(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0061409
(43) 공개일자 2023년05월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/705 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/70571 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7009591
(22) 출원일자(국제) 2021년08월20일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년03월20일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/046915
(87) 국제공개번호 WO 2022/040535
국제공개일자 2022년02월24일
(30) 우선권주장
63/068,890 2020년08월21일 미국(US)

(71) 출원인
트라메스 바이오 인코포레이티드
미국 94607 캘리포니아 오클랜드 1111 브로드웨이 #1300
(72) 발명자
라우 앤서니 주니어
미국 94607 캘리포니아 오클랜드 1111 브로드웨이 #1300 트라메스 바이오 인코포레이티드 내
케이퍼 오리온 피 주니어
미국 94607 캘리포니아 오클랜드 1111 브로드웨이 #1300 트라메스 바이오 인코포레이티드 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인(유한)케이비케이

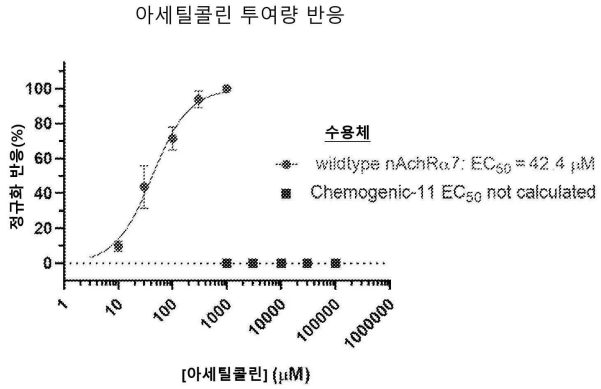
전체 청구항 수 : 총 125 항

(54) 발명의 명칭 **신경학적 질환을 위한 조성물 및 방법**

(57) 요 약

조작된 수용체, 폴리뉴클레오타이드 암호화된 조작된 수용체, 및 조작된 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자 요법 벡터를 사용하여 세포의 활성을 조절하기 위한 조성물 및 방법이 제공된다. 이들 조성물 및 방법은 예를 들어 질환의 치료 또는 신경 회로 연구에서 뉴런의 활성을 조절하는 데 특히 사용된다.

대 표 도 - 도2a



화학적-11(CR-11):
아미노산 치환 Y115D+L131Q를 갖는 SEQ ID NO: 33

(52) CPC특허분류
A61P 25/00 (2018.01)
(72) 발명자
매킨슨 스테파니
미국 94607 캘리포니아 오클랜드 1111 브로드웨이 #1300 트라메스 바이오 인코포레이티드 내
나카 알렉산더
미국 94607 캘리포니아 오클랜드 1111 브로드웨이 #1300 트라메스 바이오 인코포레이티드 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR)로부터 유래된 리간드 결합 도메인을 포함하는 조작된 수용체로서, 여기서 리간드 결합 도메인은 SEQ ID NO: 4의 W77, R101, Y115, L131, Q139, Y140, S170, S172 또는 Y210에 상응하는 아미노산 잔기에서 아미노산 돌연변이를 포함하는 것인 조작된 수용체.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

리간드 결합 도메인은 SEQ ID NO: 4의 아미노산 잔기 23-220과 적어도 85% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 조작된 수용체.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

리간드 결합 도메인은 SEQ ID NO: 4의 W77, R101, Y115, L131, Q139, Y140, S170, S172 및 Y210에 상응하는 아미노산 잔기로부터 선택된 2개 이상의 아미노산 잔기에서 아미노산 돌연변이를 포함하는 것인 조작된 수용체.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

리간드 결합 도메인은 SEQ ID NO: 4의 지시된 위치에 상응하는 아미노산 잔기(들)에서 돌연변이를 포함하는 것인 조작된 수용체:

a) Y140;

b) R101 및 L131;

c) Y115 및 Y210;

d) R101 및 Y210;

e) R101, Y115 및 Y210;

f) W77, R101 및 L131;

g) R101, L131 및 S172;

h) Q139 및 S172D;

i) S172 및 Y210

j) L131 및 S172;

k) Y115 및 S170; 또는

l) Y115 및 L131.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,

돌연변이는 아미노산 치환인 조작된 수용체.

청구항 6

제 4 항에 있어서,

리간드 결합 도메인은 SEQ ID NO: 4의 지시된 위치에 상응하는 아미노산 치환(들)을 포함하는 것인 조작된 수용체:

a) Y140I;

b) R101F 및 L131G;

c) R101F 및 L131D;

d) Y115E 및 Y210W;

e) R101W 및 Y210V;

f) R101F 및 Y210V;

g) R101F 및 Y210F;

h) R101M 및 L131A;

i) R101M 및 L131F;

j) R101W, Y115E 및 Y210W;

k) R101F, Y115E 및 Y210W;

l) W77F, R101F 및 L131D;

m) R101F, L131N 및 S172D;

n) Q139E 및 S172D;

o) S172D 및 Y210W;

p) L131S 및 S172D;

q) L131T 및 S172D;

r) L131D 및 S172D;

s) Y115D 및 S170T;

t) Y115D 및 L131Q;

u) Y115D 및 L131E;

v) L131E;

w) Y140C;

x) R101W;

y) Y210V; 또는

z) Q139E.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서,

조작된 수용체는 인간 글리신 수용체로부터 유래된 이온 기공 도메인을 포함하는 키메라 리간드-개폐 이온 채널(LGIC) 수용체인 조작된 수용체.

