPDを有し、少なくとも1つの修飾アミノ酸(例えば、アミノ酸置換)を有する、少なくとも1つの修飾されたLGICサブユニットを含む修飾LGICを供する。特定の場合、修飾LGICはキメラLGICであり得る。例えば、キメラLGICは、第一のLGICからのLBDおよび第二のLGICからのIPDを含み得る。特定の場合、修飾アミノ酸は修飾LGICに薬理的選択性を付与することができる。例えば、修飾アミノ酸は、修飾LGICに外因性LGICリガンドの選択的結合を付与することができる。例えば、修飾アミノ酸は、修飾LGICに、未修飾LGICサブユニット(修飾を欠くLGICサブユニットおよび/または内因性LGICサブユニット)の結合の減少(最小化または排除)を付与することができる。例えば、修飾アミノ酸は、内在性LGICリガンドの結合の減少(最小化または排除)を修飾LGICに付与することができる。

【0027】

本明細書に提供される改変LGICは、例えば、チャネル障害(例えば、神経チャネル障害または筋肉チャネル障害)を治療するための方法において使用され得る。例えば、修飾LGIC、および修飾LGICに結合してそれを活性化することができる外因性LGICリガンドを、チャネル障害を有する哺乳動物を治療するために使用することができる。特定の場合、修飾LGICおよび外因性LGICリガンドは、哺乳動物の細胞の膜を横切るイオン輸送を調節(例えば、活性化または阻害)するのに用いることができる。特定の場合、修飾LGICおよび外因性LGICリガンドは、哺乳動物における細胞の興奮性を調節する(例えば、増加または減少させる)のに用いることができる。

【0028】

修飾LGIC

本明細書中に用いる場合、「修飾(された)」LGICは、少なくとも1つのLGICサブユニットを含むLGICである。修飾されたLGICサブユニットは、LBD中に少なくとも1つの改変アミノ酸(例えば、アミノ酸置換)および/またはIPD中に少なくとも1つの改変アミノ酸(例えば、アミノ酸置換)を含み得る。本明細書に記載の修飾LGICサブユニットは、任意の適切な種(例えば、ヒト、ラット、マウス、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヤギ、ブタ、またはサル)由来のLGICの改変であり得る。特定の場合、修飾LGICは、第一のLGIC由来のLBDと第二のLGIC由来のIPDとの非自然発生的な組み合わせを有する少なくとも1つのキメラLGICサブユニットを含み得る。

【0029】

修飾LGICは、ホモマー(例えば、任意の数の同じ修飾LGICサブユニットを有するもの)またはヘテロマー(例えば、少なくとも1つの修飾LGICサブユニットおよび任意の数の異なるLGICサブユニットを有するもの)であり得る。特定の場合、本明細書に記載の修飾LGICは、ホモマーの修飾LGICであり得る。本明細書に記載の修飾LGICは、任意の適切な数の修飾LGICサブユニットを含み得る。特定の場合、修飾LGICは、三量体、四量体、五量体、または六量体であり得る。例えば、本明細書に記

10

20

30

40

50

載の修飾 L G I C は五量体であり得る。

【 0 0 3 0 】

本明細書に記載の修飾 L G I C サブユニットは、任意の適切な L G I C の改変であり得る。L G I C は、リガンドの結合に応答して細胞膜を通してアニオン、カチオン、またはその両方を伝導することができる。例えば、L G I C は、リガンドの結合に応答して、細胞膜を通してナトリウム (Na⁺)、カリウム (K⁺)、カルシウム (Ca²⁺)、および/または塩化物 (Cl⁻) イオンを輸送することができる。L G I C の例としては、C y s - ループ受容体 (例えば、n A C h R (例えば、筋肉型 n A C h R または神経型 n A C h R) などの A C h R)、ガンマ - アミノ酪酸 (G A B A ; 例えば、G A B A_A および G A B A_A - (G A B A_cとも呼ばれる) 受容体、G l y R、G l u C l 受容体、および 5 H T 3 受容体)、イオンチャネル型グルタミン酸受容体 (i G l u R、たとえば、A M P A 受容体、カイニン酸受容体、N M D A 受容体、およびデルタ受容体)、A T P 依存性チャネル (たとえば、P 2 X)、ならびにホスファチジルイノシトール 4, 5 - ビスホスフェート (P I P 2) 依存性チャネルが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に記載の修飾 L G I C がキメラ L G I C である場合、キメラ L G I C は、任意の適切な L G I C から選択された L B D および任意の適切な L G I C から選択された I P D を含み得る。L G I C が複数の異なるサブユニットを含む場合 (例えば、ニューロン型 n A C h R が 4、2、および 7 サブユニットを含む場合)、L B D および/または I P D は任意のサブユニットから選択することができる。たとえば、n A C h R からの L B D は 7 L B D であり得る。(L B D および I P D の両方を含む) 代表的なラット 7 n A C h R アミノ酸配列は以下の通りである。

配列番号 : 1 2

MGGGRGGIWLALAAALLHVSLQGEFQRRLYKELVKNYNPLERPVANSDSQPLTVYFSLSLLLQI
MDVDEKNQVLTTNIWLQMSWTDHYLQWNMSEYPGVKNVRFDPGQIWKPDILLYNSADERFDA
TFHTNVLVNASGHCQYLPPGIFKSSCYIDVRWFPPDVQQCKLKFGSWSYGGWSLDLQMQEAD
ISSYIPNGEWDLMGIPGKRNEKFYECCKEYPDPVTTYTVTMRRTLYYGLNLLIPCVLISALA
LLVFLLPADSGEKISLGITVLLSLTVFMLLVAEIMPATSDSVPLIAQYFASTMIIVGLSVVV
TVIVLRYHHHDPDGGKMPKWTRIIILLNWCWFLRMKRPGEDKVRPACQHKPRRCSLASVELS
AGAGPPTSNGNLLYIGFRGLEGMHCAPT PDSGVVCGRLACSPHDEHLMHGAHPSDGDPLA
KILEEVRYIANRNRQCDESEVICSEWKFAACVVDPLCLMAFSVFTI ICTIGILMSAPNFVEA
VSKDFA

【 0 0 3 1 】

特定の場合、本明細書に記載の修飾 L G I C サブユニットは、7 n A C h R 由来の L B D を含み得る。7 n A C h R L B D の例としては、限定されるものではないが、配列番号 : 1 に記載のアミノ酸配列を有するヒト 7 n A C h R L B D、配列番号 : 2 に記載のアミノ酸配列を有するヒト 7 n A C h R L B D、および配列番号 : 1 1 に記載のアミノ酸配列を有するヒト 7 n A C h R L B D がある。特定の場合、7 n A C h R L B D は、配列番号 : 1、配列番号 : 2、または配列番号 : 1 1 に記載のヒト 7 n A C h R L B D のホモログ、オルソログ、またはパラログであり得る。特定の場合、7 n A C h R L B D は、配列番号 : 1、配列番号 : 2、または配列番号 : 1 1 に対して、少なくとも 7 5 % の配列同一性 (例えば、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 2 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 8 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 7 %、または少なくとも 9 9 % の配列同一性) を有し得る。

配列番号：1

MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQGEFQRKLYKELVKNYNPLERPVANDESQPLTVYFSLSLLLQI
 MDVDEKNQVLTNTNIWLQMSWTDHYLQWNVSEYPGVKTVRFPDQIWKPDILLYNSADERFDA
 TFHTNVLVNSSGHCQYLPPGIFKSSCYIDVRWFPPDVQHCKLKFGSWSYGGWSLDLQMQEAD
 ISGYIPNGEWDLVGIPGKRSERFYECCKEPYDPDVTFTV

配列番号：2

MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQGEFQRKLYKELVKNYNPLERPVANDESQPLTVYFSLSLLLQI
 MDVDEKNQVLTNTNIWLQMSWTDHYLQWNVSEYPGVKTVRFPDQIWKPDILLYNSADERFDA
 TFHTNVLVNSSGHCQYLPPGIFKSSCYIDVRWFPPDVQHCKLKFGSWSYGGWSLDLQMQEAD
 ISGYIPNGEWDLVGIPGKRSERFYECCKEPYDPDVTFTVTMRRR

10

配列番号：1 1

MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQGEFQRKLYKELVKNYNPLERPVANDESQPLTVYFSLSLLLQI
 MDVDEKNQVLTNTNIWLQMSWTDHYLQWNVSEYPGVKTVRFPDQIWKPDILLYNSADERFDA
 TFHTNVLVNSSGHCQYLPPGIFKSSCYIDVRWFPPDVQHCKLKFGSWSYGGWSLDLQMQEAD
 ISGYIPNGEWDLVGIPGKRSERFYECCKEPYDPDVTFTVTMRRRTLYY

20

【0032】

特定の場合、本明細書に記載の修飾 L G I C サブユニットは、5 H T 3 受容体由来の I P D を含み得る。5 H T 3 I P D の例としては、限定されないが、配列番号：3 に記載のアミノ酸配列を有するマウス 5 H T 3 I P D、および配列番号：4 に記載のアミノ酸配列を有するヒト 5 H T 3 I P D が挙げられる。特定の場合、5 H T 3 I P D は、配列番号：3 または配列番号：4 に記載の 5 H T 3 I P D のホモログ、オルソログ、またはパラログであり得る。特定の場合、5 H T 3 I P D は、配列番号：3 または配列番号：4 に対して、少なくとも 75% の配列同一性（例えば、少なくとも 80%、少なくとも 82%、少なくとも 85%、少なくとも 88%、少なくとも 90%、少なくとも 93%、少なくとも 95%、少なくとも 97%、または少なくとも 99% の配列同一性）を有し得る。

30

配列番号：3

IIRRRPLFYAVSLLLPSIFLMVVDIVGFCLPPDSGERVSKITLLLGYSVFLIIVSDTLPAT
 IGTPVIGVYFVVCMAALLVISLAETIFIVRLVHKQDLQRPVPDWRHLVLDRIAWILCLGEQP
 MAHRPPATFQANKTDDCSGSDLLPAMGNHCSHVGGPQDLEKTPRGRGSPLPPPREASLAVRG
 LLQELSSIRHFLEKRDEMREVARDWLRVGYVLDRLLEFRIYLLAVLAYSITLVTLWSIWHYS

40

配列番号：4

LFYVVSLLLLPSIFLMVMDIVGFYLPNSGERVSKITLLLGYSVFLIIVSDTLPATAIGTPL
 IGVYFVVCMAALLVISLAETIFIVRLVHKQDLQPPVPAWLRHLVLERIAWLLCLREQSTSQR
 PATSQATKTDDCSAMGNHCSHMGGPQDFEKSPDRCSPPPPPREASLAVCGLLQELSSIRQF
 LEKRDEIREVARDWLRVGSVLDKLLFHIYLLAVLAYSITLVMLWSIWQYA

50

【 0 0 3 3 】

特定の場合、本明細書に記載の修飾 L G I C サブユニットは、G l y R 由来の I P D を含み得る。G l y R I P D の例としては、限定されないが、配列番号：5 に記載のアミノ酸配列を有するマウス G l y R I P D が挙げられる。特定の場合、G l y R I P D は、配列番号：5 に記載のヒト G l y R I P D のホモログ、オルソログ、またはパラログであり得る。特定の場合、G l y R I P D は、配列番号：5 に対して、少なくとも 7 5 % の配列同一性（例えば、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 2 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 8 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 7 %、または少なくとも 9 9 % の配列同一性）を有し得る。

配列番号：5

MGYYLIQMYIPSLILVILSWISFWINMDAAPARVGLGITTTLTMTTQSSGSRASLPKVS YVK
AIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVNFVSRQHKE LLRFRRKRRHHKED EAGEGRFNFSAYGMGP
ACLQAKDGISVKGANNSTNTPPPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPM AFLIFNMF
YWIIYKIVRREDVHNQ

10

【 0 0 3 4 】

特定の場合、本明細書に記載の修飾 L G I C サブユニットは、G A B A 受容体由来の I P D（例えば、G A B A_A - 、G A B A_cとも呼ばれる）を含み得る。G A B A_A - I P D の例としては、限定されないが、配列番号：9 に記載のアミノ酸配列を有するヒト G A B A_A - I P D が挙げられる。特定の場合において、G A B A_A - I P D は、配列番号：9 に記載のヒト G A B A_A - I P D のホモログ、オルソログ、またはパラログであり得る。特定の場合において、G A B A_A - I P D は、配列番号：9 に対して、少なくとも 7 5 % の配列同一性（例えば、少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 2 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 8 8 %、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 7 %、または少なくとも 9 9 % の配列同一性）を有し得る。

20

配列番号：9

LLQTYFPATLMVMLSWSVFWIDRRVAVPARVPLGITTTLTMTSTIITGVNASMPRVSYIKAVDI
YLWVSFVFLSVLE YAAVN YLTTVQERKEQKLREKLPCTSGLP PPR TAML DGNYS DGEVND
LDNYMPENGEKPD RMMVQLTLASERS SPQRKSQRSSYVSMRIDTHAIDKYSRIIFPAAYILF
NLIYWSIFS

30

【 0 0 3 5 】

配列同一性の割合（パーセント）を計算する場合、2 つの配列を整列させ、そして、2 つの配列間のアミノ酸残基の同一の一致の数を決定する。同一の一致の数を整列した領域の長さ（すなわち整列させたアミノ酸残基の数）で割って、1 0 0 を掛けて配列同一性の割合の値を得る。整列させる領域の長さは、最も短い配列の全長サイズまでの一方または両方の配列の一部であり得ることが理解されよう。単一の配列が 2 つ以上の他の配列と整列し得、したがって、各整列領域にわたって異なる配列同一性の割合の値を有し得ることもまた理解される。配列同一性の割合を決定するための 2 つまたはそれを超える配列のアラインメントは、クエリーと 1 つまたは複数の対象配列との間の最良の一致を計算し、そして同一性、類似性および相違が決定できるようにそれらを整列させる、コンピュータプログラム C l u s t a l W およびデフォルトパラメーターを用いて行うことができる。例えば、Chenna et al., 2003, Nucleic Acids Res., 31(13):3497-500 を参照のこと。

40

【 0 0 3 6 】

本明細書に記載の修飾 L G I C サブユニットがキメラ L G I C サブユニットである場合、キメラ L G I C サブユニットは同じ種由来の L B D および I P D、または異なる種由来の L B D および I P D を含み得る。特定の場合、キメラ L G I C サブユニットは、ヒト L G I C タンパク質由来の L B D およびヒト L G I C タンパク質由来の I P D を含み得る。

50

例えば、キメラL G I Cサブユニットは、ヒト 7 L B DおよびヒトG l y R I P Dを含み得る。特定の場合、キメラL G I Cサブユニットは、ヒトL G I Cタンパク質由来のL B DおよびマウスL G I Cタンパク質由来のI P Dを含み得る。例えば、キメラL G I Cサブユニットは、ヒト 7 L B Dおよびマウス5 H T 3 I P Dを含み得る。

【0037】

本明細書に記載の修飾L G I CサブユニットがキメラL G I Cサブユニットである場合、キメラL G I Cサブユニットは、L B Dが異なるI P Dと融合してキメラチャンネルサブユニットを形成したときにL B D中のアミノ酸の数が異なり得るように、L B DとI P Dを接続する様々な融合点を含み得る。例えば、5 H T S I P Dを有するキメラL G I Cサブユニットを形成するのに用いられる 7 n A C h R L B Dの長さは、G l y R I P Dを有するキメラL G I Cサブユニットを形成するのに用いられる 7 n A C h R L B Dの長さとは異なる（例えば、図1 Aおよび図1 Cを図1 Bと比較のこと）。

【0038】

本明細書に記載の修飾L G I Cサブユニットは、少なくとも1つの修飾アミノ酸を有するL B Dおよび/または少なくとも1つの修飾アミノ酸を有するI P Dを含み得る。例えば、本明細書に記載の修飾L G I Cサブユニットは、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：11、または配列番号：12に対して少なくとも75%の配列同一性、ならびに、アミノ酸残基27、41、77、79、131、139、141、175、210、216、217、および/または219においてアミノ酸置換を有する 7 L B Dを含み得る。例えば、本明細書に記載の修飾L G I Cサブユニットは、配列番号：5に記載の配列と少なくとも75%の配列同一性、および、7 - G l y Rキメラ受容体（例えば、配列番号：7）のアミノ酸残基298のアミノ酸置換を有するG l y R I P Dを含み得る。例えば、本明細書に記載の修飾L G I Cサブユニットは、配列番号：9に対して少なくとも75%の配列同一性を有し、かつ、7 - G A B A cキメラ受容体（例えば、配列番号：10）のアミノ酸残基298においてアミノ酸置換を有するG A B A c I P Dを含み得る。特定の場合、本明細書に記載の修飾L G I Cサブユニットは、1を超える（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、またはそれ超）のアミノ酸修飾を含み得る。修飾はアミノ酸置換であり得る。特定の場合、修飾アミノ酸は、修飾L G I Cに薬理的選択性を付与することができる。例えば、修飾アミノ酸は、修飾L G I Cに外因性L G I Cリガンドの選択的結合を付与することができる。例えば、修飾アミノ酸は、修飾L G I Cに、未修飾L G I Cサブユニット（修飾を欠くL G I Cサブユニットおよび/または内因性L G I Cサブユニット）の結合の減少（最小化または排除）をもたらすことができる。例えば、修飾アミノ酸は、内因性L G I Cリガンドの結合の減少（最小化または排除）を修飾L G I Cに付与することができる。

【0039】

特定の態様では、本明細書に記載の修飾L G I Cサブユニットは、修飾L G I Cに外因性L G I Cリガンドとの選択的結合（例えば、増強された結合または増強された効力）を付与する少なくとも1つの修飾アミノ酸を含み得る。外因性L G I Cリガンドとの結合は、内因性L G I Cリガンドとの結合よりも選択的であり得る。外因性L G I Cリガンドとの選択的結合を有する修飾L G I Cサブユニットは、任意の適切なL D B（例えば、7 L B D）を含み得る。特定の態様では、修飾L G I Cサブユニットは、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：11、または配列番号：12に記載の 7 L B Dを含み得、アミノ酸修飾は、残基77、79、131、139、141、175、および/または216における置換であり得る。特定の場合において、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：11、または配列番号：12のアミノ酸残基77のトリプトファンは、疎水性アミノ酸残基、たとえば、フェニルアラニン（例えば、W77F）、チロシン（例えば、W77Y）、またはメチオニン（例えば、W77M）で置換することができる。例えば、本明細書に記載の修飾L G I Cサブユニットは、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：11、または配列番号：12に示され、かつW77F置換を有する、 7 L B Dを含み得る。特定の場合、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：11、または配列番号：12

10

20

30

40

50

のアミノ酸残基 79 のグルタミンは、アラニン（例えば、Q79A）、グリシン（例えば、Q79G）、またはセリン（例えば、Q79S）などのアミノ酸残基で置換することができる。例えば、本明細書に記載の改変 L G I C サブユニットは、Q79G置換を有する 7 L B D を含み得る。特定の場合、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：11、または配列番号：12 のアミノ酸残基 131 のロイシンは、アラニン（例えば、L131A）、グリシン（例えば、L131G）、メチオニン（例えば、L131M）、アスパラギン（例えば、L131N）、グルタミン（例えば、L131Q）、バリン（例えば、L131V）、またはフェニルアラニン（例えば、L131F）などのアミノ酸残基で置換することができる。特定の場合、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：11、または配列番号：12 のアミノ酸残基 175 位のグリシンは、リジン（例えば、G175K）、アラニン（例えば、G175A）、フェニルアラニン（例えば、G175F）、ヒスチジン（例えば、G175H）、メチオニン（例えば、G175M）、アルギニン（例えば、G175R）、セリン（例えば、G175S）、バリン（例えば、G175V）などのアミノ酸残基で置換することができる。特定の場合、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：11、または配列番号：12 のアミノ酸残基 216 のプロリンは、イソロイシン（例えば、P216I）などのアミノ酸残基で置換することができる。外因性 L G I C リガンドとの選択的結合を有する修飾 L G I C サブユニットは、任意の適切な I P D（例えば、G l y R I P D または G A B A_A - I P D）を含み得る。特定の態様では、修飾 L G I C サブユニットは、配列番号：5 に記載の G l y R I P D を含み得、そのアミノ酸修飾は、7 - G l y R キメラ受容体（例えば、配列番号：7）のアミノ酸残基 298 での置換であり得る。特定の場合、配列番号：7 のアミノ酸残基 298 のアラニンは、グリシン（例えば、A298G）などのアミノ酸残基で置換することができる。特定の態様では、修飾 L G I C サブユニットは、配列番号：9 に記載の G A B A_A - I P D を含み得、そのアミノ酸修飾は、7 - G A B A_A - キメラ受容体（例えば、配列番号：10）のアミノ酸残基 298 での置換であり得る。特定の場合、配列番号：10 のアミノ酸残基 298 のトリプトファンは、アラニン（例えば、W298A）などのアミノ酸残基と置換することができる。

【0040】

特定の場合、本明細書に記載の修飾 L G I C サブユニットは、2 つ以上（例えば、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、またはそれを超える数）のアミノ酸修飾を含み得る。例えば、本明細書に記載の修飾 L G I C サブユニットは、配列番号：7 に対して少なくとも 75 パーセントの配列同一性を有し得、そして、Q79G置換および A298G置換を含み得る。修飾 L G I C に外因性 L G I C リガンドの選択的結合を付与することができる修飾のさらなる例には、他に記載されている修飾が含まれる（例えば、米国特許第 8,435,762 号参照）。

【0041】

内因性（例えば、標準的な（canonical））L G I C リガンドよりも外因性 L G I C リガンドに選択的に結合する（例えば、結合の増強または効力の増加）修飾 L G I C サブユニットは、外因性リガンドの増強された効力を有するとしても記述され得る。特定の場合、外因性 L G I C リガンドに選択的に結合する本明細書に記載の修飾 L G I C サブユニットは、外因性リガンドに対して、少なくとも 4 倍（例えば、少なくとも 5 倍、少なくとも 6 倍、少なくとも 7 倍、少なくとも 8 倍、少なくとも 9 倍、少なくとも 10 倍、少なくとも 11 倍、少なくとも 12 倍、少なくとも 13 倍、少なくとも 14 倍、少なくとも 15 倍、少なくとも 16 倍、少なくとも 17 倍、少なくとも 18 倍、少なくとも 19 倍、または少なくとも 20 倍）の増強された効力を有し得る。特定の場合、外因性 L G I C リガンドに選択的に結合する本明細書に記載の修飾 L G I C サブユニットは、外因性リガンドに対して、約 4 倍～約 200 倍（例えば、約 4 倍～約 200 倍、約 5 倍～約 180 倍、約 6 倍～約 175 倍、約 7 倍～約 150 倍、約 8 倍～約 125 倍、約 9 倍～約 100 倍、約 10 倍～約 90 倍、約 11 倍～約 75 倍、約 12 倍～約 65 倍、約 13 倍～約 50 倍、約 14 倍～約 40 倍、または約 15 倍～約 30 倍）の増強された効力を有し得る。例えば、外因性 L G I C リガンドに選択的に結合する本明細書に記載の修飾 L G I C サブユニットは、

外因性リガンドに対して約10倍～約100倍の増強された効力を有し得る。例えば、外因性LGI Cリガンドに選択的に結合する本明細書に記載の修飾LGI Cサブユニットは、外因性リガンドに対して、約10倍～約20倍の増強された効力を有し得る。

【0042】

特定の態様では、本明細書に記載の修飾LGI Cサブユニットは、変更されていないLGI Cサブユニットとの減少した（例えば、最小化または排除された）結合を修飾LGI Cに付与する少なくとも1つの変更アミノ酸を含み得る。同じ修飾を有する修飾LGI Cサブユニットとの結合は、非修飾LGI Cサブユニットとの結合よりも選択的であり得る。未修飾LGI Cサブユニットは、修飾LGI Cに未修飾LGI Cサブユニットとの結合の減少を付与する修飾を欠如するLGI Cサブユニットであり得るか、または未修飾LGI Cは、内因性LGI Cサブユニットであり得る。修飾LGI Cに未修飾LGI Cサブユニットとの結合の減少を付与する修飾は、電荷反転修飾であり得る。非修飾LGI Cサブユニットとの結合が減少した修飾LGI Cサブユニットは、任意の適切なLBD（例えば、7 LBD）を含み得る。特定の態様では、修飾LGI Cサブユニットは、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：11、または配列番号：12に記載の7 LBDを含み得、アミノ酸修飾は、アミノ酸残基27および/または41における置換であり得る。例えば、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：11、または配列番号：12のアミノ酸残基27のアルギニンは、アスパラギン酸（例えば、R27D）で置換されていてもよい。例えば、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：11、または配列番号：12のアミノ酸残基41のグルタミン酸は、アルギニン（例えば、E41R）で置換することができる。特定の場 10
合、本明細書に記載の修飾LGI Cサブユニットは、R27D置換およびE41Rを有する7 LBDを含み得る。 20

【0043】

特定の態様では、本明細書に記載の修飾LGI Cサブユニットは、内因性LGI Cリガンドの結合の減少（例えば、最小化または排除）を修飾LGI Cに付与する少なくとも1つの修飾アミノ酸を含み得る。内因性LGI CリガンドはAChであり得る。内因性LGI Cリガンドの結合が減少した修飾LGI Cサブユニットは、任意の適切なIPD（例えば、GlyR LBD）を含み得る。例えば、修飾LGI Cサブユニットは、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：11、または配列番号：12に示される7 LBDを含み得、アミノ酸修飾は、アミノ酸残基115、131、139、210、217、および/または219における置換であり得る。特定の場 30
合において、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：11、または配列番号：12のアミノ酸残基115のチロシンは、フェニルアラニン（例えば、Y115F）で置換され得る。特定の場 40
合、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：11、または配列番号：12のアミノ酸残基131のロイシンは、アラニン（例えば、L131A）、グリシン（例えば、L131G）、メチオニン（例えば、L131M）、アスパラギン（例えば、L131N）、グルタミン（例えば、L131Q）、バリン（例えば、L131V）、またはフェニルアラニン（例えば、L131F）などのアミノ酸残基で置換することができる。特定の場 合、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：11、または配列番号：12のアミノ酸残基139のグルタミンは、グリシン（例えば、Q139G）またはロイシン（例えば、Q139L）で置換することができる。特定の場 40
合、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：11、または配列番号：12のアミノ酸残基210のチロシンは、フェニルアラニン（例えば、Y210F）で置換することができる。特定の場 合、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：11、または配列番号：12のアミノ酸残基217のチロシンは、フェニルアラニン（例えば、Y217F）で置換することができる。特定の場 合、配列番号：1、配列番号：2、配列番号：11、または配列番号：12のアミノ酸残基219のアスパラギン酸は、アラニン（例えば、D219A）で置換することができる。

【0044】

特定の態様では、本明細書に記載の修飾LGI Cサブユニットは、イオンコンダクタンスの増加を修飾LGI Cに付与する少なくとも1つの修飾アミノ酸を含み得る。特定の場 50

合、修飾 L G I C サブユニットは、配列番号：3 に示される 5 H T 3 I P D を含み得、アミノ酸改変は、アミノ酸残基 4 2 5、4 2 9、および/または 4 3 3 での置換であり得る。本明細書に記載の修飾 L G I C サブユニットは、R 4 2 5 Q 置換、R 4 2 9 D 置換、および R 4 3 3 A 置換を有する 5 H T 3 I P D を含み得る。特定の場合、修飾 L G I C サブユニットは、配列番号：4 に示される 5 H T 3 I P D を含み得、アミノ酸修飾は、アミノ酸残基 4 2 0、4 2 4、および/または 4 2 8 での置換であり得る。本明細書に記載の修飾 L G I C サブユニットは、R 4 2 0 Q 置換、R 4 2 4 D 置換、および R 4 2 8 A 置換を有する 5 H T 3 I P D を含み得る。

【0045】

特定の場合、本明細書に記載の修飾 L G I C は、Q 7 9 G アミノ酸置換および Y 1 1 5 F アミノ酸置換を伴う ヒト 7 n A C h R L B D (配列番号：1)、および マウス 5 H T 3 I P D (配列番号：3) を有する少なくとも1つのキメラ 7 - 5 H T 3 L G I C サブユニット (配列番号：6) を含み得る。

10

【0046】

特定の場合、本明細書に記載の修飾 L G I C は、Q 7 9 G アミノ酸置換および Q 1 3 9 G アミノ酸置換を伴う ヒト 7 n A C h R L B D (配列番号：1)、および マウス 5 H T 3 I P D (配列番号：3) を有する少なくとも1つのキメラ 7 - 5 H T 3 L G I C サブユニット (配列番号：6) を含み得る。

【0047】

特定の場合、本明細書に記載の修飾 L G I C は、Q 7 9 G アミノ酸置換および Y 1 1 5 F アミノ酸置換を有する ヒト 7 n A C h R L B D (配列番号：2)、および A 2 9 8 G アミノ酸置換を有する ヒト G l y R I P D (配列番号：5) を有する少なくとも1つのキメラ 7 - G l y R L G I C サブユニット (配列番号：7) を含み得る。

20

【0048】

特定の場合、本明細書に記載の修飾 L G I C は、Q 7 9 G アミノ酸置換および Q 1 3 9 G アミノ酸置換を有する ヒト 7 n A C h R L B D (配列番号：2)、および A 2 9 8 G アミノ酸置換を有する ヒト G l y R I P D (配列番号：5) を有する少なくとも1つのキメラ 7 - G l y R L G I C サブユニット (配列番号：7) を含み得る。

【0049】

特定の場合、本明細書に記載の修飾 L G I C は、R 2 7 D アミノ酸置換、E 4 1 R アミノ酸置換、Q 7 9 G アミノ酸置換、および Y 1 1 5 F アミノ酸置換を有する ヒト 7 n A C h R L B D (配列番号：2)、ならびに A 2 9 8 G アミノ酸置換を有する ヒト G l y R I P D (配列番号：5) を有する少なくとも1つのキメラ 7 - G l y R L G I C サブユニット (配列番号：7) を含み得る。

30

【0050】

特定の場合、本明細書に記載の修飾 L G I C は、アミノ酸残基 1 3 1 に置換 (たとえば、L 1 3 1 G、L 1 3 1 A、L 1 3 1 M、または L 1 3 1 N) を有する ヒト 7 n A C h R L B D (配列番号：2)、および ヒト G l y R I P D (配列番号：5) を有する少なくとも1つのキメラ 7 - G l y R L G I C サブユニット (配列番号：7) を含み得る。

40

【0051】

特定の場合、本明細書に記載の修飾 L G I C は、アミノ酸残基 1 3 1 (たとえば、L 1 3 1 G、L 1 3 1 A、L 1 3 1 M、または L 1 3 1 N) および Y 1 1 5 (たとえば、Y 1 1 5 F) に置換を有する ヒト 7 n A C h R L B D (配列番号：2)、および ヒト G l y R I P D (配列番号：5) を有する少なくとも1つのキメラ 7 - G l y R L G I C サブユニット (配列番号：7) を含み得る。

【0052】

特定の場合、本明細書に記載の修飾 L G I C は、アミノ酸残基 1 3 1 (たとえば、L 1 3 1 G、L 1 3 1 A、L 1 3 1 M、または L 1 3 1 N)、および 1 3 9 (例えば、Q 1 3 9 L) に置換を有する ヒト 7 n A C h R L B D (配列番号：2)、および ヒト G l y R I P D (配列番号：5) を有する少なくとも1つのキメラ 7 - G l y R L G I C サブユニット (配列番号：7) を含み得る。

50

y R I P D (配列番号：5)を有する少なくとも1つのキメラ 7 - G l y R L G I Cサブユニット(配列番号：7)を含み得る。

【0053】

特定の場合、本明細書に記載の修飾L G I Cは、アミノ酸残基131(たとえば、L131G、L131A、L131M、またはL131N)および217(たとえば、Y217F)に置換を有するヒト 7 n A C h R L B D(配列番号：2)、およびヒトG l y R I P D(配列番号：5)を有する少なくとも1つのキメラ 7 - G l y R L G I Cサブユニット(配列番号：7)を含み得る。

【0054】

特定の場合、本明細書に記載の修飾L G I Cは、アミノ酸残基131(例えば、L131G、L131A、L131M、またはL131N)、139(例えば、Q139L)、および217(例えば、Y217F)に置換を有するヒト 7 n A C h R L B D(配列番号：2)、およびヒトG l y R I P D(配列番号：5)を有する少なくとも1つのキメラ 7 - G l y R L G I Cサブユニット(配列番号：7)を含み得る。

10

【0055】

特定の場合、本明細書に記載の修飾L G I Cは、アミノ酸残基131(例えば、L131G、L131A、L131M、またはL131N)に置換を有するヒト 7 n A C h R L B D(配列番号：2)、およびヒト5 H T 3 I P D(配列番号：4)を有する少なくとも1つのキメラ 7 - 5 H T 3 L G I Cサブユニットを含み得る。

【0056】

特定の場合、本明細書に記載の修飾L G I Cは、アミノ酸残基175(たとえば、G175K)に置換を有するヒト 7 n A C h R L B D(配列番号：2)、およびヒトG l y R I P D(配列番号：5)を有する少なくとも1つのキメラ 7 - G l y R L G I Cサブユニット(配列番号：7)を含み得る。

20

【0057】

特定の場合、本明細書に記載の修飾L G I Cは、アミノ酸残基131(例えば、L131G、L131A、L131M、またはL131N)および139(例えば、Q139L)に置換を有するヒト 7 n A C h R L B D(配列番号：2)、ならびにR420Q置換、R424D置換、およびR428A置換を有するヒト5 H T 3 I P D(配列番号：4)を有する少なくとも1つのキメラ 7 - 5 H T 3 L G I Cサブユニットを含み得る。

30

【0058】

特定の場合、本明細書に記載の修飾L G I Cは、アミノ酸残基131(例えば、L131G、L131A、L131M、またはL131N)および139(例えば、Q139L)および217(例えば、Y217F)に置換を有するヒト 7 n A C h R L B D(配列番号：2)、ならびにR420Q置換、R424D置換、およびR428A置換を有するヒト5 H T 3 I P D(配列番号：4)を有する少なくとも1つのキメラ 7 - 5 H T 3 L G I Cサブユニットを含み得る。

【0059】

特定の場合、本明細書に記載の修飾L G I Cは、アミノ酸残基175(例えば、G175K)および115(例えば、Y115F)に置換を有するヒト 7 n A C h R L B D(配列番号：2)、ならびにヒトG l y R I P D(配列番号：5)を有する少なくとも1つのキメラ 7 - G l y R L G I Cサブユニット(配列番号：7)を含み得る。

40

【0060】

特定の場合、本明細書に記載の修飾L G I Cは、アミノ酸残基175(例えば、G175K)および115(例えば、Y115F)および79(例えば、Q79G)に置換を有するヒト 7 n A C h R L B D(配列番号：2)、ならびにヒトG l y R I P D(配列番号：5)を有する少なくとも1つのキメラ 7 - G l y R L G I Cサブユニット(配列番号：7)を含み得る。

【0061】

50

特定の場合、本明細書に記載の修飾 L G I C は、アミノ酸残基 175 (例えば、G175K) および 77 (例えば、W77F) および 79 (例えば、Q79G) に置換を有するヒト 7 n A C h R L B D (配列番号: 2)、ならびにヒト G l y R I P D (配列番号: 5) を有する少なくとも 1 つのキメラ 7 - G l y R L G I C サブユニット (配列番号: 7) を含み得る。

【0062】

特定の場合、本明細書に記載の修飾 L G I C は、アミノ酸残基 216 (例えば、P216I) に置換を有するヒト 7 n A C h R L B D (配列番号: 2)、およびヒト G l y R I P D (配列番号: 5) を有する少なくとも 1 つのキメラ 7 - G l y R L G I C サブユニット (配列番号: 7) を含み得る。

10

【0063】

特定の場合、本明細書に記載の修飾 L G I C は、アミノ酸残基 216 (例えば、P216I) および 79 (例えば、Q79G) に置換を有するヒト 7 n A C h R L B D (配列番号: 2)、およびヒト G l y R I P D (配列番号: 5) を有する少なくとも 1 つのキメラ 7 - G l y R L G I C サブユニット (配列番号: 7) を含み得る。

【0064】

特定の場合、本明細書に記載の修飾 L G I C は、アミノ酸残基 131 (例えば、L131A、L131G、L131M、L131N、L131Q、L131V、または L131F) に置換を有するヒト 7 n A C h R L B D (配列番号: 2)、およびヒト G A B A c I P D (配列番号: 9) を有する少なくとも 1 つのキメラ 7 - G l y R L G I C サブユニット (配列番号: 10) を含み得る。