청구항 8

제 7 항에 있어서,

인간 글리신 수용체는 인간 글리신 수용체 α1, 인간 글리신 수용체 α2, 또는 인간 글리신 수용체 α3인 조작

된 수용체.

청구항 9

제 7 항에 있어서,

이온 기공 도메인은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 255-457, SEQ ID NO: 83의 아미노산 260-452, SEQ ID NO: 85의 아미노산 259-464 또는 SEQ ID NO: 87의 아미노산 259-449와 적어도 85% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 조작된 수용체.

청구항 10

제 7 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서,

조작된 수용체의 리간드 결합 도메인은 인간 글리신 수용체로부터 유래된 Cys-루프 도메인을 포함하는 것인 조작된 수용체.

청구항 11

제 10 항에 있어서,

Cys-루프 도메인은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 166-172를 포함하는 것인 조작된 수용체.

청구항 12

제 10 항에 있어서,

Cys-루프 도메인은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 166-180을 포함하는 것인 조작된 수용체.

청구항 13

제 1 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서,

조작된 수용체의 리간드 결합 도메인은 인간 글리신 수용체 α1 서브유닛으로부터의 β1-2 루프 도메인을 포함하는 것인 조작된 수용체.

청구항 14

제 13 항에 있어서,

β1-2 루프 도메인은 SEQ ID NO:2의 아미노산 81-84를 포함하는 것인 조작된 수용체.

청구항 15

제 1 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 있어서,

조작된 수용체는 SEQ ID NOs 58-78 및 88 중 어느 하나에 따른 아미노산 서열을 포함하는 것인 조작된 수용체.

청구항 16

제 1 LGIC로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 제 2 LGIC로부터 유래된 이온 기공 도메인을 포함하는 조작된 키메라 리간드-개폐 이온 채널(LGIC)로서, 여기서 제 1 LGIC는 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR)이고 SEQ ID NO: 4의 W77, R101, Y115, L131, Q139, Y140, S170, S172 또는 Y210에 상응하는 아미노산 잔기에서 아미노산 돌연변이를 포함하는 것인 조작된 키메라 리간드-개폐 이온 채널(LGIC).

청구항 17

제 16 항에 있어서,

리간드 결합 도메인은 SEQ ID NO: 4의 지시된 위치에 상응하는 아미노산 잔기(들)에서 돌연변이를 포함하는 것인 조작된 키메라 LGIC:

a. Y140;

b. R101 및 L131;

c. Y115 및 Y210;

d. R101 및 Y210;

e. R101, Y115 및 Y210;

f. W77, R101 및 L131;

g. R101, L131 및 S172;

h. Q139 및 S172D;

i. S172 및 Y210

j. L131 및 S172;

k. Y115 및 S170; 또는

l. Y115 및 L131.

청구항 18

제 16 항에 있어서,

리간드 결합 도메인은 SEQ ID NO: 4의 지시된 위치에 상응하는 아미노산 치환(들)을 포함하는 것인조작된 키메라 LGIC:

a. Y140I;

b. R101F 및 L131G;

c. R101F 및 L131D;

d. Y115E 및 Y210W;

e. R101W 및 Y210V;

f. R101F 및 Y210V;

g. R101F 및 Y210F;

h. R101M 및 L131A;

i. R101M 및 L131F;

j. R101W, Y115E 및 Y210W;

k. R101F, Y115E 및 Y210W;

l. W77F, R101F 및 L131D;

m. R101F, L131N 및 S172D;

n. Q139E 및 S172D;

o. S172D 및 Y210W;

p. L131S 및 S172D;

q. L131T 및 S172D;

r. L131D 및 S172D;

s. Y115D 및 S170T;

t. Y115D 및 L131Q;

u. Y115D 및 L131E;

v. L131E;

w. Y140C;

x. R101W;

y. Y210V; 또는

z. Q139E.

청구항 19

제 16 항 내지 제 18 항 중 어느 한 항에 있어서,

제 2 LGIC는 인간 글리신 수용체인 조작된 키메라 LGIC.

청구항 20

제 19 항에 있어서,

인간 글리신 수용체는 인간 글리신 수용체 α1인 조작된 키메라 LGIC.

청구항 21

제 20 항에 있어서,

SEQ ID NO: 33과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드 서열을 포함하는 조작된 키메라 LGIC.

청구항 22

제 1 항 내지 제 21 항 중 어느 한 항에 있어서,

아세틸콜린에 대한 조작된 수용체의 효능은 아세틸콜린에 대한 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR) 또는 대조군 수용체의 효능보다 낮은 것인 조작된 수용체.

청구항 23

제 22 항에 있어서,

아세틸콜린에 대한 조작된 수용체의 효능은 아세틸콜린에 대한 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR) 또는 대조군 수용체의 효능보다 적어도 2배 더 낮은 것인 조작된 수용체.

청구항 24

제 1 항 내지 제 23 항 중 어느 한 항에 있어서,

비천연 리간드에 대한 조작된 수용체의 효능은 비천연 리간드에 대한 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR) 또는 대조군 수용체의 효능과 거의 동일한 것인 조작된 수용체.

청구항 25

제 1 항 내지 제 24 항 중 어느 한 항에 있어서,

비천연 리간드에 대한 조작된 수용체의 효능은 비천연 리간드에 대한 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR) 또는 대조군 수용체의 효능보다 더 높은 것인 조작된 수용체.

청구항 26

제 25 항에 있어서,

비천연 리간드에 대한 조작된 수용체의 효능은 비천연 리간드에 대한 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR) 또는 대조군 수용체의 효능보다 적어도 2배 더 높은 것인 조작된 수용체.

청구항 27

제 22 항 내지 제 26 항 중 어느 한 항에 잇어서,

리간드에 대한 조작된 수용체의 효능은 Lenti-X 293T 세포를 사용하는 YFP 형광 소광 분석법에 따라 리간드에 대한 수용체의 EC50에 의해 결정되는 것인 조작된 수용체.

청구항 28

제 1 항 내지 제 27 항 중 어느 한 항에 있어서,

비천연 리간드의 존재하에서 조작된 수용체의 효능은 비천연 리간드의 존재하에서 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR) 또는 대조군 수용체의 효능보다 높은 것인 조작된 수용체.

청구항 29

제 1 항 내지 제 28 항 중 어느 한 항에 있어서,

비천연 리간드의 존재하에서 조작된 수용체의 효능은 비천연 리간드의 존재하에서 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR) 또는 대조군 수용체의 효능보다 적어도 2배 더 높은 것인 조작된 수용체.

청구항 30

제 28 항 또는 제 29 항에 있어서,

효능을 결정하는 것은 비천연 리간드의 존재하에서 시험관 내에서 조작된 수용체를 통과하는 전류의 양을 결정하는 것을 포함하는 것인 조작된 수용체.

청구항 31

제 24 항 내지 제 30 항 중 어느 한 항에 있어서,

비천연 리간드는 AZD-0328, TC-6987, ABT-126, CNL002, TC-5619, CNL001, TC-6683, 바레니클린 및 파시니클린/RG3487로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인 조작된 수용체.

청구항 32

제 31 항에 있어서,

비천연 리간드는 ABT-126, RG3487 및 CNL002로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인 조작된 수용체.

청구항 33

제 31 항에 있어서,

비천연 리간드는 TC-5619인 조작된 수용체.

청구항 34

제 1 항 내지 제 33 항 중 어느 한 항의 조작된 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 35

SEQ ID NOs: 58-78 및 88 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 36

제 34 항 또는 제 35 항에 있어서,

폴리뉴클레오타이드는 조작된 수용체를 암호화하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 것인 폴리뉴클레오타이드.

청구항 37

제 36 항에 있어서,

프로모터는 조절가능한 프로모터인 폴리뉴클레오타이드.

청구항 38

제 37 항에 있어서,

조절가능한 프로모터는 흥분성 세포에서 활성인 폴리뉴클레오타이드.

청구항 39

제 38 항에 있어서,

흥분성 세포는 뉴런 또는 근육세포인 폴리뉴클레오타이드.

청구항 40

제 39 항에 있어서,

흥분성 세포는 뉴런인 폴리뉴클레오타이드.

청구항 41

제 34 항 내지 제 40 항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터.

청구항 42

제 41 항에 있어서,

벡터는 플라스미드 또는 바이러스 벡터인 벡터.

청구항 43

제 42 항에 있어서,

벡터는 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노 관련 바이러스(AAV) 벡터 및 단순 헤르페스-1 바이러스 벡터(HSV-1)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 바이러스 벡터인 벡터.

청구항 44

제 43 항에 있어서,

바이러스 벡터는 AVV 벡터이고, AAV 벡터는 AAV5 또는 이의 변이체, AAV6 또는 이의 변이체 또는 AAV9 또는 이의 변이체인 벡터.

청구항 45

제 1 항 내지 제 33 항 중 어느 한 항의 조작된 수용체, 제 34 항 내지 제 40 항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오타이드, 또는 제 41 항 내지 제 44 항 중 어느 한 항의 벡터를 포함하는 조성물.

청구항 46

제 1 항 내지 제 33 항 중 어느 한 항의 조작된 수용체, 제 34 항 내지 제 40 항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오타이드, 또는 제 41 항 내지 제 44 항 중 어느 한 항의 벡터 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 47

뉴런을 제 34 항 내지 제 40 항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오타이드, 제 41 항 내지 제 44 항 중 어느 한 항의 벡터, 제 45 항의 조성물, 또는 제 46 항의 약학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하여 뉴런에서 조작된 수용체를 발현시키는 방법.