20

【0065】

L B D および / または I P D が本明細書に記載の配列 (例えば、配列番号: 1 ~ 5 および / または 9) のホモログ (相同体)、オルソログ、またはパラログである場合、特定の修飾アミノ酸残基への言及は、ホモログ、オルソログ、またはパラログにおける対応するアミノ酸にシフトすることができることが理解される。例えば、配列番号: 3 に記載のマウス 5 H T 3 I P D の残基 425、429、および 433 は、配列番号: 4 に記載のヒト 5 H T 3 I P D における残基 420、424、および 428 に対応し、マウス 5 H T 3 I P D における R425Q、R429D、および R433A の置換は、ヒト 5 H T 3 I P D における R420Q、R424D、および R428A の置換に対応する。

30

【0066】

本明細書に記載の修飾 L G I C サブユニットを得るために任意の方法を使用することができる。特定の場合、本明細書に記載の修飾 L G I C サブユニットを作製するためにペプチド合成法を用いることができる。ペプチド合成の方法の例としては、液相ペプチド合成、および固相ペプチド合成が挙げられるが、これらに限定されない。特定の場合、本明細書に記載の修飾 L G I C サブユニットを作製するためにタンパク質生合成法を用いることができる。タンパク質生合成の方法の例としては、限定されないが、本明細書に提供されるリン酸化模倣ペプチドをコードする核酸の転写および / または翻訳が挙げられる。類似する修飾 L G I C サブユニット (例えば、本質的に同じ修飾を有するおよび / または本質的に同じアミノ酸配列を有する、修飾サブユニット) は、L B D 間の相互作用を通して自己集合して修飾 L G I C を形成するであろう。

40

【0067】

本明細書はまた、本明細書に記載の修飾 L G I C サブユニットをコードする核酸、ならびに、本明細書に記載の修飾 L G I C サブユニットをコードする核酸を発現するための構築物 (例えば、プラスミド、非ウイルスベクター、ウイルスベクター (例えば、アデノ随伴ウイルス、単純ヘルペスウイルス、またはレンチウイルスベクターなど)) も提供する。本明細書に記載の修飾 L G I C サブユニットをコードする核酸は、任意の適切なプロモーターに作用可能に連結することができる。プロモーターは、天然 (すなわち最小) プロモーターまたは複合プロモーターであり得る。プロモーターは、偏在性 (すなわち、構成的) プロモーターまたは調節プロモーター (例えば、誘導性、組織特異的、細胞型特異的

50

(例えば、ニューロン特異的、筋肉特異的、グリア特異的)、および神経サブタイプ特異的)であり得る。本明細書に記載の修飾L G I Cサブユニットをコードする核酸の発現を駆動するために使用することができるプロモーターの例には、これらに限らないが、シナプシン、C A M K I I、C M V、C A G、エノラーゼ、T R P V 1、P O M C、N P Y、A G R P、M C H、およびオレキシンプロモーターが含まれる。特定の場合、本明細書に記載の修飾L G I Cサブユニットをコードする核酸は、ニューロン特異的プロモーターに作用可能に連結することができる。

【0068】

本明細書はまた、本明細書に記載の修飾L G I Cを有する細胞(例えば、哺乳動物細胞)も提供する。本明細書に記載の修飾L G I Cを有する哺乳動物細胞は、任意の適切な方法によって得ることができる。特定の場合、予め組み立てられた修飾L G I Cを細胞に提供することができる。特定の場合、本明細書に記載の修飾L G I Cサブユニットをコードする核酸は、修飾L G I Cサブユニットが翻訳される条件下および複数(例えば、3、4、5、6、またはそれ超)の修飾L G I Cサブユニットを本明細書に記載の修飾L G I Cに組み立てることができる条件下で細胞に提供することができる。

10

【0069】

L G I Cリガンド

本明細書はまた、本明細書に記載の修飾L G I Cに結合してそれを活性化することができるL G I Cリガンドを提供する。本明細書に記載の修飾L G I Cに結合してそれを活性化することができるL G I Cリガンドは、外因性または内因性であり得る。本明細書に記載の修飾L G I Cに結合してそれを活性化することができるL G I Cリガンドは、自然発生のもので合成のものでよい。本明細書に記載の修飾L G I Cに結合し活性化することができるL G I Cリガンドは、標準的(canonical)または非標準的(non-canonical)であり得る。本明細書に記載の修飾L G I Cに結合してそれを活性化することができるL G I Cリガンドは、アゴニストまたはアンタゴニストであり得る。特定の場合、L G I Cリガンドは外因性L G I Cアゴニストである。L G I Cリガンドの例には、これらに限らないが、A C h、ニコチン、エピパタチン、シチシン、R S 5 6 8 1 2、トロピセトロン、ノルトピセトロン、P N U - 2 8 2 9 8 7、P H A - 5 4 3 6 1 3、化合物0 3 5 3、化合物0 3 5 4、化合物0 4 3 6、化合物0 6 7 6、化合物7 0 2、化合物7 2 3、化合物7 2 5、グラニセトロン、イベルメクチン、メキタジン、プロマジン、バレニクリン、化合物7 6 5、化合物7 7 0、3 - (1 , 4 - ジアザピシクロ[3 . 2 . 2] ノナン - 4 - イル) ジベンゾ[b , d] チオフェン5 , 5 - ジオキシド、化合物7 7 3、および化合物7 7 4が含まれる(例えば、図3 B、図5 C、図1 0 A、および図1 0 B参照)。

20

30

【0070】

本明細書に記載の修飾L G I Cに結合して活性化することができるL G I Cリガンドは、本明細書に記載の修飾L G I Cに対して選択的結合(例えば、増強された結合または増加された効力)を有し得る。特定の場合、本明細書に記載の修飾L G I Cに結合して活性化することができるL G I Cリガンドは、内因性受容体に結合せず、活性化しない。非修飾L G I Cリガンドに対するよりも本明細書に記載の修飾L G I Cに対して選択的に結合し活性化するL G I Cリガンド(例えば、修飾L G I Cに薬理的選択性を付与する少なくとも1つのアミノ酸修飾を有する修飾L G I C)は、修飾L G I Cのための増強された効力を有するものとして記述され得る。特定の場合、外因性L G I Cリガンドに選択的に結合する本明細書に記載の修飾L G I Cサブユニットは、修飾L G I Cに対して、少なくとも5倍(例えば、少なくとも10倍、少なくとも15倍、少なくとも20倍、少なくとも25倍、少なくとも30倍、少なくとも35倍、少なくとも40倍、少なくとも45倍、少なくとも50倍、少なくとも55倍、少なくとも60倍、少なくとも65倍、少なくとも70倍、少なくとも75倍、少なくとも80倍、少なくとも85倍、少なくとも95倍、少なくとも100倍、少なくとも125倍、少なくとも150倍、少なくとも200倍、少なくとも250倍、または少なくとも300倍)の増強された効力を有し得る。例えば、修飾L G I Cに選択的に結合し活性化するL G I Cリガンドは、修飾L G I Cに対

40

50

して、約10倍～約300倍（例えば、約10倍～約250倍、約10倍～約200倍、約10倍～約150倍、約10倍～約100倍、約25倍～約300倍、約50倍～約300倍、約100倍～約300倍、約200倍～約300倍、約25倍～約250倍、約50倍～約200倍、または約100倍～約150倍）の増強された効力を有し得る。特定の場合、本明細書に記載の修飾LGICに結合してそれを活性化するLGICリガンドは、25 nM未満（例えば、22 nM未満、20 nM未満、17 nM未満、15 nM未満、13 nM未満、12 nM未満、11 nM未満、10 nM未満、5 nM未満、2 nM未満、または1 nM未満）のリガンド効力を有し得る。例えば、本明細書に記載の修飾LGICに結合してそれを活性化するLGICリガンドは、15 nM未満のリガンド効力を有し得る。特定の場合、LGICリガンドは、本明細書に記載の修飾LGICサブユニットに対して、25 nM未満（例えば、22 nM未満、20 nM未満、17 nM未満、15 nM未満、13 nM未満、12 nM未満、11 nM未満、または10 nM未満）のEC50を有し得る。例えば、LGICリガンド（例えば、トロピセトロン）は、本明細書に記載の修飾LGICサブユニット（例えば、 $7^Q 7^9 G - GlyR^{A 2^9 8 G}$ ）について約11 nMのEC50を有し得る。例えば、LGICリガンド（例えば、ノルトロピセトロン）は、本明細書に記載の修飾LGICサブユニット（例えば、 $7^Q 7^9 G、Y 1 1 5 F - GlyR^{A 2^9 8 G}$ ）について約13 nMのEC50を有し得る。特定の場合、LGICリガンドは、本明細書に記載の修飾LGICサブユニットについて、20 μM超（例えば、22 μM超、25 μM超、35 μM超、50超、65 μM超、80 μM超、または100 μM超）のEC50を有し得る。例えば、LGICリガンド（例えば、ACh）は、本明細書に記載の修飾LGICサブユニット（例えば、 $7^Q 7^9 G、Y 1 1 5 F - GlyR^{A 2^9 8 G}$ ）について100 μMを超えるEC50を有し得る。

10

20

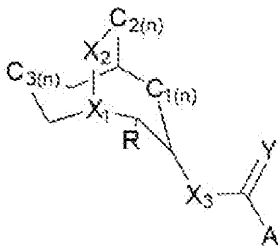
【0071】

特定の態様では、LGICリガンドは、本明細書に記載の修飾LGICに結合して活性化することができる合成リガンドとすることができ、キヌクリジン、トロパン、9 - アザピシクロ[3.3.1]ノナン、または2 - フェニル - 7, 8, 9, 10 - テトラヒドロ - 6H - 6, 10 - メタノアゼピノ[4, 5 - g]キノキサリンとすることができる。

【0072】

本明細書に記載の修飾LGICに結合し活性化し得るLGICリガンドは、式I：

30



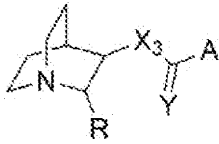
（式中、X1およびX2は独立してCH、CH2、O、NH、またはNMeであり得；各nは独立して0または1であり得；YはOまたはSであり得；Aは芳香族置換基であり得；RはHまたはピリジニルメチレンであり得る）

を有し得る。芳香族置換基の例には、限定するものではないが、4 - クロロ - ベンゼン、1H - インドール、4 - (トリフルオロメチル)ベンゼン、4 - クロロベンゼン、2, 5 - ジメトキシベンゼン、4 - クロロアニリン、アニリン、5 - (トリフルオロメチル)ピリジン - 2 - イル、6 - (トリフルオロメチル)ニコチン、および4 - クロロ - ベンゼンが含まれる。

40

【0073】

本明細書に記載の修飾LGICに結合してそれを活性化することができるLGICリガンドは、キヌクリジンであり得る。キヌクリジンは式II：



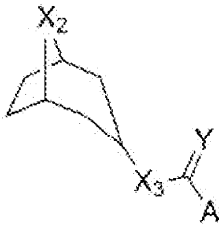
(式中、X₃は、O、NH、またはCH₂であり得；YはOまたはSであり得；Aは芳香族置換基であり得；RはHまたはピリジニルメチレンであり得る)

の構造を有し得る。芳香族置換基の例には、限定するものではないが、1H-インドール、4-(トリフルオロメチル)ベンゼン、4-クロロベンゼン、2,5-ジメトキシベンゼン、4-(トリフルオロメチル)ベンゼン、4-クロロアニリン、アニリン、5-(トリフルオロメチル)ピリジン-2-イル、6-(トリフルオロメチル)ニコチン、3-クロロ-4-フルオロベンゼン、4-クロロ-ベンゼン、および1H-インドールが含まれる。キヌクリジンの例としては、限定されないが、化合物PNU-282987、PHA-543613、0456、0434、0436、0354、0353、0295、0296、および0676が挙げられる(例えば、図5C、表3、および表6を参照)。

10

【0074】

本明細書に記載の修飾LGICに結合してそれを活性化することができるLGICリガンドは、トロパンであり得る。トロパンは式III:



20

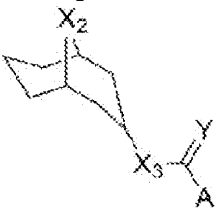
(式中、X₂はNHまたはNMeであり得；X₃は、O、NH、またはCH₂であり得；YはOまたはSであり得；Aは芳香族置換基であり得る)

の構造を有し得る。芳香族置換基の例には、これらに限定されないが、1H-インドール、7-メトキシ-1H-インドール、7-メチル-1H-インドール、5-クロロ-1H-インドール、および1H-インダゾールが含まれる。トロパンの例には、これらに限定されないが、トロピセトロン、疑似トロピセトロン、ノルトロピセトロン、化合物737、および化合物745が含まれる(例えば、図5C、表3、および表6を参照)。

30

【0075】

本明細書に記載の修飾LGICに結合してそれを活性化することができるLGICリガンドは、9-アザビシクロ[3.3.1]ノナンであり得る。9-アザビシクロ[3.3.1]ノナンは式IV:



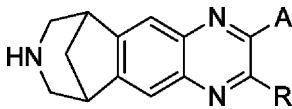
40

(式中、X₁はCHであり得、X₂はNHまたはNMeであり得、X₃はO、NH、またはCHであり得；YはOまたはSであり得；Aは芳香族置換基であり得る)

の構造を有し得る。芳香族置換基の例は、限定されないが、4-クロロ-ベンゼンである。9-アザビシクロ[3.3.1]ノナンの例としては、化合物0536、化合物0749、化合物0751、化合物0760、および化合物0763が挙げられるが、これらに限定されない(例えば、図5C、表3、および表6を参照)。

【0076】

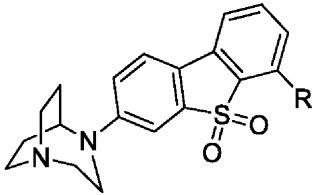
特定の場合、LGICリガンドは、6,7,8,9-テトラヒドロ-6,10-メタノ-6H-ピラジノ(2,3-h)ベンゾアゼピンであり得、式V:



(式中、RはHまたは CH_3 であり、AはHまたは芳香族置換基である)に示される構造を有し得る。6, 7, 8, 9 - テトラヒドロ - 6, 10 - メタノ - 6 H - ピラジノ (2, 3 - h) ベンズアゼピンの例としては、バレニクリン、化合物 0765、および化合物 0770 が挙げられるが、これらに限定されない (例えば、図 10 A、表 3、および表 9 を参照)。

【0077】

特定の場合、L G I C リガンドは 1, 4 - ジアザビシクロ [3 . 2 . 2] ノナンであり得、式 V I :



(式中、R = H、F、 NO_2)

に示される構造を有し得る。1, 4 - ジアザビシクロ [3 . 2 . 2] ノナンの例には、3 - (1, 4 - ジアザビシクロ [3 . 2 . 2] ノナン - 4 - イル) ジベンゾ [b, d] チオフェン 5, 5 - ジオキソド、化合物 0773、および化合物 0774 が含まれるが、これらに限定されない (例えば、図 10 B、表 6、および表 9 を参照)。

【0078】

使用の方法

本明細書はまた、本明細書に記載の修飾 L G I C および本明細書に記載の修飾 L G I C に結合して活性化することができる L G I C リガンドを用いる方法も供する。修飾 L G I C に結合して活性化することができる L G I C リガンドは、リガンドの送達に基づく時間的および / または空間的制御とともに、修飾 L G I C を活性化するために用いることができる。

【0079】

特定の態様では、本明細書に記載の修飾 L G I C および本明細書に記載の修飾 L G I C に結合して活性化することができる L G I C リガンドは、本明細書に記載の修飾 L G I C に選択的に結合するリガンドを同定するのに用いることができる。例えば、そのようなスクリーニング方法は、本明細書に記載の修飾 L G I C に 1 つまたは複数の候補リガンドを提供し、候補リガンドと修飾 L G I C との間の結合を検出することを含み得る。

【0080】

候補リガンドと修飾 L G I C との間の結合を検出するために任意の適切な方法を使用することができる。修飾 L G I C の活性を検出するために任意の適切な方法を使用することができる。例えば、リガンドが修飾 L G I C に結合して活性化する能力は、これらに限定されないが、膜電位 (M P) アッセイ (例えば、蛍光 M P アッセイ)、放射性結合アッセイ、および / またはピーク電流および持続電流の電圧クランプ測定を含むアッセイによって測定することができる。

【0081】

特定の態様では、本明細書に記載の修飾 L G I C および本明細書に記載の修飾 L G I C に結合して活性化することができる L G I C リガンドは、チャンネル障害 (例えば、神経チャンネル障害または筋肉チャンネル障害) を有する哺乳動物を治療するために使用することができる。例えば、チャンネル障害を有する哺乳動物は、本明細書に記載の修飾 L G I C を投与し、次いで、修飾 L G I C に結合して活性化することができる L G I C リガンドを投与することによって治療することができる。例えば、チャンネル障害を有する哺乳動物は、(例えば、R 27D アミノ酸置換、E 41R アミノ酸置換、Q 79G アミノ酸置換、および Y 115F アミノ酸置換を伴うヒト 7 n A C h R L B D (配列番号 : 2)、ならび

に A 2 9 8 G アミノ酸置換を有するヒト G l y R I P D (配列番号 : 5) を有する少なくとも 1 つのキメラ 7 - G l y R L G I C サブユニット (配列番号 : 6) を含む) 本明細書に記載の修飾 L G I C を投与し、次に、トロピセトロンを投与することによって治療することができる。例えば、チャンネル障害を有する哺乳動物は、L 1 3 1 アミノ酸置換 (例えば、L 1 3 1 G、L 1 3 1 A、L 1 3 1 M、または L 1 3 1 N)、ならびに、任意に、Q 7 9 S アミノ酸置換、Q 1 3 9 L アミノ酸置換、および / または Y 2 1 7 F アミノ酸置換を伴う、修飾ヒト 7 n A C h R L B D (例えば、配列番号 : 1、配列番号 : 2、配列番号 : 1 1、または配列番号 1 2) を含む本明細書に記載の修飾 L G I C を投与し、次に、パレニクリン、トロピセトロン、および / または化合物 7 6 5 を投与することにより治療することができる。