청구항 48

제 47 항 또는 제 40 항에 있어서,

뉴런은 말초신경계의 뉴런인 방법 또는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 49

제 47 항 또는 제 48 항, 또는 제 40 항에 있어서,

뉴런은 중추신경계의 뉴런인 방법 또는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 50

제 47 항 내지 제 49 항 중 어느 한 항 또는 제 40 항에 있어서,

뉴런은 통각 수용성 뉴런인 방법 또는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 51

제 47 항 내지 제 50 항 중 어느 한 항 또는 제 40 항에 있어서,

뉴런은 비통각 수용성 뉴런인 방법 또는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 52

제 47 항 내지 제 51 항 중 어느 한 항 또는 제 40 항에 있어서,

뉴런은 후근신경절(DRG) 뉴런, 삼차신경절(TG) 뉴런, 운동 뉴런, 흥분성 뉴런, 억제성 뉴런, 또는 감각 뉴런인 방법 또는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 53

제 47 항 내지 제 52 항 중 어느 한 항 또는 제 40 항에 있어서,

뉴런은 Aδ 구심성 섬유, C 섬유 또는 Aβ 구심성 섬유인 방법 또는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 54

제 53 항 또는 제 40 항에 있어서,

뉴런은 Aβ 구심성 섬유인 방법 또는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 55

제 54 항 또는 제 40 항에 있어서,

Aβ 구심성 섬유는 손상된 Aβ 구심성 섬유인 방법 또는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 56

제 54 항 또는 제 40 항에 있어서,

Aβ 구심성 섬유는 손상되지 않은 Aβ 구심성 섬유인 방법 또는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 57

제 47 항 내지 제 56 항 중 어느 한 항 또는 제 40 항에 있어서,

뉴런은 신경필라멘트 200(NF200), 피에조 2 및 TLR-5를 발현하는 것인 방법 또는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 58

제 47 항 내지 제 57 항 중 어느 한 항 또는 제 40 항에 있어서,

뉴런은 TrpV1, 전립선산 포스파타제, NaV1.1을 발현하지 않는 것인 방법 또는 폴리뉴클레오타이드.

청구항 59

제 47 항 내지 제 58 항 중 어느 한 항에 있어서,

접촉 단계는 시험관내, 생체외 또는 생체내에서 수행되는 것인 방법.

청구항 60

제 59 항에 있어서,

접촉 단계는 대상에서 생체내에서 수행되는 것인 방법.

청구항 61

제 60 항에 있어서,

접촉 단계는 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 조성물, 또는 약학적 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 62

제 61 항에 있어서,

접촉 단계는 시험관내 또는 생체외에서 수행되는 것인 방법.

청구항 63

제 62 항에 있어서,

접촉 단계는 리포펙션, 나노입자 전달, 입자 충격, 전기천공, 초음파처리 또는 미세주입을 포함하는 것인 방법.

청구항 64

제 47 항 내지 제 63 항 중 어느 한 항에 있어서,

조작된 수용체는 뉴런의 세포 표면에 국소화할 수 있는 것인 방법.

청구항 65

(a) 뉴런을 제 1 항 내지 제 33 항 중 어느 한 항의 조작된 수용체, 제 34 항 내지 제 40 항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오타이드 또는 제 41 항 내지 제 44 항 중 어느 한 항의 벡터, 제 45 항의 조성물 또는 제 46 항의 약학적 조성물과 접촉시키는 단계, 및 (b) 뉴런을 조작된 수용체의 비천연 리간드와 접촉시키는 단계를 포함하여 뉴런의 활성을 억제하는 방법.

청구항 66

제 65 항에 있어서,

뉴런은 말초신경계의 뉴런인 방법.

청구항 67

제 65 항에 있어서,

뉴런은 중추신경계의 뉴런인 방법.

청구항 68

제 65 항 내지 제 67 항 중 어느 한 항에 있어서,

뉴런은 통각 수용성 뉴런인 방법.

청구항 69

제 65 항 내지 제 67 항 중 어느 한 항에 있어서,

뉴런은 비통각 수용성인 뉴런인 방법.

청구항 70

제 65 항 내지 제 69 항 중 어느 한 항에 있어서,

뉴런은 후근신경절(DRG) 뉴런, 삼차신경절(TG) 뉴런, 운동 뉴런, 흥분성 뉴런, 억제성 뉴런, 또는 감각 뉴런인 방법.

청구항 71

제 65 항 내지 제 70 항 중 어느 한 항에 있어서,

뉴런은 Aδ 구심성 섬유, C 섬유 또는 Aβ 구심성 섬유인 방법.

청구항 72

제 71 항에 있어서,

뉴런은 Aβ 구심성 섬유인 방법.

청구항 73

제 72 항에 있어서,

Aβ 구심성 섬유는 손상된 Aβ 구심성 섬유인 방법.

청구항 74

제 72 항에 있어서,

Aβ 구심성 섬유는 손상되지 않은 Aβ 구심성 섬유인 방법.

청구항 75

제 65 항 내지 제 74 항 중 어느 한 항에 있어서,

뉴런은 신경필라멘트 200(NF200), 피에조 2 및 TLR-5를 발현하는 것인 방법.

청구항 76

제 65 항 내지 제 75 항 중 어느 한 항에 있어서,

뉴런은 TrpV1, 전립선산 포스파타제, NaV1.1을 발현하지 않는 것인 방법.

청구항 77

제 65 항 내지 제 76 항 중 어느 한 항에 있어서,

접촉 단계(a)는 시험관내, 생체외 또는 생체내에서 수행되는 것인 방법.

청구항 78

제 65 항 내지 제 77 항 중 어느 한 항에 있어서,

접촉 단계(b)는 시험관내, 생체외 또는 생체내에서 수행되는 것인 방법.

청구항 79

제 65 항 내지 제 78 항 중 어느 한 항에 있어서,

접촉 단계(a) 및/또는 (b)는 대상에서 생체내에서 수행되는 것인 방법.

청구항 80

제 79 항에 있어서,

접촉 단계(a)는 대상에게 조작된 수용체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터 또는 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함

하고; 및/또는 접촉 단계(b)는 대상에게 비천연 리간드를 투여하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 81

제 65 항 내지 제 80 항 중 어느 한 항에 있어서,

접촉 단계(a) 및/또는 (b)는 리포펙션, 나노입자 전달, 입자 충격, 전기천공, 초음파처리 또는 미세주입을 포함하는 것인 방법.

청구항 82

제 65 항 내지 제 81 항 중 어느 한 항에 있어서,

조작된 수용체는 뉴런의 세포 표면에 국소화할 수 있는 것인 방법.

청구항 83

a. 대상에게 제 1 항 내지 제 33 항 중 어느 한 항의 조작된 수용체, 제 34 항 내지 제 40 항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오타이드 또는 제 41 항 내지 제 44 항 중 어느 한 항의 벡터, 제 45 항의 조성물 또는 제 46 항의 약학적 조성물을 투여하는 단계, 및

b. 대상에게 조작된 수용체의 비천연 리간드를 투여하는 단계를 포함하여 필요로 하는 대상에서 신경학적 장애의 개시를 치료 및/또는 지연시키는 방법.

청구항 84

제 83 항에 있어서,

대상은 단계(a) 후에 비천연 리간드를 투여받는 것인 방법.

청구항 85

제 83 항에 있어서,

대상은 단계(a)와 동시에 비천연 리간드를 투여받는 것인 방법.

청구항 86

제 83 항 내지 제 85 항 중 어느 한 항에 있어서,

신경학적 장애는 발작 장애, 운동 장애, 섭식 장애, 척수 손상, 신경인성 방광, 이질통, 경직 장애, 소양증, 알츠하이머병, 파킨슨병, 외상 후 스트레스 장애(PTSD), 위식도 역류 질환(GERD), 중독, 불안, 우울증, 기억 상실, 치매, 수면 무호흡증, 뇌졸중, 기면증, 요실금, 본태성 떨림, 삼차 신경통, 구강 작열감 증후군 또는 심방 세동인 방법.

청구항 87

제 86 항에 있어서,

신경학적 장애는 이질통인 방법.

청구항 88

제 83 항 내지 제 87 항 중 어느 한 항에 있어서,

비천연 리간드는 AZD-0328, ABT-126, TC6987, CNL002, TC-5619, CNL001, TC-6683, 바레니클린 및 파시니클린/RG3487로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 89

제 83 항 내지 제 88 항 중 어느 한 항에 있어서,

비천연 리간드는 경구, 피하, 국소 또는 정맥내로 투여되는 것인 방법.

청구항 90

제 89 항에 있어서,

비천연 리간드는 경구로 투여되는 것인 방법.

청구항 91

제 83 항 내지 제 90 항 중 어느 한 항에 있어서,

조작된 수용체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 조성물 또는 약학적 조성물은 피하, 경구, 경막내, 국소, 정맥내, 신경절내, 신경내, 두개내, 척수내 또는 대수조에 투여되는 것인 방법.

청구항 92

제 83 항 내지 제 91 항 중 어느 한 항에 있어서,

조작된 수용체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 조성물, 또는 약학적 조성물은 추간공 주사에 의해 또는 척수강내로 투여되는 것인 방법.

청구항 93

제 83 항 내지 제 92 항 중 어느 한 항에 있어서,

대상은 삼차 신경통을 앓고 있고, 조작된 수용체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 조성물, 또는 약학적 조성물은 대상의 삼차 신경절(TG)에 투여되는 것인 방법.

청구항 94

제 83 항 내지 제 92 항 중 어느 한 항에 있어서,

대상은 신경병증성 통증을 앓고 있고, 조작된 수용체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 조성물, 또는 약학적 조성물은 대상의 후근 신경절(DRG)에 투여되는 것인 방법.

청구항 95

제 83 항 내지 제 94 항 중 어느 한 항에 있어서,

대상은 인간인 방법.