10

【 0 0 8 2 】

本明細書に記載の修飾 L G I C および本明細書に記載の修飾 L G I C に結合して活性化することができる L G I C リガンドを用いて、任意のタイプの哺乳動物を治療することができる。例えば、ヒト、およびサルなどの他の霊長類は、本明細書に記載の修飾 L G I C および本明細書に記載の修飾 L G I C に結合して活性化することができる L G I C リガンドを使用して治療することができる。特定の場合、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウサギ、マウス、およびラットを、本明細書に記載の修飾 L G I C および本明細書に記載の修飾 L G I C に結合して活性化することができる L G I C リガンドを使用して治療することができる。

20

【 0 0 8 3 】

任意の適切な方法を、チャンネル障害を有する哺乳動物および / またはチャンネル障害を発症する危険性がある哺乳動物を同定するのに用いることができる。例えば、遺伝子検査は、チャンネル障害を有する哺乳動物および / またはチャンネル障害を発症する危険性がある哺乳動物を同定するのに用いることができる。

30

【 0 0 8 4 】

チャンネル障害および / またはチャンネル障害を発症する危険性がある哺乳動物を有すると同定されたならば、その哺乳動物には、本明細書に記載の修飾 L G I C が投与され、または自己投与するように指示され、次に、本明細書に記載の修飾 L G I C に結合して活性化することができる L G I C リガンドが投与され、または自己投与するように指示され得る。本明細書に記載の修飾 L G I C および本明細書に記載の修飾 L G I C に結合して活性化することができる L G I C リガンドは、一緒に投与することができ、または別々に投与することができる。

40

【 0 0 8 5 】

本明細書に記載の材料および方法を用いて、チャンネル障害を有する哺乳動物および / またはチャンネル障害を発症する危険性がある哺乳動物を治療する場合、チャンネル障害は任意のチャンネル障害であり得る。本明細書中で使用される場合、チャンネル障害は、異常なイオンチャンネル機能および / または異常なリガンド機能によって引き起こされるか、または調節されたイオンチャンネル機能および / または改変された細胞イオンフラックス (例えば、カルシウムイオンフラックス) によって軽減され得る、任意の疾患または障害であり得る。チャンネル障害は、先天性または後天性であり得る。チャンネル障害の例としては、限定はしないが、パーター症候群、ブルガダ症候群、カテコールアミン作動性多形性心室頻拍 (C P V T)、先天性高インスリン血症、嚢胞性線維症、ドラベ症候群、一過性運動失調症、先端紅痛症、全般てんかん (たとえば、熱性発作を伴うもの)、家族性片麻痺性片頭痛、線維筋痛症、高カリウム血性周期性四肢麻痺、低カリウム血性周期性四肢麻痺、ランバート - イートン筋無力症候群、QT 延長症候群 (例えば、ロマノ - ワード症候群)、QT 短縮症候群、悪性高熱症、ムコリピド - シス IV 型、重症筋無力症、先天性ミオトニー、視神経脊髄炎、神経ミオトニー、非症候性難聴、先天性パラミオトニア、網膜色素変性症、チモシー症候群、耳鳴り、発作、三叉神経痛、および多発性硬化症が含まれる。あるいは、またはさらに、本明細書に記載の材料および方法は、これらに限らないが、疼痛治療、癌細胞治療、食欲制御、痙縮治療、筋ジストニア治療、振戦治療、および運動障害治療を含む

50

50

他の用途に使用することができる。

【0086】

特定の場合、本明細書に記載の修飾 L G I C および本明細書に記載の修飾 L G I C に結合して活性化することができる L G I C リガンドは、細胞の活性を調節するのに用いることができる。本明細書に記載の修飾 L G I C および本明細書に記載の修飾 L G I C に結合して活性化することができる L G I C リガンドを使用して調節される細胞の活性は、任意の細胞活性であり得る。細胞の活性の例としては、限定されないが、能動輸送（例えば、イオン輸送）、受動輸送、興奮、阻害、イオンフラックス（例えば、カルシウムイオンフラックス）、およびエキソサイトーシスが挙げられる。細胞活性は増加または減少し得る。例えば、本明細書に記載の修飾 L G I C および本明細書に記載の修飾 L G I C に結合して活性化することができる L G I C リガンドは、細胞の膜を通過するイオン輸送を調節する（例えば増加させる）のに用いることができる。例えば、本明細書に記載の修飾 L G I C および本明細書に記載の修飾 L G I C に結合してそれを活性化することができる L G I C リガンドは、細胞の興奮性を調節する（例えば増加させる）のに用いることができる。

10

【0087】

本明細書に記載の修飾 L G I C、および本明細書に記載の修飾 L G I C に結合して活性化することができる L G I C リガンドは、哺乳動物における任意のタイプの細胞の活性を調節するために使用することができる。細胞は、ニューロン、グリア細胞、筋細胞、免疫細胞（例えば、好中球、好酸球、好塩基球、リンパ球、および単球）、内分泌細胞、または幹細胞（例えば、胚性幹細胞）であり得る。特定の場合、細胞は興奮性細胞であり得る。細胞はインビボまたはエクスピボであり得る。

20

【0088】

本明細書に記載の修飾 L G I C は、任意の適切な方法により投与することができる。修飾 L G I C は、修飾 L G I C サブユニットとして、または予め組み立てられた修飾 L G I C として投与することができる。修飾 L G I C は、修飾 L G I C をコードする核酸として投与することができる。修飾 L G I C は、本明細書に記載の修飾 L G I C サブユニットをコードする核酸として投与することができる。例えば、核酸は、裸の核酸として、または任意の適切なベクター（例えば、組換えベクター）を用いて送達することができる。ベクターは、DNA ベースのベクター、RNA ベース、またはそれらの組み合わせであり得る。ベクターは、分裂細胞または非分裂細胞において核酸を発現することができる。組換えベクターの例としては、これらに限らないが、プラスミド、ウイルスベクター（例えば、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、および単純ヘルペスベクター）、コスミド、および人工染色体（例えば、酵母人工染色体または細菌人工染色体）が挙げられる。特定の場合、本明細書に記載の修飾 L G I C サブユニットをコードする核酸は、アデノ随伴ウイルスベクターによって発現させることができる。

30

【0089】

本明細書に記載の修飾 L G I C は、任意の適切な方法によって（例えば、細胞内でのその存在を確認するために）検出することができる。特定の場合、修飾 L G I C を選択的に結合する剤を、修飾 L G I C を検出するのに用いることができる。本明細書に記載の修飾 L G I C に結合するために使用することができる剤の例としては、これらに限らないが、抗体、タンパク質（例えば、ブンガロトキシン）、および小分子リガンド（例えば、PET リガンド）が挙げられる。修飾 L G I C に選択的に結合する作用物質は、検出可能な標識（例えば、蛍光標識、放射性標識、陽電子放出標識、および酵素標識）を含み得る。細胞内の L G I C 発現を検出するための方法は、蛍光イメージング、オートラジオグラフィ、機能的 MRI、PET、および SPECT を含み得る。

40

【0090】

本明細書に記載の修飾 L G I C および本明細書に記載の修飾 L G I C に結合して活性化することができる L G I C リガンドは、チャネル障害を治療するために用いられる 1 つまたは複数の追加の剤 / 治療法との併用療法として、チャネル障害を有するおよび / または

50

チャンネル障害を発症するリスクがある哺乳動物に投与することができる。例えば、本明細書に記載されるようなチャンネル障害を有する哺乳動物を治療するために使用される併用療法は、本明細書に記載の修飾 L G I C および本明細書に記載の修飾 L G I C に結合して活性化することができる L G I C リガンドを投与し、そして、アセタゾールアミド、ジクロロフェナミド、メキシリチン、グルコース、グルコン酸カルシウム、L - D O P A、筋肉刺激、脊髄刺激、脳刺激、および / または神経刺激で治療することを含み得る。

【 0 0 9 1 】

本明細書に記載の修飾 L G I C および本明細書に記載の修飾 L G I C に結合して活性化することができる L G I C リガンドを、チャンネル障害を治療するために使用される追加の剤 / 療法と組み合わせて使用する実施形態では、1つまたは複数の追加の剤を、同じ時間に、または独立して、投与することができる。例えば、本明細書に記載の修飾 L G I C および本明細書に記載の修飾 L G I C に結合して活性化することができる L G I C リガンドを最初に、1つまたは複数の追加の剤を次に、投与することができ、または逆を行うことができる。本明細書に記載の修飾 L G I C および本明細書に記載の修飾 L G I C に結合して活性化することができる L G I C リガンドが、チャンネル障害を治療するために使用される1つまたは複数の追加の治療と組み合わせて使用される実施形態では、1つまたは複数の追加の治療は本明細書に記載の修飾 L G I C および本明細書に記載の修飾 L G I C に結合して活性化することができる L G I C リガンドの投与と同時に、または独立して、行うことができる。例えば、本明細書に記載の修飾 L G I C および本明細書に記載の修飾 L G I C に結合して活性化することができる L G I C リガンドは、1つまたは複数の追加の治療を行う前、その間、またはその後投与することができる。

10

20

【 0 0 9 2 】

特定の場合、本明細書に記載の修飾 L G I C および / または本明細書に記載の修飾 L G I C に結合して活性化することができる L G I C リガンドは、チャンネル障害を有するまたはチャンネル障害を発症する危険性のある哺乳動物への投与のための薬学的に許容可能な組成物に処方され得る。例えば、本明細書に記載の修飾 L G I C (例えば、本明細書に記載の修飾 L G I C をコードする核酸) および / または本明細書に記載の修飾 L G I C に結合して活性化することができる L G I C リガンドの治療有効量は、1つまたは複数の薬学的に許容可能な担体 (添加剤) および / または希釈剤と一緒に処方され得る。薬学的組成物は、これらに限らないが、無菌溶液、懸濁液、徐放性製剤、錠剤、カプセル、ピル、パウダー、および顆粒を含む、固体または液体形態で投与するために製剤化することができる。

30

【 0 0 9 3 】

本明細書に記載の薬学的組成物に使用できる薬学的に許容可能な担体、充填剤、およびビヒクルとしては、これらに限らないが、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、ヒト血清アルブミンなどの血清タンパク質、リン酸などの緩衝物質、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウム、飽和植物性脂肪酸の部分グリセリド混合物、水、塩または電解質、例えば硫酸プロタミン、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイド状シリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロース系物質、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリレート、ワックス、ポリエチレン - ポリオキシプロピレン - ブロックポリマー、ポリエチレングリコールおよび羊毛脂肪が挙げられる。

40

【 0 0 9 4 】

本明細書に記載の修飾 L G I C および / または本明細書に記載の修飾 L G I C に結合して活性化することができる L G I C リガンドを含む薬学的組成物は、経口、非経口 (皮下、頭蓋内、動脈内、筋肉内、静脈内、冠動脈内、皮内、または局所投与を含む)、または吸入投与のためにデザインすることができる。経口投与する場合、治療有効量の本明細書に記載の修飾 L G I C (例えば、本明細書に記載の修飾 L G I C をコードする核酸) および / または本明細書に記載の修飾 L G I C に結合し活性化できる L G I C リガンドを含む薬学的組成物は、丸剤、錠剤、またはカプセル剤の形態であり得る。非経口投与に適した

50

組成物には、酸化防止剤、緩衝剤、静菌剤、および製剤を意図するレシピエントの血液と等張にする溶質を含み得る水性および非水性の滅菌注射溶液、ならびに懸濁剤および増粘剤を含み得る水性および非水性の滅菌懸濁液が含まれる。吸入用組成物は、例えば、吸入器、ネブライザー、および/または乾燥粉末吸入器を用いて送達することができる。製剤は、単位用量または複数用量の容器、例えば密封アンプルおよびバイアルに入れて提供することができる、使用直前に、滅菌液体担体、例えば注射用水の添加のみを必要とする凍結乾燥（凍結乾燥）状態で保存することができる。即席注射溶液および懸濁液は、滅菌粉末、顆粒、および錠剤から調製することができる。

【0095】

治療有効量の本明細書に記載の修飾 L G I C（例えば、本明細書に記載の修飾 L G I C をコードする核酸）および/または本明細書に記載の修飾 L G I C に結合し活性化し得る L G I C リガンドを含む薬学的に許容可能な組成物は、局所的にまたは全身的に投与することができる。特定の場合、治療有効量の本明細書に記載の修飾 L G I C（例えば、本明細書に記載の修飾 L G I C をコードする核酸）および/または本明細書に記載の修飾 L G I C に結合し活性化し得る L G I C リガンドを含む組成物は、哺乳動物（例えば、ヒト）への静脈内もしくは経口投与、またはそれによる吸入によって全身的に投与することができる。特定の場合、治療有効量の本明細書に記載の修飾 L G I C（例えば、本明細書に記載の修飾 L G I C をコードする核酸）および/または本明細書に記載の修飾 L G I C に結合し活性化し得る L G I C リガンドを含む組成物は、哺乳動物（例えばヒト）の標的組織への経皮、皮下、筋肉内、頭蓋内、または開放外科的投与（例えば注射）により局所的に投与することができる。

10

20

【0096】

有効量は、チャンネル障害の重症度、投与経路、対象の年齢および一般的健康状態、賦形剤の使用、他の薬剤の使用などの他の治療的処置との併用の可能性、ならびに治療する医師の判断に応じて変わり得る。

【0097】

投与の頻度は、哺乳動物に対して有意な毒性を生じさせることなく、チャンネル障害の症状を改善する任意の頻度であり得る。例えば、投与の頻度は、週に約1回から日に約3回、月に約2回から日に約6回、または週に約2回から日に約1回であり得る。投与の頻度は、一定のままであり得るか、または治療期間中可変であり得る。治療有効量の本明細書に記載の修飾 L G I C（例えば、本明細書に記載の修飾 L G I C をコードする核酸）および/または本明細書に記載の修飾 L G I C に結合し活性化することができる L G I C リガンドを含む組成物による治療の過程は休息期間を含み得る。例えば、治療有効量の本明細書に記載の修飾 L G I C（例えば、本明細書に記載の修飾 L G I C をコードする核酸）および/または本明細書に記載の修飾 L G I C に結合し活性化することができる L G I C リガンドを含む組成物は、2週間にわたって毎日、投与することができ、その後2週間の休息期間をおくことができ、そのようなレジメンは複数回繰り返すことができる。有効量と同様に、様々な要因が特定の用途に使用される実際の投与頻度に影響を及ぼし得る。例えば、有効量、治療期間、複数の治療剤の使用、投与経路、およびチャンネル障害の重症度は、投与頻度の増加または減少を必要とし得る。

30

40

【0098】

治療有効量の本明細書に記載の修飾 L G I C（例えば、本明細書に記載の修飾 L G I C をコードする核酸）および/または本明細書に記載の修飾 L G I C に結合して活性化できる L G I C リガンドを含む組成物を投与する有効期間は、哺乳動物に有意な毒性を生じることなく、チャンネル障害の症状を改善する任意の期間である。例えば、有効期間は、数日から数週間、数ヶ月、または数年まで変わり得る。特定の場合において、チャンネル障害の治療のための有効期間は、約1ヶ月から約10年の期間の範囲であり得る。特定の治療に使用される実際の有効期間には、複数の要因が影響する。例えば、有効期間は、投与の頻度、有効量、複数の治療剤の使用、投与経路、および治療されているチャンネル障害の重症度によって異なり得る。

50

【 0 0 9 9 】

特定の例において、治療の経過およびチャネル障害について治療されている哺乳動物の症状を監視することができる。チャネル障害の症状を監視するために任意の適切な方法を使用することができる。

【 0 1 0 0 】

以下の例において本発明をさらに説明するが、これらの例は特許請求の範囲に記載の発明の範囲を限定するものではない。

【実施例】

【 0 1 0 1 】

実施例 1：効力増強リガンド結合ドメイン変異

ニコチン性受容体アゴニストと化学的類似性を有する 5 1 の臨床的に使用される薬物のパネルに対して、突然変異 L B D を有する 4 1 の $\alpha 7 - 5 H T 3$ キメラチャネルのパネルを用いてスクリーニングを実施した。突然変異は、図 1 で強調された残基にある。スクリーンは、既知の $n A C h R$ アゴニストトロピセトロンに対して効力を増強する $\alpha 7 n A C h R$ L B D 中の $G 1 n 7 9$ における突然変異を明らかにした (図 2)。これらの変異 ($Q 7 9 A$ 、 $Q 7 9 G$ 、 $Q 7 9 S$) はアミノ酸側鎖のサイズを減少させる。いくつかの変異型イオンチャネル - リガンドの組み合わせは、効力において最大 1 2 倍の改善を与えた (表 1、図 3)。標準的な $\alpha 7 n A C h R$ アゴニスト、A C h、ニコチン、エピバチジン、および禁煙薬バレニクリンは、 $Q 7 9 A$ 、 $Q 7 9 G$ 、または $Q 7 9 S$ の変異によって有意な影響を受けなかった。しかしながら、 $\alpha 7 n A C h R$ アゴニストのサブセットは、いくつかの変異で増強された効力を示した。シチシン、R S 5 6 8 1 2、トロピセトロン、ノルトロピセトロン、および P N U - 2 8 2 9 8 7 は、 $\alpha 7 Q 7 9 G - 5 H T 3$ について有意に改善された効力を示した。さらに、ノルトロピセトロンおよび P N U - 2 8 2 9 8 7 は、それぞれ、 $\alpha 7 Q 7 9 A - 5 H T 3$ および $\alpha 7 Q 7 9 S - 5 H T 3$ について有意に増強された効力を示した。一般に、リガンド結合ドメインの相補的結合面と相互作用する結合した芳香族構造を有するキヌクリジンまたはトロパンファーマコフォアに基づくアゴニストは、より小さいアミノ酸残基 Ala、Gly、または Ser との $G 1 n 7 9$ 置換で改善された効力を示した。ほとんどのアゴニストにとって、 $\alpha 7 Q 7 9 G - 5 H T 3$ が最も好ましい変異体キメライオンチャネルであった。

【 0 1 0 2 】

(表 1) H E K 細胞において $G 1 n 7 9$ で変異したキメラカチオンチャネルに対する $n A C h R$ アゴニストの効力。平均 $E C 5 0$ 、括弧内の S E M (μM)。