청구항 96

제 83 항 내지 제 95 항 중 어느 한 항에 있어서,

치료적 유효량은 신경학적 장애의 징후 및/또는 증상의 중증도를 감소시키는 것인 방법.

청구항 97

제 83 항 내지 제 96 항 중 어느 한 항에 있어서,

치료적 유효량은 신경학적 장애의 징후 및/또는 증상의 개시를 지연하는 것인 방법.

청구항 98

제 83 항 내지 제 97 항 중 어느 한 항에 있어서,

치료적 유효량은 신경학적 장애의 징후 및/또는 증상을 제거하는 것인 방법.

청구항 99

제 96 항 내지 제 98 항 중 어느 한 항에 있어서,

신경학적 장애의 징후는 신경 손상, 신경 위축 및/또는 발작인 방법.

청구항 100

제 99 항에 있어서,

신경 손상은 말초 신경 손상인 방법.

청구항 101

제 96 항 내지 제 100 항 중 어느 한 항에 있어서,

신경학적 장애의 증상은 통증인 방법.

청구항 102

a. 대상에게 제 1 항 내지 제 33 항 중 어느 한 항의 조작된 수용체, 제 34 항 내지 제 40 항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오타이드 또는 제 41 항 내지 제 44 항 중 어느 한 항의 벡터, 제 45 항의 조성물 또는 제 46 항의 약학적 조성물을 투여하는 단계, 및

b. 대상에게 조작된 수용체의 비천연 리간드를 투여하는 단계를 포함하여 필요로 하는 대상에서 통증의 개시를 치료 및/또는 지연시키는 방법.

청구항 103

제 102 항에 있어서,

대상은 단계(a) 후에 비천연 리간드를 투여받는 것인 방법.

청구항 104

제 102 항에 있어서,

대상은 단계(a)와 동시에 비천연 리간드를 투여받는 것인 방법.

청구항 105

제 102 항 내지 제 104 항 중 어느 한 항에 있어서,

비천연 리간드는 AZD-0328, ABT-126, TC6987, CNL002, TC-5619, CNL001, TC-6683, 바레니클린 및 파시니클린/RG3487로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 106

제 102 항 내지 제 105 항 중 어느 한 항에 있어서,

비천연 리간드는 경구, 피하, 국소 또는 정맥내로 투여되는 것인 방법.

청구항 107

제 106 항에 있어서,

비천연 리간드는 경구로 투여되는 것인 방법.

청구항 108

제 102 항 내지 제 107 항 중 어느 한 항에 있어서,

조작된 수용체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 조성물 또는 약학적 조성물은 피하, 경구, 경막내, 국소, 정맥내, 신경절내, 신경내, 두개내, 척수내 또는 대수조에 투여되는 것인 방법.

청구항 109

제 102 항 내지 제 108 항 중 어느 한 항에 있어서,

조작된 수용체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 조성물, 또는 약학적 조성물은 추간공 주사에 의해 또는 척수강내로 투여되는 것인 방법.

청구항 110

제 102 항 내지 제 109 항 중 어느 한 항에 있어서,

대상은 삼차 신경통을 앓고 있고, 조작된 수용체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 조성물, 또는 약학적 조성물은 대상의 삼차 신경절(TG)에 투여되는 것인 방법.

청구항 111

제 102 항 내지 제 110 항 중 어느 한 항에 있어서,

대상은 신경병증성 통증을 앓고 있고, 조작된 수용체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 조성물, 또는 약학적 조성물은 대상의 후근 신경절(DRG)에 투여되는 것인 방법.

청구항 112

제 102 항 내지 제 111 항 중 어느 한 항에 있어서,

대상은 인간인 방법.

청구항 113

제 101 항 내지 제 112 항 중 어느 한 항에 있어서,

통증은 신경병성 통증인 방법.

청구항 114

제 101 항 내지 제 113 항 중 어느 한 항에 있어서,

통증은 화학요법과 연관되거나, 이에 의해 야기되거나, 또는 이로부터 초래되는 것인 방법.

청구항 115

제 101 항 내지 제 114 항 중 어느 한 항에 있어서,

통증은 외상과 연관되거나, 외상에 의해 야기되거나, 외상으로부터 초래되는 것인 방법.

청구항 116

제 101 항 내지 제 115 항 중 어느 한 항에 있어서,

대상은 이질통을 앓고 있는 것인 방법.

청구항 117

제 101 항 내지 제 116 항 중 어느 한 항에 있어서,

통증은 의료 시술 후에 나타나는 것인 방법.

청구항 118

제 101 항 내지 제 117 항 중 어느 한 항에 있어서,

통증은 출산 또는 제왕절개와 연관되거나, 이에 의해 야기되거나, 또는 이로부터 초래되는 것인 방법.

청구항 119

제 101 항 내지 제 118 항 중 어느 한 항에 있어서,

통증은 편두통과 연관되거나, 이에 의해 야기되거나, 또는 이로부터 초래되는 것인 방법.

청구항 120

제 101 항 내지 제 119 항 중 어느 한 항에 있어서,

치료적 유효량은 대상의 통증을 일시적으로 감소시키고, 대상의 통증을 영구적으로 감소시키고, 대상의 통증 개시를 예방하고/하거나 대상의 통증을 제거하는 것인 방법.

청구항 121

제 101 항 내지 제 120 항 중 어느 한 항에 있어서,

단계(a) 및 (b)는 대상에서 통증이 나타나기 전에 수행되는 것인 방법.

청구항 122

(a) 제 41 항 내지 제 44 항 중 어느 한 항의 벡터 및 (b) 조작된 수용체의 비천연 리간드를 포함하는 키트.

청구항 123

(a) 제 1 항 내지 제 33 항 중 어느 한 항의 조작된 수용체, 및 (b) 조작된 수용체의 비천연 리간드를 포함하는 키트.

청구항 124

제 122 항 또는 제 123 항에 있어서,

조작된 수용체 및 비천연 리간드의 조합은 표 29에 제공된 조합 중 어느 하나에 따르는 것인 키트.

청구항 125

제 122 항 또는 제 124 항에 있어서,

벡터의 투여에 적합한 장치를 포함하는 키트.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 세포의 활성을 조절하고 질환을 치료하기 위한 조작된 수용체 및 조작된 수용체 및 소분자 리간드의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 난치성 신경학적 질환은 종종 비정상적으로 작용하는 뉴런과 관련이 있다. 이러한 상태를 치료하기 위한 치료법을 개발하려는 시도는 질환과 관련된 다루기 쉬운 표적 단백질의 부족으로 인해 방해를 받았다. 예를 들어, 완화되지 않는 만성 통증은 미국과 전 세계적으로 중요한 건강 문제이다. 의학 연구소의 보고서는 1억 1,600만 명의 미국인이 몇 주에서 몇 년 동안 지속되는 통증으로 고통 받으며, 그 결과 연간 비용은 5,600억 달러를 초과한다고 예측하였다. 만성 통증 환자를 위한 적절한 장기 치료법이 없기 때문에 사회와 개인 모두에게 상당한 비용이 든다. 통증은 종종 장애로 이어지며, 장애가 아닌 경우에도, 삶의 질에 지대한 영향을 미친다. 세심하고 잘 훈련된 의사; 오피오이드에 대한 접근성; 보조 진통제 사용; 환자 조절 진통제의 가용성; 신경 차단 및 IT 펌프와 같은 절차의 증거 기반 사용과 같이 치료 제공 환경이 최적인 경우에도 통증 치료는 자주 실패한다.

[0003] 만성 통증에 가장 흔히 사용되는 치료법은 오피오이드 진통제 및 비스테로이드성 소염진통제를 적용하는 것이지만, 이들 약물은 중독을 유발할 수 있고 약물 의존성, 내성, 호흡 억제, 진정작용, 인지기능 감퇴, 환각 및 기타 전신 부작용과 같은 부작용을 유발할 수 있다. 의약품의 광범위한 사용에도 불구하고, 통증 완화 효과에 대한 성공률은 현저히 낮다. 다양한 약물에 대한 대규모 무작위 연구는 환자 2명 또는 3명 중 1명만이 적어도 50% 통증 완화를 성취하였다는 것을 발견하였다(Finnerup *et al.*, 2005). 가장 발전된 약리학적 치료법을 사용한 후속 연구에서도 동일한 결과가 발견되어 통증에 대한 약물의 효능이 개선되지 않았음을 나타낸다(Finnerup *et al.*, *Pain*, 150(3):573-81, 2010).

[0004] 통증 치료를 위한 보다 침습적인 옵션은 신경 차단 및 전기 자극을 포함한다. 신경 차단은 일반적으로 뇌에 대한 통증 신호를 차단하기 위해 척수에 국소 마취제 주입이며, 이의 효과는 몇 주에서 몇 달 동안만 지속된다. 신경 차단은 대부분의 경우 권장되는 치료 옵션이 아니다(Mailis and Taenzer, *Pain Res Manag.* 17(3):150-158, 2012). 전기 자극은 통증 신호를 차단하기 위해 전류를 제공하는 것과 관련된다. 그 효과가 신경 차단보다

오래 지속될 수 있지만, 합병증은 전기 배선 자체 의해 발생한다: 탈구, 감염, 파손 또는 배터리 소진. 한 검토는 신경병증에 대한 전기 자극으로 치료받은 환자의 40%가 장치와 관련하여 이러한 문제 중 하나 이상을 경험한 것을 발견하였다(Wolter, 2014).