アゴニスト	$\alpha 7 - 5 H T 3$	$\alpha 7^{Q79A} - 5 H T 3$	$\alpha 7^{Q79G} - 5 H T 3$	$\alpha 7^{Q79S} - 5 H T 3$
アセチルコリン	7.0 (0.8)	9.2 (1.8)	6.7 (0.6)	6.2 (1.4)
ニコチン	3.9 (0.4)	4.1 (1.3)	3.1 (0.5)	2.1 (0.4)
エピバチジン	0.053 (0.006)	0.067 (0.022)	0.050 (0.008)	0.044 (0.006)
バレニクリン	0.92 (0.16)	0.76 (0.21)	0.91 (0.12)	0.47 (0.07)
シチシン	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)
トロピセトロン	0.24 (0.03)	0.08 (0.02)	0.035 (0.002)	0.11 (0.02)
ノルトロピセトロン	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)

【 0 1 0 3 】

これらの突然変異 L B D を、これらのリガンドのほとんどについて最大 6 倍まで増強された効力を有する $\alpha 7 - G 1 y R$ キメラチャネルを生成するために用いた (図 4 A)。 $\alpha 7 - 5 H T 3$ の変異と同様に、 $G 1 n 7 9$ におけるこれらの変異は、A C h、ニコチン、エピバチジン、バレニクリン、またはシチシンの効力に有意な影響を及ぼさなかった。しかしながら、トロピセトロン、ノルトロピセトロン、および R S 5 6 8 1 2 は、 $\alpha 7 Q 7 9 G - G 1 y R$ に対して有意に増強された効力を示した。 $\alpha 7 - 5 H T 3$ に対する L B D

突然変異と同様に、ノルトロピセトロンは γ^{Q79A} - GlyR に対して有意に増強された効力を有し、PNU-282987は γ^{Q79S} - GlyR に対して有意に増強された効力を示した。ほとんどのアゴニストにとって、 γ^{Q79G} - GlyR が最も好ましい変異型キメライオンチャンネルであった。

【0104】

小分子スクリーニングにおいて観察された別の関係は、Trp77での突然変異が γ^{W77F} - 5HT3 (EC50: 1.2 μ M)、 γ^{W77Y} - 5HT3 (EC50: 1.1 μ M)、および γ^{W77F} - GlyR (EC50: 0.66 μ M) 受容体で薬剤グラニセトロンに対するアゴニスト活性を与えたということであった。グラニセトロンは5HT3受容体アンタゴニスト・グラニセトロンであり、これは γ - 5HT3または γ - GlyRを活性化しない。

10

【0105】

これらの結果は、 γ nAChR LBD中のQ79の(A、G、またはSへの)変異が、既知のLGICリガンドの修飾LGICへの結合を増強したことを示す。

【0106】

実施例2：効力増強イオン細孔ドメイン変異

全長グリシン受容体チャンネルにおいて以前に確立されたIPD突然変異を有する γ - GlyRチャンネル(T258SおよびA288G、GlyRナンバリング； γ - GlyRナンバリングについてT268SおよびA298Gと同等)を、アロステリックアゴニストイベルメクチンについての増強された効力について検査した。 γ - GlyR^{T268S}を有するチャンネルは実質的にリガンド・フリー・オープン確率を有することが見出され、それはそれらを細胞のリガンド制御の操作に不適當なものにする。全長グリシン受容体でのイベルメクチン効力を増強するために有効であった γ - GlyR^{A298G}での突然変異は、リガンドの非存在下でオープン確率の適度な変化をもたらした。従って、このチャンネルを、既知のアゴニストのパネルに対する活性について検査した。標準アゴニストACh、ニコチン、およびエピバチジンについて、ならびにバレニクリンおよびトロピセトロンについて、 γ - GlyR^{A298G}においてアゴニスト効力は有意に増強されなかった。 γ nAChRアゴニストのサブセットは、効力において中程度の4倍の増加までを示した：RS56812、シチシン、PNU-282987、およびノルトロピセトロンは有意により強力であった。それゆえ、IPD A298G突然変異の効果はリガンド効力を改善したが、リガンド構造に依存して、LBDにおける突然変異ほど効果的ではなかった。

20

30

【0107】

γ - GlyRについてのLBD中のQ79G変異およびA298G IPD変異を検査した(表2)。二重変異体キメラチャンネル、 γ^{Q79G} - GlyR^{A298G}は、 γ nAChRアゴニストに対して、 γ - GlyRに対して最大18倍の効力の増強を示す効力の相乗的増強をもたらした。この二重変異体チャンネルからの増強は、アゴニストRS56812、トロピセトロン、ノルトロピセトロン、およびPNU-282987についての個々の変異からの増強よりも大きかった。この変異の組み合わせの予期されない構造的感受性をさらに強調すると、ACh、ニコチン、エピバチジン、バレニクリン、およびシチシンなどの複数のアゴニストは、 γ - GlyRと γ^{Q79G} - GlyR^{A298G}との間で有意に変化しなかった。したがって、LBD突然変異Q79GのIPD突然変異A298Gとの組み合わせは、全てではないがいくつかのニコチン性アゴニストについての効力が約10~20倍まで大幅に増加した相乗効果をもたらした。

40

【0108】

(表2)変異型キメラクロライドチャンネルに対するnAChRアゴニストの効力。キメラチャンネルを発現するHEK細胞におけるアゴニスト活性についての平均EC50および括弧内のSEM(μ M)。

アゴニスト	$\alpha 7$ GlyR	$\alpha 7^{Q79A}$ -GlyR	$\alpha 7^{Q79G}$ -GlyR	$\alpha 7^{Q79S}$ -GlyR	$\alpha 7$ -GlyR ^{A298G}	$\alpha 7^{Q79G}$ - GlyR ^{A298G}
アセチルコリン	6.4 (1.2)	7.6 (1.7)	7.1 (1.2)	4.5 (1.2)	6.4 (1.8)	4.8 (0.5)
ニコチン	5.0 (1.8)	2.6 (0.7)	4.1 (0.3)	1.4 (0.4)	3.1 (1.8)	2.2 (0.6)
エピバチジン	0.062 (0.021)	0.038 (0.005)	0.069 (0.011)	0.024 (0.003)	0.018 (0.001)	0.032 (0.007)
バレニクリン	0.62 (0.2)	0.48 (0.08)	1.1 (0.25)	0.28 (0.06)	0.25 (0.04)	0.33 (0.08)
シチシン	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)
トロピセトロン	0.15 (0.045)	0.044 (0.008)	0.038 (0.003)	0.040 (0.009)	0.065 (0.026)	0.011 (0.002)
ノルトロピセトロン	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)

10

【 0 1 0 9 】

これらの結果は、 $\alpha 7$ nAChR LBD中のQ79の(A、G、またはSへの)突然変異および/またはGlyR IPD中のA298の(Gへの)突然変異が、修飾LGICへの既知のLGICリガンドの選択的結合をさらに増強したことを示す。

【 0 1 1 0 】

実施例3：増強された効力を示す分子

$\alpha 7^{Q79G}$ -GlyR^{A298G}で増強された効力を示した既知のアゴニストの構造活性相関に基づいて、1つまたは複数の芳香族側鎖置換基を有する、キヌクリジン、トロパン、または9-アザピシクロ[3.3.1]ノナンファルマコフォアのいずれかからなる種々の合成分子をテストした。さらに、既知の $\alpha 7$ nAChRアゴニストPHA-543613 (Walker et al 2006, Wishka et al 2006)もテストし、 $\alpha 7^{Q79G}$ -GlyR^{A298G}に対して例外的な効力を示した。これらの分子は一般に10倍~100倍の増強された効力を示し(表3)、このことは、これらのファーマコフォアについては、特定範囲の構造的特徴が $\alpha 7^{Q79G}$ -GlyR^{A298G}の改善された効力と両立することを示す。

20

【 0 1 1 1 】

これらの結果は、修飾LGICが合成キヌクリジン含有およびトロパン含有LGICリガンドによって活性化され得ることを示す。

30

【 0 1 1 2 】

(表3)キメラチャネルに対する化合物の効力。キメラチャネルを発現するHEK細胞におけるアゴニスト活性についての平均EC50および括弧内のSEM(μ M)。part i a lとは、部分アゴニスト活性をいう。

化合物	X ₁	X ₂	X ₃	Y	C _{1n}	C _{2n}	C _{3n}	C-X 配置	R	A	α7-5HT3 EC ₅₀ (μM)	α7-GlyR EC ₅₀ (μM)	α7 ^{Q79G} -GlyR ^{A298G} EC ₅₀ (μM)
PNU-282987	N	CH ₂	NH	O	0	1	0	R	H	4-クロロベンゼン	0.22	0.13	0.007
トロピセトロン	C	NMe	O	O	1	0	0	エンド	H	1H-インドール	0.24	0.15	0.011
類似 トロピセトロン	C	NMe	O	O	1	0	0	エキソ	H	1H-インドール	2	0.7	<0.2
ノルトロピセ トロン	C	NH	O	O	1	0	0	エンド	H	1H-インドール	0.061	0.022	0.002
PHA-543613	N	CH ₂	NH	O	0	1	0	R	H	フロ[2,3]ピリジン	0.046	0.039	0.004
0542	C	NMe	NH	S	1	0	0	エンド	H	1H-インドール	3.8	0.58	0.072
0026	N	CH ₂	O	O	0	1	0	S	H	4-(トリフルオロ メチル)ベンゼン	--	13.7	1.43
0456	N	CH ₂	CH ₂ - NH	S	0	1	0	混合	H	4-クロロベンゼン	--	2.8	0.47
0434	N	CH ₂	NH	O	0	1	0	混合	H	2,5-ジメトキシ ベンゼン	> 10	> 10	0.19
0436	N	CH ₂	NH	O	0	1	0	混合	H	4-(トリフルオロ メチル)ベンゼン	0.84	0.31	0.006
0354	N	CH ₂	NH	S	0	1	0	R	H	4-クロロアニリン	1.4 partial	1.0	0.03
0353	N	CH ₂	NH	O	0	1	0	S	H	アニリン	0.65	0.27	0.01
0295	N	CH ₂	NH	O	0	1	0	S	H	5-(トリフルオロメチル) ピリジン-2-イル	> 100	> 100	4.6
0296	N	CH ₂	NH	O	0	1	0	S	H	6-(トリフルオロメチル) ニコチン	> 100	--	0.45
0536	C	NMe	NH	S	1	0	1	エンド	H	4-クロロベンゼン	>33	>100	9.1
0676	N	CH ₂	NH	O	0	1	0	S	H	1H-インドール	0.03	0.018	0.002

10

20

30

40

50

【 0 1 1 3 】

実施例 4 : アセチルコリン応答性を低下させる突然変異

7 nAChRは、他のnAChRアイソフォームと比較してAChに対する感受性が相対的に低く、トロパンおよびキヌクリジンリガンドについての効力増強突然変異は、

これらのチャンネルでのアセチルコリンの効力を実質的に変化させなかった。したがって、これらのチャンネルのアセチルコリン応答性を低下させるためにキメラチャンネルをさらに修飾した。追加のLBD変異Y115FおよびQ139Gでは特定の場合にアセチルコリン応答性が100 μMを超えてかなり低下し、 $\alpha 7^{Q79G, Y115F} - 5HT3$ 、 $\alpha 7^{Q79G, Q139G} - 5HT3$ 、 $\alpha 7^{Q79G, Q139G} - GlyR^{A298G}$ 、 $\alpha 7^{Q79G, Y115F} - GlyR^{A298G}$ については特定のアゴニストの効力を控えめに低下させたただけであった。たとえば、 $\alpha 7^{Q79G, Y115F} - GlyR^{A298G}$ は、ノルトロピセトロンについて13 nM、AChについて100 μM超のEC50を有する(表4)。

【0114】

(表4) 低いアセチルコリン応答性を有する変異キメラクロライドチャンネルに対するnAChRアゴニストの効力。キメラチャンネルを発現するHEK細胞における活性についての平均EC50および括弧内のSEM(μM)。

	$\alpha 7^{Q79G, Y115F} - 5HT3$	$\alpha 7^{Q79G, Q139G} - 5HT3$	$\alpha 7^{Q79G, Y115F} - GlyR^{A298G}$	$\alpha 7^{Q79G, Q139G} - GlyR^{A298G}$	$\alpha 7^{R27D, E41R, Q79G, Y115F} - GlyR^{A298G}$
アセチルコリン	>100	36 (2)	>100	73 (27)	>100
ニコチン	34 (4)	24 (4)	22 (3)	30 (8)	7.5 (1.3)
トロピセトロン	0.10 (0.12)	0.31 (0.06)	0.086 (0.043)	0.26 (0.04)	0.035 (0.021)
ノルトロピセトロン	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)

【0115】

これらの結果は、 $\alpha 7$ nAChR LBDにおけるY115Fおよび/またはQ139G変異が、内在性LGICリガンドAChの修飾LGICへの結合を減少させたことを示している。

【0116】

実施例5：内因性受容体サブユニットとの会合を減少させる突然変異

$\alpha 7$ nAChRのアセンブリーは、LBD間の相互作用を介する5つのホモメリックサブユニットの会合に基づく(Celie et al 2004 Neuron 41: 907-14)。内因性 $\alpha 7$ nAChRサブユニットとの望ましくない会合および/またはキメラチャンネルの望ましくない会合を最小限にするために、アセチルコリン結合タンパク質の結晶構造を検査し、 $\alpha 7$ nAChR受容体LBD中の相同なイオン性アミノ酸も有する反対の電荷を有する近くのサブユニット間残基を同定することによって、潜在的なサブユニット間架橋を同定した。電荷反転突然変異(潜在的な塩橋の酸性のメンバーを塩基性残基に、その塩基性パートナーを酸性残基に切り替える)を、未修飾サブユニットとのサブユニット間相互作用を妨害するが、電荷反転突然変異を有するサブユニット間の相互作用を保持するようにデザインした(図6A)。電荷反転変異を有するキメラLGICサブユニットは、未修飾のチャンネル、例えば、内因性 $\alpha 7$ nAChRと相互作用することなく互いに選択的に会合することができた。 $\alpha 7$ nAChR LBDにおけるR27D、E41Rの二重変異は、機能的チャンネルをもたらした(図6B)。これらの電荷反転チャンネルの、未修飾配列を有する $\alpha 7 - 5HT3$ チャンネルとの同時発現は、電荷反転サブユニットが未修飾チャンネルと共免疫沈降しないことを示した(図6C)。キメラチャンネル $\alpha 7^{R27D, E41R, Q79G, Y115F} - GlyR^{A298G}$ を得るための効力増強変異およびアセチルコリン遮断変異との組み合わせは、いくつかのアゴニストがそれらの同族アゴニストに対して高い効力を保持していることを明らかにした(表4、右欄)。

【0117】

これらの結果は、 $\alpha 7$ nAChR LBDにおけるR27DおよびE41R変異が、修飾LGICサブユニットの、他の修飾および/または内因性LGICサブユニットとの

10

20

30

40

50

会合を減少させたことを示している。

【0118】

実施例6：リガンド効力を増加させるLBD突然変異

7 - GlyRキメラチャネル中の 7 nAChR LBDの Gly¹⁷⁵ および Pro²¹⁶ における突然変異を試験した。Gly¹⁷⁵ の Lys への変異 (7^{G175K} - GlyR) は、AChに対する効力の増大を示した (5倍) (表5)。 7^{G175K} - GlyR については、ニコチン効力が未修飾 7 - GlyRキメラチャネルと比較して10倍増強されたことも見出された (表5)。Pro²¹⁶ の Ile への変異 (7^{P216I} - GlyR) はACh効力を実質的に変化させなかった (表5)。しかしながら、 7^{P216I} - GlyR は、未修飾 7 - GlyRと比較して4倍超まで増加したニコチン効力を示した (表5)。 7^{G175K} - GlyR および 7^{P216I} - GlyR におけるこれらの効力増強突然変異はまた、30倍までのいくつかの他の 7 - GlyR アゴニストの効力にも影響を及ぼした (表5)。 7^{G175K} - GlyR については、臨床的に使用されている薬トロピセトロン、バレニクリン、シチシン、グラニセトロン、およびエピパチジンについて、 7 - GlyR よりも10倍超高い効力増強が見られた。 7^{P216I} - GlyR については、効力増強は約3倍であった (表5)。

10

【0119】

(表5) a 7 GlyRキメラチャネルにおける G175K および P216I 変異によるアゴニスト効力増強。

化合物	$\alpha 7$ 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 G175K Y210F	$\alpha 7$ GlyR W77F G175K Y210F	$\alpha 7$ GlyR W77F G175K Y210F	$\alpha 7$ GlyR Q79G Y115F G175K K322L	$\alpha 7$ GlyR Q79G Y115F G175K L141F	$\alpha 7$ GlyR Q79G Y115F G175K Q139L G175K
アセチルコリン	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
ニコチン	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
エピバチジン	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
バレニクリン	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
シチシン	6.4 (2.0)	0.4 (0.05)	1.9 (0.2)	7.1 (1.2)	> 10	1.5 (0.6)	2.5 (1.1)	6.9 (1.2)	4.02	5.1	> 10	> 30	> 30	4.74	3.24
PNU-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
トロピセトロン	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
ノルトロピセ トロン	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
PHA-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
グラニセトロン	> 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
イベルメクチン		nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.21	nd	nd	nd	nd

10

20

30

40

nd = 決定せず

【 0 1 2 0 】

AChを産生する生物における使用のため、7 nAChR LBDから構成されるこれらのチャンネルにおいて内因性ACh効力を低下させることが重要である。変異G175K

50

は、Y115FおよびY210FなどのAChに対する感受性を低下させる他の変異とさらに組み合わせることができた。7^{Y115F}、G^{175K}-GlyRについては、トロピセトロン、グラニセトロン、ノルトロピセトロン、PNU-282987、およびPHA-543613について、トロパンまたはキヌクリジンコア構造に基づくアゴニストに対する高い効力が見られ、パレニクリンおよびシチシンに対する効力が大幅に低下した(表5)。

7^{G175K}、Y^{210F}-GlyRについて、ほとんどのアゴニストについての効力がかなり低下したが、グラニセトロンについての効力増強が観察された(表5)。

【0121】

低下したACh応答性を有するが他のアゴニストに対する高い効力を有するチャンネルを開発するために、7^{G175K}-GlyRを、特定のアゴニストの効力を増加させるさらなる突然変異と組み合わせた。W77Fとの組み合わせはACh効力を減少させ、7^{W77F}、G^{175K}-GlyRは、グラニセトロン、ノルトピセトロン、およびトロピセトロンについて7-GlyRよりも増加した効力を示したが、PNU282-987、パレニクリン、シチシン、またはPHA-543613についてはそうでなかった(表5)。G^{175K}のQ79Gとの組み合わせはACh効力を低下させ、7^{Q79G}、G^{175K}-GlyRは、ノルトロピセトロン、PHA-543613、およびトロピセトロンについて効力の増加を示した(表5)。しかしながら、この効力増強は、PNU282-987、またはパレニクリンなどの他のアゴニストについては観察されなかった。

7^{G175K}、Q^{139L}-GlyRは、ACh効力を減少させ、ノルトロピセトロンおよびトロピセトロンについて効力を増加させた(表5)。

【0122】

W77F、Q79G、L141F、Y115F、G175K、およびY210Fにおける変異を様々な組み合わせで組み込むことによって、トロパンおよびキヌクリジンコア構造に基づくものを含む、合成アゴニストに関して高い効力を維持しながら、ACh効力のさらなる低下が達成された。7^{Q79G}、Y^{115F}、G^{175K}-GlyRは、トロピセトロンに対する強力な応答を維持しながらACh応答性を低下させた(表5)。これらの変異はまた、7^{Y115F}、G^{175K}-GlyRと比較して、ならびに(内因性

7^{nAChR}活性を代表する)7-5HT3と比較して、他のトロパンおよびキヌクリジンコア構造、特にキヌクリジンチオウレア702および703、ならびにトロパンエステル723、725、726、736、737、738、および745に対する応答性も増強した(表6)。7^{Q79G}、Y^{115F}、G^{175K}-GlyRもイベルメクチンに対して高い感受性を示した(表5)。7^{W77F}、Q^{79G}、G^{175K}-GlyRは、トロピセトロンおよびノルトロピセトロンに対する高い効力応答を維持しながらACh応答性を低下させた(表5)。7^{W77F}、Q^{79G}、G^{175K}-GlyRはまた、化合物723および725、ならびに臨床的に使用される薬物メキタジンおよびプロマジンなどのさらなるトロパンベースのコア構造に対して増強された効力を示した(表6)。7^{W77F}、G^{175K}、Y^{210F}-GlyRはACh応答性を低下させたが、グラニセトロンに対する効力を著しく向上させた(表5)。7^{L141F}、Y^{115F}、G^{175K}-GlyRは、グラニセトロンに対する感受性を付与しながらACh応答性を低下させた(表5)。7^{Q79G}、Q^{139L}、G^{175K}-GlyRはACh応答性を低下させたが、ノルトロピセトロンに対して強力な応答を示した(表5)。

【0123】

(表6)G^{175K}およびP^{216I}7GlyRキメラチャンネルによる、トロパン、キヌクリジンアゴニスト、9-アザピシクロ[3.3.1]ノナンアゴニスト、ジアザピシクロ[3.2.2]ノナンアゴニスト、およびプロマジンの効力増強。3位に結合したインドールおよびインダゾール芳香族(A)置換基。

10

20

30

40

アゴニスト クラス	X ₁	X ₂	X ₃	Y	C _{1n}	C _{2n}	C _{3n}	C _{3n}	置換基	芳香族置換基 (A)	化合物	α7- 5HT3	α7-GlyR	α7GlyR G175K	α7GlyR Q79G G175K	α7GlyR Y115F G175K	α7Gly Q79G G175K Y115F	α7GlyR Q79G G175K Y115F R27D E41R	α7GlyR W77F Q79G G175K
キヌクリジン	N	CH ₂	NH	S	0	1	0	0	R	3,5-ジクロロ-ア-ニリン	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)	nd
キヌクリジン	N	CH ₂	NH	S	0	1	0	0	R	3,4-ジクロロ-ア-ニリン	682	>100	0.2	0.12 (0.1)	0.013 (0.001)	0.40 (0.01)	0.13 (0.01)	0.06 (0.012)	nd
キヌクリジン	N	CH ₂	NH	S	0	1	0	0	R	4-(トリフルオロ メトキシ)ア-ニリン	684	>100	1.6	0.23 (0.02)	0.078 (0.022)	3.0 (0.3)	0.79 (0.04)	0.4 (0.03)	nd
キヌクリジン	N	CH ₂	NH	S	0	1	0	0	R	4-フルオロア-ニリン	699	2.8	3.6	0.26 (0.11)	0.039 (0.009)	2.9	0.52 (0.09)	0.33 (0.1)	nd
キヌクリジン	N	CH ₂	NH	S	0	1	0	0	R	3-クロロ-ア-ニリン	700	1.8	1.9	0.081 (0.009)	0.012 (0.0002)	1.5	0.21 (0.04)	0.11 (0.02)	nd
キヌクリジン	N	CH ₂	NH	S	0	1	0	0	R	3-クロロ-2- フルオロア-ニリン	701	>100	nd	0.47 (0.17)	0.086 (0.014)	5.46	1.0 (0.2)	0.58 (0.03)	nd
キヌクリジン	N	CH ₂	NH	S	0	1	0	0	R	3-クロロ-4- フルオロア-ニリン	702	>100	0.9	0.12 (0.004)	0.018 (0.003)	1.6	0.17 (0.03)	0.12 (0.02)	nd
キヌクリジン	N	CH ₂	NH	S	0	1	0	0	R	5-クロロ-2- フルオロア-ニリン	703	>100	nd	0.52 (0.08)	0.03 (0.01)	12.7	1.2 (0.06)	1.1 (0.5)	nd
キヌクリジン	N	CH ₂	NH	S	0	1	0	0	R	3-クロロ-4- メチルア-ニリン	704	0.7	nd	0.062 (0.008)	0.018 (0.002)	0.76 (0.01)	0.24 (0.02)	0.18 (0.06)	nd
キヌクリジン	N	CH ₂	NH	S	0	1	0	0	R	5-クロロ-2- メチルア-ニリン	705	>100	nd	9.6	0.67 (0.14)	>10	4.8 (1.4)	4.5 (2.7)	nd
キヌクリジン	N	CH ₂	NH	S	0	1	0	0	S	4-(トリフルオロ メトキシ)ア-ニリン	713	>100	nd	2.1 (0.2)	0.54 (0.06)	>10	23.9	>10	nd
トロパミン	C	NMe	NH	S	1	0	0	0	エン ド	1-メチル-1H- インドール	622	>100	nd	0.87	1.3 (0.2)	2.5 (0.4)	0.93 (0.02)	1.0 (0.2)	1.7
トロパミン	C	NMe	O	O	1	0	0	0	エン ド	4-メトキシ-1H- インドール	721	0.5	nd	0.027 (0)	0.015 (0.003)	0.080 (0.002)	0.020 (0.001)	0.016 (0.001)	0.04
トロパミン	C	NMe	O	O	1	0	0	0	エン ド	6-メトキシ-1H- インドール	722	0.5	nd	0.02 (0.001)	0.015 (0)	0.052 (0.008)	0.028 (0.008)	0.016 (0.001)	0.03
トロパミン	C	NMe	O	O	1	0	0	0	エン ド	7-メトキシ-1H- インドール	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

10

20

30

40

トロパシ	C	NMe	O	O	1	0	0	0	0	0	0	1.2	nd	0.036 (0.003)	0.012 (0.002)	0.091 (0.013)	0.02 (0.006)	0.012 (0.002)	0.06
トロパシ	C	NMe	O	O	1	0	0	0	0	0	0	12.2	8.1		0.022 (0.02)	0.069 (0.33)	0.042 (0.005)	0.022 (0.0001)	0.024
トロパシ	C	NMe	O	O	1	0	0	0	0	0	0	4.2	nd	0.58 (0.24)	0.016 (0.001)	0.51 (0.37)	0.044 (0.006)	0.018 (0)	0.03
トロパシ	C	NMe	O	O	1	0	0	0	0	0	0	0.83	nd	0.2 (0.01)	0.044 (0.002)	0.57 (0.21)	0.078 (0.018)	0.078 (0.024)	0.06
トロパシ	C	NMe	O	O	1	0	0	0	0	0	0	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
トロパシ	C	NMe	O	O	1	0	0	0	0	0	0	0.4	nd	0.015 (0)	0.016 (0.002)	0.04 (0.014)	0.025 (0.002)	0.012 (0.001)	0.033
トロパシ	C	NMe	O	O	1	0	0	0	0	0	0	1.2	1.3	0.069	0.026 (0.002)	0.26 (0.03)	0.089 (0.024)	0.043 (0.014)	0.05
9- アザピシクロ [3.3.1]ノナン	CH	NMe	NH	O	1	0	1	0	0	0	0	6.6	nd	nd	nd	nd	1.3	nd	1.9
9- アザピシクロ [3.3.1]ノナン	CH	NMe	NH	O	1	0	1	0	0	0	0	1.8	3.4	nd	nd	nd	3.2	nd	0.7
9- アザピシクロ [3.3.1]ノナン	CH	NMe	NH	O	1	0	1	0	0	0	0	>100	9.8	nd	nd	nd	3	nd	1.3
9- アザピシクロ [3.3.1]ノナン	CH	NH	O	O	1	0	1	0	0	0	0	1.9	0.17	nd	nd	nd	0.3	nd	0.2
1,4- ジアザピシクロ [3.2.2]ノナン												0.135	0.001	nd	nd	0.0003	0.00042	nd	0.0014
1,4- ジアザピシクロ [3.2.2]ノナン												0.03	0.006	nd	nd	0.00078	0.03	nd	0.03
キヌクリジン	N	CH ₂	CH ₂	R	0	1	0	0	0	0	>30	nd	nd	nd	nd	nd	>10	nd	0.15
N,N-ジメチル プロピル アミン											>100	nd	nd	nd	nd	nd	>100	nd	1.6

nd = 決定せず ; 括弧 : SEM

【 0 1 2 4 】

7 G 1 7 5 K - G 1 y R および 7 P 2 1 6 I - G 1 y R は、Q 7 9 G、Y 1 1 5 F、
および G 1 7 5 K での変異と共に、非致命変異 R 2 7 D、E 4 1 R、ならびに、グラニ

10

20

30

40

50

セトロン、エピバチジン、パレニクリン、シチシン、PNU-282987、トロピセトロン、ノルトロピセトロン、およびPHA-543613に対するリガンド効力をさらに増強したGlyR IPD変異A298Gとも適合した(表7)。7^{R27D}、E41^R、Q79^G、Y115^F、G175^Kを形成するための非会合変異との組み合わせは、低いACh応答性で、702、723、725、および726についての効力をさらに改善した(表6)。

【0125】

(表7) 7GlyRキメラチャネルでのG175KおよびA298G変異ならびに7GABAc(GABA_Aとも呼ばれる)チャネルでのW298Aによるアゴニスト効力増強。

化合物	α7GlyR Q79G W77F A298G	α7GlyR Q79G G175K A298G	α7GlyR Q79G A298G G175K Y115F	α7GlyR Q79G A298G P216I	α7GlyR Q79G A298G Y115F K395 K396A	a7GABAc Q79G L141F W298A	α7GlyR Q79G G175K Y115F R27D,E41R	α7GlyR R27D E41R Q79G Y115F
アセチルコリン	45	0.66	31	5	90	52	52 (7.7)	> 500
ニコチン	3.8	0.11	3.3	1.6	16.5	16.2	4.8 (0.4)	> 39.8
エピバチジン	0.37	0.0023	0.011	0.05	0.15	0.42	0.059 (0.03)	0.267
パレニクリン	3.66	0.022	2.37	0.18	> 30	6.27	4.9 (0.3)	> 30
シチシン	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
トロピセトロン	0.018	0.0006	0.0028	0.009	0.021	0.111	0.013 (0.005)	> 0.096
ノルトロピセトロン	0.0024	0.00013	0.0084	0.0012	0.0063	0.009	0.003 (0.001)	0.102
PHA-543613	0.0066	0.00018	0.0039	0.003	0.0408	0.039	0.0054	0.156
グラニセトロン	1.2	nd	nd	nd	> 30	> 100	2.4 (0.3)	> 30

nd = 決定せず ; 括弧 : SEM

【0126】

7^{Y115F}-GlyRキメラチャネルにおける7nAChRLBDのGly¹⁷⁵でのさらなるアミノ酸置換もまた、アゴニスト効力を増強した。7^{Y115F}-GlyRキメラチャネルにおけるトロピセトロンの効力は、G175A(7.1倍)、G175F(2倍)、G175H(2.3倍)、G175K(5.6倍)、G175M(2.6倍)、G175R(5.8倍)、G175S(9.3倍)、G175V(16.7倍)を含む、追加の突然変異で増強された。

【0127】

(表8) 7GlyR Y115FキメラチャネルにおけるG175突然変異によるアゴニスト効力増強。

化合物	a7GlyR	α7GlyR Y115F G175K	α7GlyR Y115F G175A	α7GlyR Y115F G175F	α7GlyR Y115F G175H	α7GlyR Y115F G175M	α7GlyR Y115F G175R	α7GlyR Y115F G175S	α7GlyR Y115F G175V
アセチルコリン	6.4 (1.2)	52 (6.6)	24	67	79	71	29.5	31.5	15
パレニクリン	0.62 (0.2)	5.0 (1.7)	5.9	13.6	12.7	14.1	7.6	9.7	4.6
トロピセトロン	0.15 (0.045)	0.027 (0.004)	0.021	0.074	0.064	0.057	0.024	0.016	0.009
PHA-543613	0.03 (0.01)	0.02 (0.007)	0.027	0.173	0.12	0.25	0.11	0.12	0.037

nd = 決定せず ; 括弧 : SEM

【0128】

より小さなアミノ酸へのLeu¹³¹の突然変異は、標準的(カノニカル)アゴニスト

10

20

30

40

50

AChおよびニコチンの効力を低下させる一方、バレニクリン、トロピセトロンおよびいくつかの他のアゴニストの効力を著しく増加させることが見出された。 7^{L131A} -GlyRおよび 7^{L131G} -GlyRは、ACh応答性を減少させ(6倍)、そしてバレニクリン(それぞれ8倍および17倍)およびトロピセトロン(それぞれ2.5倍および3.6倍)に対する効力を増強した(表9)。 7^{L131G} -5HT3 HCは、ACh応答性を低下させ(5倍)、そしてバレニクリン(16倍)およびトロピセトロン(2.3倍)に対する効力を増強した(図9Aおよび表9)。 7^{L131G} 、 $Q139L$ -GlyRおよび 7^{L131G} 、 $Y217F$ -GlyRは、バレニクリンについては 7 -GlyRに対して同様の効力増強を示した(21倍)が、ACh感受性も減少させた(それぞれ-11倍および-13倍)。 7^{Q79S} 、 $L131G$ -GlyRは、バレニクリン(89倍)およびトロピセトロン(15倍)について 7 -GlyRよりも効力をさらに改善した。 7^{L131G} 、 $Q139L$ 、 $Y217F$ -GlyRは、バレニクリンについて 7 -GlyRよりも効力の最大の改善を示し(387倍)、そしてまたACh効力の減少も示した(13倍)(図9Bおよび表9)。 7^{L131G} 、 $Q139L$ 、 $Y217F$ -GlyRもまた、化合物770(0.001 μ M)、化合物773(0.00034 μ M)、および化合物774(0.00013 μ M)について極めて高い効力を示した(図10)。 7^{Q79S} 、 $L131G$ 、 $Q139L$ -GlyRはまた、バレニクリン(31倍)およびトロピセトロン(3倍)について 7 -GlyRよりも効力を改善したが、ACh効力(9倍)は低下した(図9Bおよび表9)。 7^{L131M} -GlyR、 7^{L131Q} -GlyR、および 7^{L131V} -GlyRは、ACh力価を低下させたが、トロピセトロン、ノルトロピセトロン、PHA-543613、およびグラニセトロンに対する効力を増強した(表9)。 7^{L131F} -GlyRは、ACh効力を実質的に低下させることが見出されたが、他のアゴニストについての力価を改善しなかった(表8)。 7^{L131G} -GABA_Acは、ACh効力を実質的に低下させたが、他のアゴニストについての効力を改善しなかった(表9)。 7^{L131G} 、 $Q139L$ 、 $Y217F$ -5HT3 HC(表9)は、 7 -5HT3よりもバレニクリンの効力を131倍改善した(表1)。 7^{L131G} 、 $Q139L$ 、 $Y217F$ -5HT3 HCもまた、化合物770(0.007 μ M)、化合物773(0.002 μ M)、および化合物774(0.004 μ M)について高い効力を示した(表8)。

10

20

30

【0129】

(表9) L131変異を有するキメラチャンネルによるアゴニスト効力増強。

化合物	a7GlyR	a7GlyR L131A	a7GlyR L131G	a7GlyR L131G Q139L Y217F	a7GlyR L131G Q139L Y217F	a7GlyR L131G Q139L Y217F	a7GlyR L131G Q139L Y217F	a7GlyR L131M Y115F L131M	a7GlyR L131N	a7GlyR L131Q	a7GlyR L131V	a75HT3 L131G HC	a75HT3 L131G Q139L Y217F HC	a7-GABAC L131G
アセチルコリン	6.4 (1.2)	42 (21)	41 (11)	83 (20)	85	83 (20)	>500	>500	5 (0.5)	58	16 (5)	35	39	>500
ニコチン	5.0 (1.8)	8.0 (3.2)	15 (3.5)	55 (18)	28	55 (18)	>100	nd	nd	13	3.9 (0.7)	15	20	>500
エピバチジン	0.062 (0.021)	0.027 (0.009)	0.009 (0.004)	0.021 (0.002)	0.015	0.021 (0.002)	nd	nd	nd	0.027	0.21 (0.04)	0.009	nd	
バレニクリン	0.62 (0.2)	0.082 (0.068)	0.037 (0.026)	0.0016 (0.001)	0.03	0.0016 (0.001)	>10	>10	0.007 (0.001)	0.02	0.78	0.04	0.007	0.3
シチニン	6.4 (2.0)	20.6 (9.4)	13.1 (0.66)	nd	30	nd	>30	>30	8.1 (0.3)	10	>30	11	nd	>500
PNU-282987	0.13 (0.038)	0.055 (0.025)	0.034 (0.008)	0.16 (0.03)	0.054	0.16 (0.03)	0.096	0.006 (0.002)	0.006 (0.002)	0.018	0.41	0.033	0.015	0.12
トロピセトロン	0.15 (0.045)	0.06 (0.021)	0.042 (0.01)	0.31 (0.05)	0.087	0.31 (0.05)	0.09	0.01 (0.003)	0.01 (0.003)	0.045	0.36	0.066	0.04	0.18
ノルトロピセトロン	0.022 (0.007)	0.006 (0.003)	0.004 (0.001)	0.047 (0.006)	0.018	0.047 (0.006)	0.012	0.004 (0.002)	0.004 (0.002)	0.006	0.07	0.009	nd	0.021
PHA-543613	0.03 (0.01)	0.012 (0.006)	0.008 (0.002)	0.045 (0.008)	0.016	0.045 (0.008)	0.066	0.002 (0.0005)	0.002 (0.0005)	0.009	0.038	0.012	0.009	0.027
グラニセトロン	>100	17.2 (12.8)	6.7 (1.6)	nd	4	nd	nd	4.2 (0.8)	nd	nd	>30	4	nd	>500
765	>100	nd	nd	0.031 (0.02)	nd	0.031 (0.02)	0.027	0.024	nd	nd	nd	nd	0.11	nd
770	nd	nd	nd	0.001 (0.0003)	nd	0.001 (0.0003)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.007	nd
773	0.001	nd	0.00013	0.00034	nd	0.00034	0.00004	nd	nd	nd	nd	nd	0.002	nd
774	0.006	nd	0.00004	0.00018	nd	0.00018	0.00004	nd	nd	0.002	nd	nd	0.004	nd

nd = 決定せず ; 括弧 : SEM

【 0 1 3 0 】

実施例 7 : ニューロンにおけるキメラ L G I C

7 Q 7 9 G - G 1 y R A 2 9 8 G または 7 Q 7 9 G 、 Y 1 1 5 F 、 G 1 7 5 K - G

10

20

30

40

50

l y RキメラL G I Cをコードする核酸を含有するA A VまたはD N Aプラスミドをマウス皮質ニューロンに形質導入した。低濃度のトロピセトロン(30 n Mまたは100 n M)をマウス皮質ニューロンに投与した。ニューロン活性は低濃度のアゴニストの適用により抑制された(図7および図8 C)。

【0131】

7 L 1 3 1 G、Q 1 3 9 L、Y 2 1 7 F - G l y RキメラL G I Cをコードする核酸を含むD N Aプラスミドをマウス皮質ニューロンにトランスフェクトした。低濃度のバレニクリン(10 n M)をマウス皮質ニューロンに投与した。ニューロン活性は低濃度のアゴニストの適用により抑制された(図9 C)。

【0132】

これらの結果は、低濃度のL G I Cリガンド、トロピセトロンおよびバレニクリンを使用して、修飾L G I C活性がニューロンにおいて制御され得ることを示す。

【0133】

実施例8：治療におけるキメラL G I C

化学遺伝学的ツールは、薬物療法と遺伝子療法を組み合わせるための魅力的な戦略を提供する。これは、薬物の投与に選択的に関与する外因的に送達されるイオンチャネルの使用により、同じイオンチャネルおよびリガンドを使用して、様々な適応症において、異なる細胞型にわたって一貫した様式で細胞機能が調節され得るためである。寛容性が高く、臨床的に使用される薬物によって開閉されるイオンチャネルの同定は、化学遺伝学をヒトの治療用途に潜在的に拡張するために特に魅力的である。

【0134】

薬物トロピセトロンについて、我々は、それがその治療標的である5 H T 3受容体について報告されている10 n MトロピセトロンのI C 5 0と類似する、11 n MのE C 5 0で7 Q 7 9 G - G l y R A 2 9 8 Gを活性化することを見出した(Combrink et al. 2009 Pharmacological reports: PR 61: 785-97)。

【0135】

他の実施形態

本開示をその詳細な説明と併せて説明してきたが、前述の説明は例示を意図したものであり、添付の特許請求の範囲によって定義される本開示の範囲を限定するものではない。他の態様、利点、および改変は特許請求の範囲内にある。

10

20

30

【 図 1 A 】

シグナルペプチド 1-22

MRCSPGGVWLAALAASLLHVSLSQGEFQRKLYKELVKYNYNPLERPVANDSQP 50
 ----- アルファ7 nAChR LBD -----

LTVYFSLSLQIMDVDEKNQVLTNINWLQMSWTDHYLQWNVSEYPGVKTV 100
 ----- アルファ7 nAChR LBD -----

RFPDGGIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGHCCQYLPPGIFKSSC 150
 ----- アルファ7 nAChR LBD -----

YIDVRWFPPFDVQHCKLKFSGWSYGGWSDLQMQEADISGYIPNGEWDLVG 200
 ----- アルファ7 nAChR LBD -----

IPGKRSEFYECCKEPPYDVTFTVIIRRRFLFYAVSLLPSIFLMVVDIV 250
 ----- アルファ7 nAChR LBD ----- 5HT3a IPD -----

GFCLPPDSGERVSKITLLGYSVFLIVSDTLPATIGTPLIGVYFVVC 300
 ----- 5HT3a IPD -----

ALLVISLAETIFIVRLVHKQDLQRPVDPWLRHLVLDRIAAILCLGEQFMA 350
 ----- 5HT3a IPD -----

HRPPATEQANKTDDCSGSDLLPAMGNHCSHVGGPQDLEKTPRGRGSPLEP 400
 ----- 5HT3a IPD -----

PREASLAVRGLLQELSSIRQFLEKRDEIREVARDWLRVGVLDRLIFRIY 450
 ----- 5HT3a IPD -----

LLAVLAYSITLVILWSIWHS.
 ----- 5HT3a IPD -----

【 図 1 B 】

シグナルペプチド 1-22

MRCSPGGVWLAALAASLLHVSLSQGEFQRKLYKELVKYNYNPLERPVANDSQP 50
 ----- アルファ7 nAChR LBD -----

LTVYFSLSLQIMDVDEKNQVLTNINWLQMSWTDHYLQWNVSEYPGVKTV 100
 ----- アルファ7 nAChR LBD -----

RFPDGGIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGHCCQYLPPGIFKSSC 150
 ----- アルファ7 nAChR LBD -----

YIDVRWFPPFDVQHCKLKFSGWSYGGWSDLQMQEADISGYIPNGEWDLVG 200
 ----- アルファ7 nAChR LBD -----

IPGKRSEFYECCKEPPYDVTFTVIMRRRGGYLIQMYIPSLILVILSWI 250
 ----- アルファ7 nAChR LBD ----- GlyR IPD -----

SFWINMDAAPARVGLGITVLTMTTQSSGSRASLPKVSYSVKAIDIMMAVC 300
 ----- GlyR IPD -----

LLFVFSALLEYAAVNFVSRQHKELRFRKRKRHHKXDEAGEGRFNESAYG 350
 ----- GlyR IPD -----

MGPACLQAKDGLSVKGANNSITNPPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKI 400
 ----- GlyR IPD -----

SRIGFPM AFLIFNMFWIYKIVRREDVHNQ.
 ----- GlyR IPD -----

【 図 1 C 】

シグナルペプチド 1-22

MRCSPGGVWLAALAASLLHVSLSQGEFQRKLYKELVKYNYNPLERPVANDSQP 50
 ----- アルファ7 nAChR LBD -----

LTVYFSLSLQIMDVDEKNQVLTNINWLQMSWTDHYLQWNVSEYPGVKTV 100
 ----- アルファ7 nAChR LBD -----

RFPDGGIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGHCCQYLPPGIFKSSC 150
 ----- アルファ7 nAChR LBD -----

YIDVRWFPPFDVQHCKLKFSGWSYGGWSDLQMQEADISGYIPNGEWDLVG 200
 ----- アルファ7 nAChR LBD -----

IPGKRSEFYECCKEPPYDVTFTVIIRRRFLFYVVSLLPSIFLMVMDIV 250
 ----- アルファ7 nAChR LBD ----- 5HT3a IPD -----

GFYLPPNSGERVSKITLLGYSVFLIVSDTLPATIGTPLIGVYFVVC 300
 ----- 5HT3a IPD -----

MALLVISLAETIFIVRLVHKQDLQRPVPAWLRHLVLERIAWLLCLREQST 350
 ----- 5HT3a IPD -----

SQRPPATSQATKTDDCSAGNHCSHMGGPQDFEKSFRDRCSPPPPREAS 400
 ----- 5HT3a IPD -----

LAVCGLLQELSSIRQFLEKRDEIREVARDWLRVGSVLDKLLFHIYLLAVL 450
 ----- 5HT3a IPD -----

AYSITLVMLWSIWQYA.
 ----- 5HT3a IPD -----

【 図 1 D 】

シグナルペプチド 1-22

MRCSPGGVWLAALAASLLHVSLSQGEFQRKLYKELVKYNYNPLERPVANDSQP 50
 ----- アルファ7 nAChR LBD -----

LTVYFSLSLQIMDVDEKNQVLTNINWLQMSWTDHYLQWNVSEYPGVKTV 100
 ----- アルファ7 nAChR LBD -----

RFPDGGIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGHCCQYLPPGIFKSSC 150
 ----- アルファ7 nAChR LBD -----

YIDVRWFPPFDVQHCKLKFSGWSYGGWSDLQMQEADISGYIPNGEWDLVG 200
 ----- アルファ7 nAChR LBD -----

IPGKRSEFYECCKEPPYDVTFTVIMRRRLLYLLQTYFPATLMVMLSIV 250
 ----- アルファ7 nAChR LBD ----- GABA C IPD -----

SFWIDRRVAVPARVPLGITVLTMTSIIIGVNASMPRVSYIKAVDIYLVWS 300
 ----- GABA C IPD -----

FVEVFLSVLEAYAVNYLITVQERKEQKLEKLPCTISGLPPPRTAMLDGNY 350
 ----- GABA C IPD -----

SDGEVNDLDNYMPENGEKPRMMVQLTLASERSSQQRKSQRSSYSVMRID 400
 ----- GABA C IPD -----

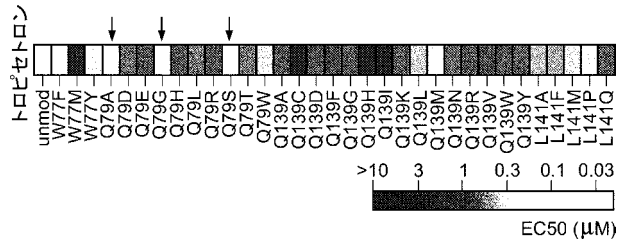
THAIDKYSRIIFPAAYILFNLIYWSIFS.
 ----- GABA C IPD -----

【 図 1 E 】

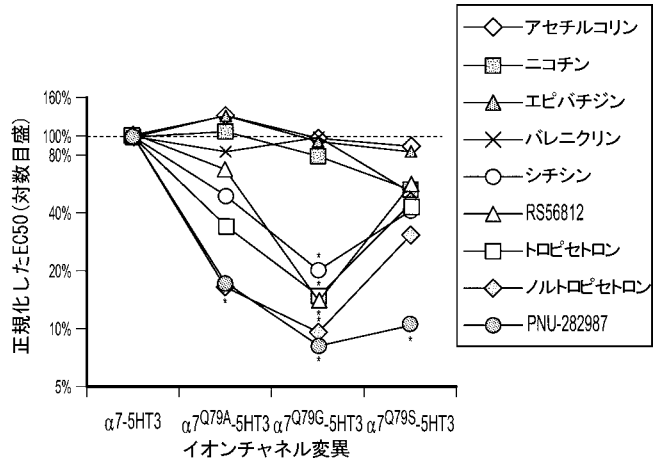
シグナルペプチド1-22

MGGGRGGIWLALAAALLHVSLSQGEFQRRLYKELVKYNYNPLERPVANDSQP
 LTVYFSLSLQIMDVDEKNQVLTNTNIWLQKSWTDHYLQWNMSEYPGVKVN
 RFPDGGQIWKPDILLYNSADERFDATFETNVGVNASGHCQYLPPIGFKSSC
 YIDVRVFPFDVQCKLXFGSWSYGGWSDLQMQEADISSYIPNGEWDLMG
 IPGKRNEKFYECCPEYPDVITYVTMRRRLYYGLNLLIPCVLISALALL
 VFLLPADSGEKISLGITVLLSLTTFMLLVAEIMPATSDSVPLIAQYFAST
 MIIVGLSVVVTVIVLRYHEHDPDGGKMPKWTRIILLNWCAWFLRMKRPGE
 DKVRPACQHKPRRCSLASVELSAGAGPPTSNGNLLYIGFRGLEGMHCAPT
 PDSGVVCGLACSPHDEHLMHGAHPDGDPLAKILEEVRYIANRNRQC
 DESEVICSEWKFACVVDPLCLMAFSVFTICTIGILMSAPNEVEAVSKD
 FA.
 +++

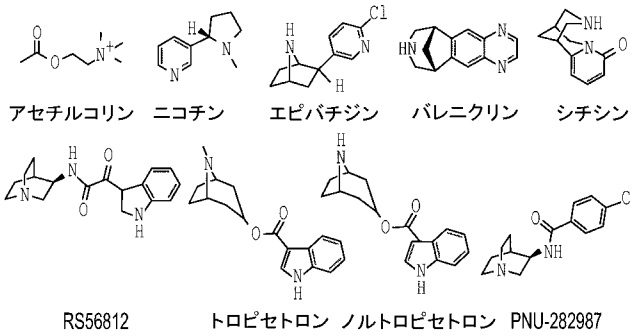
【 図 2 】



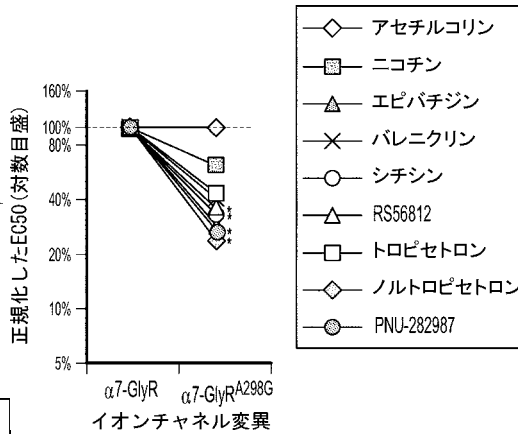
【 図 3 A 】



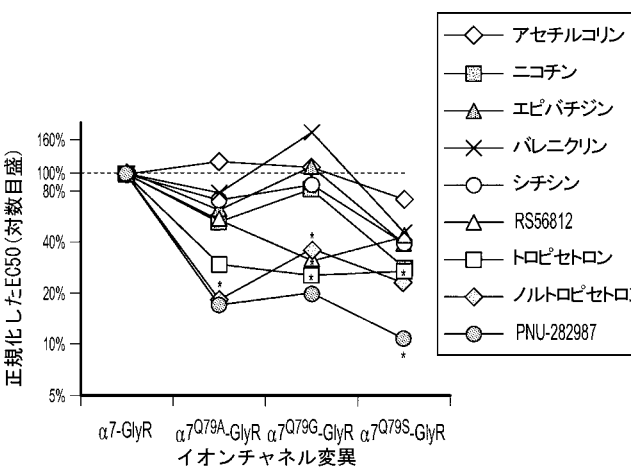
【 図 3 B 】



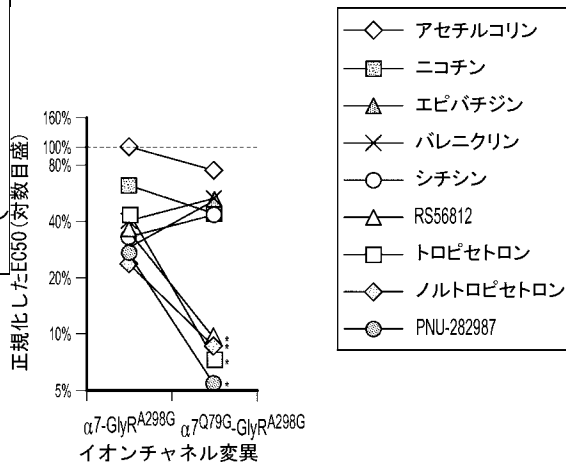
【 図 4 B 】



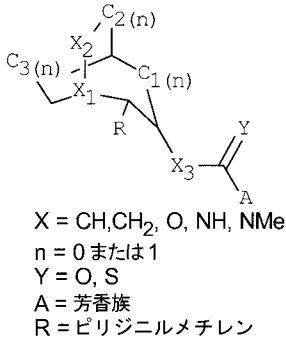
【 図 4 A 】



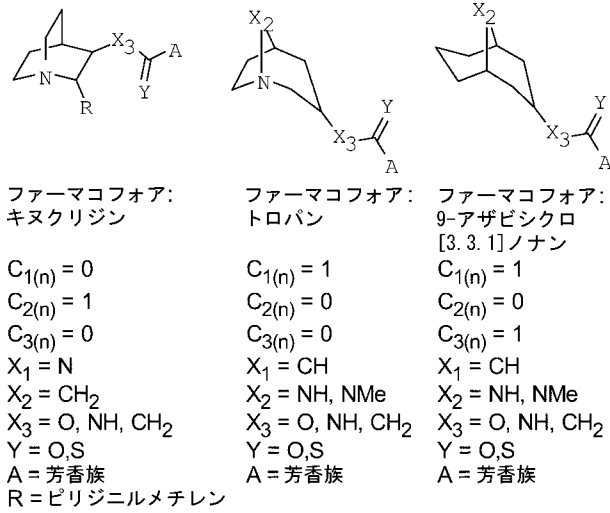
【 図 4 C 】



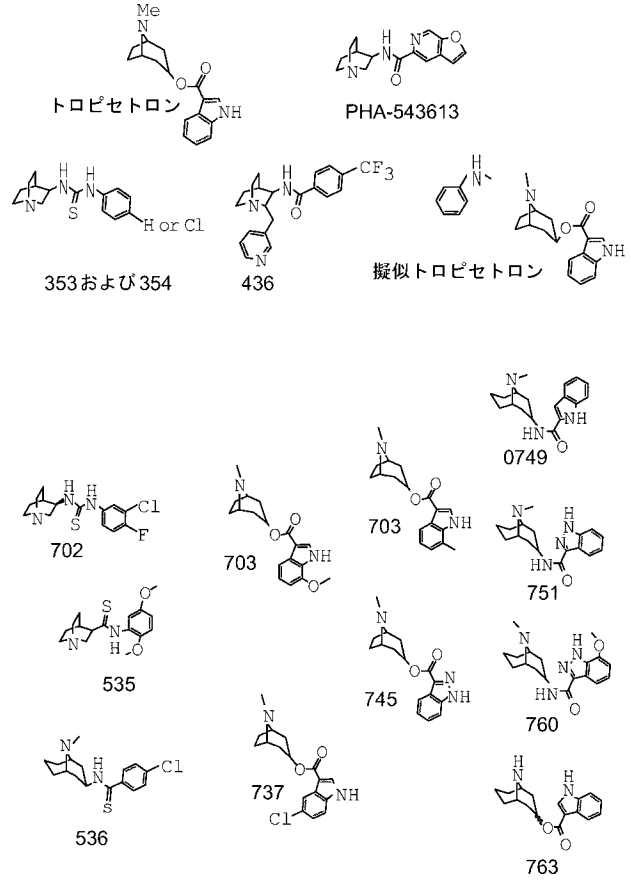
【図 5 A】



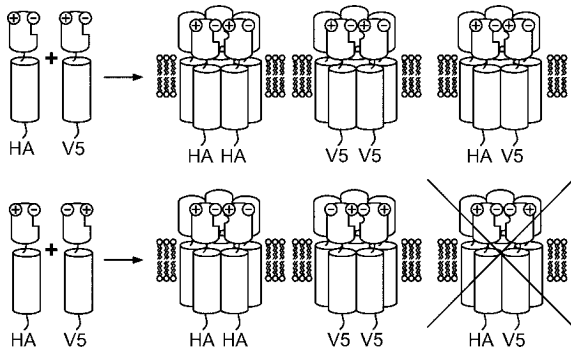
【図 5 B】



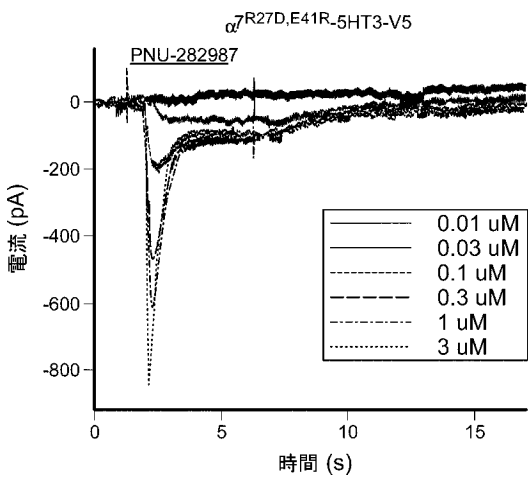
【図 5 C】



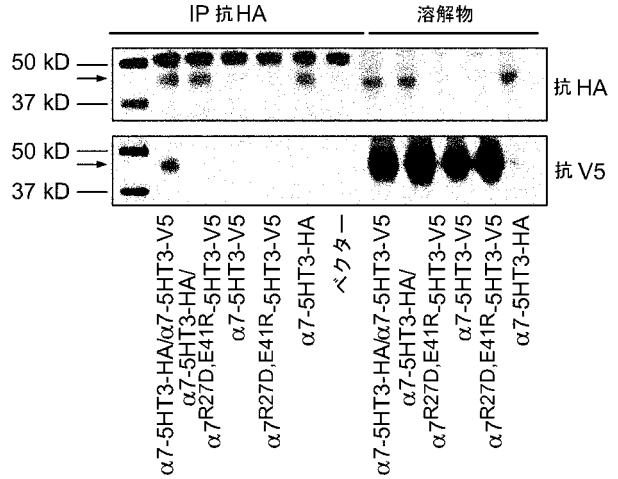
【図 6 A】



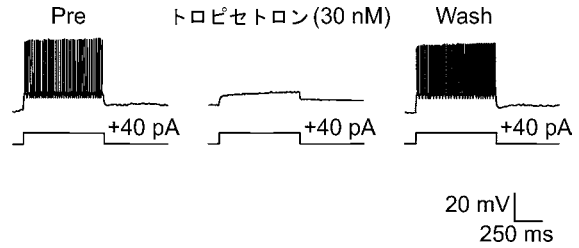
【図 6 B】



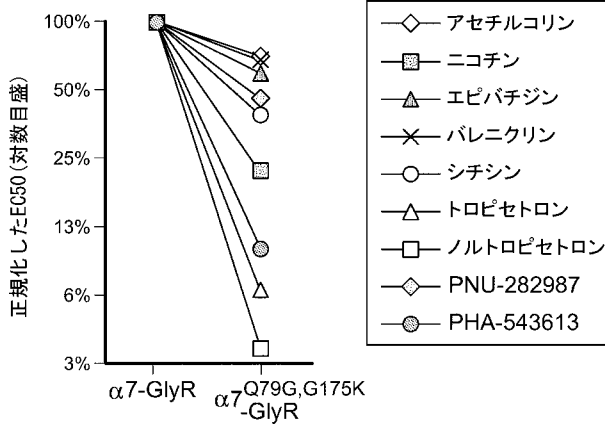
【図 6 C】



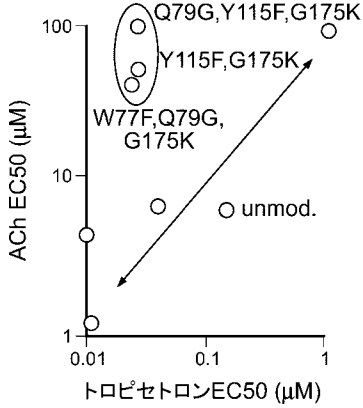
【図 7】



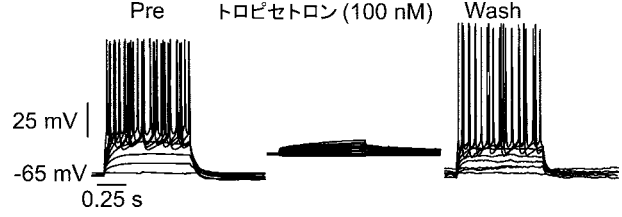
【 図 8 A 】



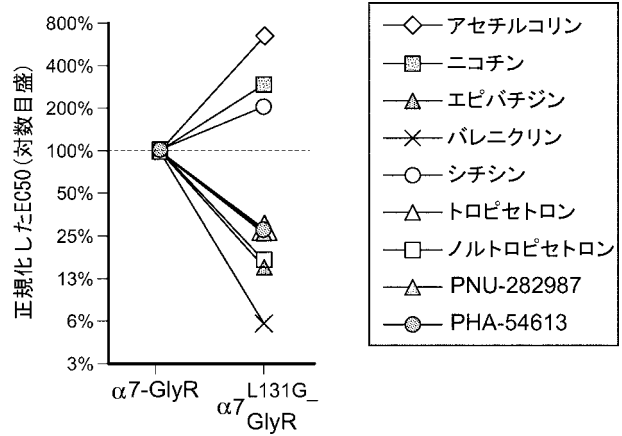
【 図 8 B 】



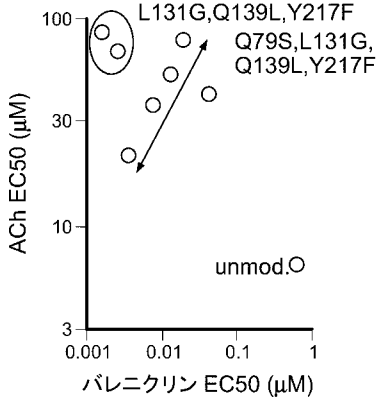
【 図 8 C 】



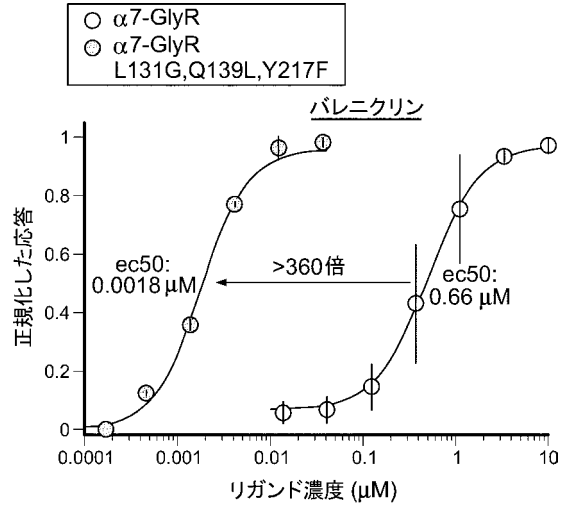
【 図 9 A 】



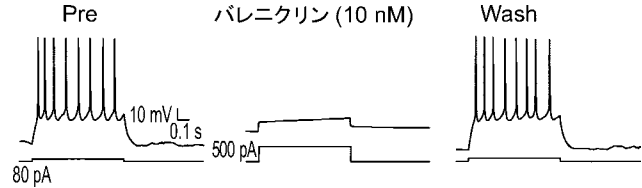
【 図 9 B 】



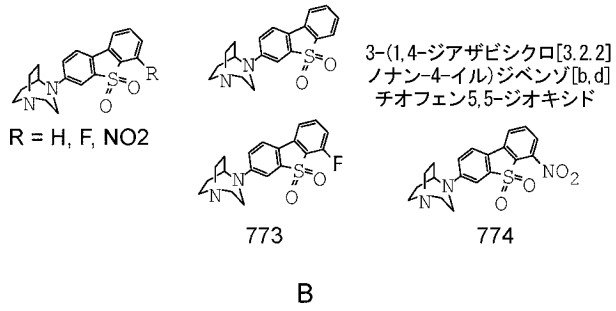
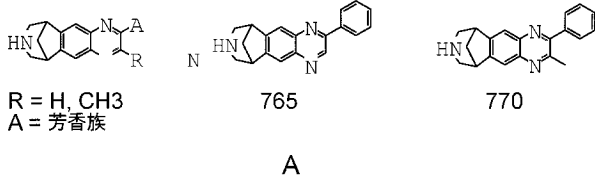
【 図 9 C 】



【 図 9 D 】



【 図 1 0 】



【 配 列 表 】

2019530468000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2017/041147

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US2017/041147

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 60-113, 124-126
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 60-113, 124-126 pertain to a method for treating a human body, and thus relate to a subject matter not required to search under PCT Article 17(2)(a)(i) and Rule 39.1(iv).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)


This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of any additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2017/041147

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 14/705(2006.01)i, G01N 33/58(2006.01)i, G01N 33/68(2006.01)i, C12N 5/071(2010.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61K 38/00(2006.01)n		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K 14/705; C12N 5/02; C07D 498/02; A61K 38/17; A61K 31/4745; G01N 33/58; G01N 33/68; C12N 5/071; A61K 48/00; A61K 38/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(Kipo internal), STN (Registry, Caplus) & Keywords: ligand gated ion channel, ion pore domain, ligand binding domain, nicotinic acetylcholine receptor, mutation, varenicline, quinuclidine, tropisetron		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2010-0130420 A1 (STERNSON, S. et al.) 27 May 2010 See abstract; paragraphs [0003]-[0016], [0030]-[0038], [0046], [0099]-[0110]; claims 1-62; figures 1a-1d, 2; and table 2.	1-7, 9, 11, 21, 25, 27, 31-33, 36-39, 42-49, 114-121
Y		26, 28-30, 122
A		8, 10, 12-20, 22-24, 34, 35, 40, 41, 50-59, 123
X	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.	45, 46, 50-55
Y		26, 28, 122
X	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.	56, 57
Y		29
X	US 2005-0250808 A1 (XIE, W. et al.) 10 November 2005 See paragraphs [0003], [0004]; and claim 34.	45, 46, 50-55
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 18 October 2017 (18.10.2017)	Date of mailing of the international search report 18 October 2017 (18.10.2017)	
Name and mailing address of the ISA/KR International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer KIM, Sun Hee Telephone No. +82-42-481-5405	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. PCT/US2017/041147

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y		28
X	GAO, Y. et al., "Derivatives of dibenzothiophene for positron emission tomography imaging of $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptors", Journal of Medicinal Chemistry, 2013, Vol. 56, No. 19, pp. 7574-7589 See abstract; and page 7574.	58, 59
Y		30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US2017/041147

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2010-0130420 A1	27/05/2010	AU 2009-302217 A1	15/04/2010
		CA 2740125 A1	15/04/2010
		EP 2344636 A2	20/07/2011
		EP 2352490 A1	10/08/2011
		JP 2012-504966 A	01/03/2012
		JP 2012-505243 A	01/03/2012
		JP 5775819 B2	09/09/2015
		US 2011-0244048 A1	06/10/2011
		US 8435762 B2	07/05/2013
		US 9173840 B2	03/11/2015
		WO 2010-042799 A2	15/04/2010
		WO 2010-042799 A3	30/09/2010
		WO 2010-042823 A1	15/04/2010
		US 2005-0250808 A1	10/11/2005
CA 2567977 A1	05/01/2006		
CN 101044140 A	26/09/2007		
EP 1742944 A1	17/01/2007		
EP 1742944 B1	10/11/2010		
JP 2007-534692 A	29/11/2007		
JP 2011-241227 A	01/12/2011		
US 2009-0118232 A1	07/05/2009		
US 2011-0178075 A1	21/07/2011		
US 7488737 B2	10/02/2009		
US 7902217 B2	08/03/2011		
WO 2006-001894 A1	05/01/2006		

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 31/551 (2006.01)	A 6 1 K 31/551	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 K 48/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
G 0 1 N 33/536 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
	G 0 1 N 33/536	D

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(74)代理人 100142929
弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707
弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889
弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 スターンソン スコット
アメリカ合衆国 2 0 8 1 5 - 6 7 8 9 メリーランド州 チェビー チェイス ジョーンズ ブ
リッジ ロード 4 0 0 0

(72)発明者 リー ピーター
アメリカ合衆国 2 0 8 1 5 - 6 7 8 9 メリーランド州 チェビー チェイス ジョーンズ ブ
リッジ ロード 4 0 0 0

(72)発明者 マグナス クリストファー
アメリカ合衆国 2 0 8 1 5 - 6 7 8 9 メリーランド州 チェビー チェイス ジョーンズ ブ
リッジ ロード 4 0 0 0

Fターム(参考) 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 AC20 BA01 CA24 CA44
4C084 AA02 AA07 AA13 BA44 CA18 DC50 NA05 NA06 NA14 ZA011

ZA012 ZA941 ZA942 ZC411 ZC412 ZC751
4C086 AA01 AA02 CB11 CB15 CB16 CB17 MA01 MA02 MA04 NA05
NA06 NA14 ZA01 ZA94 ZC75
4H045 AA10 AA30 BA41 CA40 DA50 EA20 FA74

专利名称(译)	修饰的配体门控离子通道及其使用方法		
公开(公告)号	JP2019530468A	公开(公告)日	2019-10-24
申请号	JP2019520933	申请日	2017-07-07
[标]申请(专利权)人(译)	霍华德休斯医学研究所		
申请(专利权)人(译)	霍华德休斯医学研究所		
[标]发明人	リーピーター		
发明人	スターンソン スコット リー ピーター マグナス クリストファー		
IPC分类号	C12N15/12 A61K38/17 A61K31/439 A61K31/46 A61K31/55 A61K31/551 A61K48/00 A61P43/00 A61P25/00 A61P21/00 C07K14/705 C07K19/00 C12N5/10 G01N33/53 G01N33/536		
CPC分类号	A61K38/012 A61K38/1709 A61P21/00 A61P25/00 A61P43/00 C07K14/705 C07K14/70571 C07K2319 /00 C07K2319/03 C12N15/00 A61K38/00 A61K48/00 C12N5/0602 C12N2510/00 G01N33/58 G01N33 /68 G01N2333/705 C07K14/4702 C07K14/4713 C12N15/09		
FI分类号	C12N15/12.ZNA A61K38/17 A61K31/439 A61K31/46 A61K31/55 A61K31/551 A61K48/00 A61P43/00. 121 A61P43/00.111 A61P25/00 A61P21/00 C07K14/705 C07K19/00 C12N5/10 G01N33/53.D G01N33 /536.D		
F-TERM分类号	4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/AC20 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065 /CA44 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/AA13 4C084/BA44 4C084/CA18 4C084/DC50 4C084/NA05 4C084/NA06 4C084/NA14 4C084/ZA011 4C084/ZA012 4C084/ZA941 4C084/ZA942 4C084/ZC411 4C084/ZC412 4C084/ZC751 4C086/AA01 4C086/AA02 4C086/CB11 4C086/CB15 4C086/CB16 4C086 /CB17 4C086/MA01 4C086/MA02 4C086/MA04 4C086/NA05 4C086/NA06 4C086/NA14 4C086/ZA01 4C086/ZA94 4C086/ZC75 4H045/AA10 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045 /EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 正人大关 五十嵐弘		
优先权	62/359534 2016-07-07 US 62/486779 2017-04-18 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

该文件涉及用于控制配体门控离子通道 (LGIC) 活性的材料和方法。例如, 提供了包括至少一个具有修饰的配体结合结构域 (LBD) 和/或修饰的离子孔结构域 (IPD) 的LGIC亚基的修饰的LGIC。还提供了可以结合并激活修饰的LGIC的外源LGIC配体, 以及调节跨哺乳动物细胞膜的离子转运的方法, 调节哺乳动物中细胞的兴奋性的方法以及治疗方法。患有通道病的哺乳动物。

(5) Int. Cl.	F I	ターマコード (参考)
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12 Z N A	4 B 0 6 5
A 6 1 K 38/17 (2006.01)	A 6 1 K 38/17	4 C 0 8 4
A 6 1 K 31/439 (2006.01)	A 6 1 K 31/439	4 C 0 8 6
A 6 1 K 31/46 (2006.01)	A 6 1 K 31/46	4 H 0 4 5
A 6 1 K 31/55 (2006.01)	A 6 1 K 31/55	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 66 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2019-520933 (P2019-520933)	(71) 出願人	519003114
(86) (22) 出願日	平成29年7月7日 (2017.7.7)		ハワード ヒューズ メディカル インス
(85) 翻訳文提出日	平成31年2月28日 (2019.2.28)		ティチユート
(86) 国際出願番号	PCT/US2017/041147		アメリカ合衆国 2 0 8 1 5 - 6 7 8 9
(87) 国際公開番号	W02018/009832		メリーランド州 チェビー チェイス ジ
(87) 国際公開日	平成30年1月11日 (2018.1.11)		ョーンズ ブリッジ ロード 4 0 0 0
(31) 優先権主張番号	62/359,534	(74) 代理人	100102978
(32) 優先日	平成28年7月7日 (2016.7.7)		弁理士 清水 初志
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100102118
			弁理士 菅名 雅夫
(31) 優先権主張番号	62/486,779	(74) 代理人	100160923
(32) 優先日	平成29年4月18日 (2017.4.18)		弁理士 山口 裕季
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)	(74) 代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 経緯されたリガンド依存性イオンチャネルおよび使用の方法