[0005] 통증 관리를 위한 가장 침습적이며 가장 덜 선호되는 방법은 통증을 유발하는 신경 또는 이의 부분을 완전히 외과적으로 제거하는 것이다. 이 옵션은 환자가 전자 및 기타 덜 침습적인 치료를 소진하고 효과가 없다고 판단한 경우에만 권장된다. 고주파 신경 절제술은 문제가 있는 신경을 파괴하기 위해 열을 사용하고 신경 차단보다 더 긴 통증 완화를 제공한다. 그러나, 한 연구는 만성 요천추 신경근 통증에 대한 DRG의 부분 고주파 병변에서 대조군과 치료군 간에 차이가 없음을 발견하였다(Geurts et al., 2003). 통증 신경을 외과적으로 제거하기 위한 다른 외과적 방법은 유사한 결점을 갖고 있으며 감각 또는 운동 장애를 포함하여 장기적으로 심각한 부작용을 일으키거나 다른 곳에서 통증을 유발한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 신경학적 장애를 치료하는 방법은 안전하고 효율적이며 비용 효율적이어야 한다. 유전자 요법은 통증 관리를 포함하여 다양한 신경학적 질환에 대한 비침습적 치료 옵션을 제공할 수 있다. 그러나, 현재까지, 유전자 치료 방법은 신경학적 질환 치료에 널리 사용되지 않았음을 발견하였다. 본 발명은 이러한 요구를 다룬다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR)로부터 유래된 리간드 결합 도메인을 포함하는 조작된 수용체를 제공하며, 여기서 리간드 결합 도메인은 SEQ ID NO: 4의 W77, R101, Y115, L131, Q139, Y140, S170, S172 또는 Y210에 상응하는 아미노산 잔기에서 아미노산 돌연변이를 포함한다. 일부 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 SEQ ID NO: 4의 아미노산 잔기 23-220과 적어도 85% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 SEQ ID NO: 4의 W77, R101, Y115, L131, Q139, Y140, S170, S172 및 Y210에 상응하는 아미노산 잔기로부터 선택된 2개 이상의 아미노산 잔기에서 아미노산 돌연변이를 포함한다. 일부 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 SEQ ID NO: 4의 지시된 위치에 상응하는 아미노산 잔기(들)에서 돌연변이를 포함한다:

[0008] a) Y140;

[0009] b) R101 및 L131;

[0010] c) Y115 및 Y210;

[0011] d) R101 및 Y210;

[0012] e) R101, Y115 및 Y210;

[0013] f) W77, R101 및 L131;

[0014] g) R101, L131 및 S172;

[0015] h) Q139 및 S172D;

[0016] i) S172 및 Y210

[0017] j) L131 및 S172;

[0018] k) Y115 및 S170; 또는

[0019] l) Y115 및 L131.

[0020] 일부 실시태양에서, 돌연변이는 아미노산 치환이다. 일부 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 SEQ ID NO: 4의 지시된 위치에 상응하는 아미노산 치환(들)을 포함한다:

[0021] a) Y140I;

[0022] b) R101F 및 L131G;

[0023] c) R101F 및 L131D;

[0024] d) Y115E 및 Y210W;

[0025] e) R101W 및 Y210V;

[0026] f) R101F 및 Y210V;

[0027] g) R101F 및 Y210F;

[0028] h) R101M 및 L131A;

[0029] i) R101M 및 L131F;

[0030] j) R101W, Y115E 및 Y210W;

[0031] k) R101F, Y115E 및 Y210W;

[0032] l) W77F, R101F 및 L131D;

[0033] m) R101F, L131N 및 S172D;

[0034] n) Q139E 및 S172D;

[0035] o) S172D 및 Y210W;

[0036] p) L131S 및 S172D;

[0037] q) L131T 및 S172D;

[0038] r) L131D 및 S172D;

[0039] s) Y115D 및 S170T;

[0040] t) Y115D 및 L131Q;

[0041] u) Y115D 및 L131E;

[0042] v) L131E;

[0043] w) Y140C;

[0044] x) R101W;

[0045] y) Y210V; 또는

[0046] z) Q139E.

[0047] 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 글리신 수용체로부터 유래된 이온 기공 도메인을 포함하는 키메라 리간드-개폐 이온 채널(LGIC) 수용체이다. 일부 실시태양에서, 인간 글리신 수용체는 인간 글리신 수용체 α1, 인간 글리신 수용체 α2, 또는 인간 글리신 수용체 α3이다. 일부 실시태양에서, 이온 기공 도메인은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 255-457, SEQ ID NO: 83의 아미노산 260-452, SEQ ID NO: 85의 아미노산 259-464 또는 SEQ ID NO: 87의 아미노산 259-449와 적어도 85% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체의 리간드 결합 도메인은 인간 글리신 수용체로부터 유래된 Cys-루프 도메인을 포함한다. 일부 실시태양에서, Cys-루프 도메인은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 166-172를 포함한다. 일부 실시태양에서, Cys-루프 도메인은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 166-180을 포함한다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체의 리간드 결합 도메인은 인간 글리신 수용체 α1 서브유닛으로부터의 β1-2 루프 도메인을 포함한다. 일부 실시태양에서, β1-2 루프 도메인은 SEQ ID NO:2의 아미노산 81-84를 포함한다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 SEQ ID NOs 58-78 및 88 중 어느 하나에 따른 아미노산 서열을 포함한다.

[0048] 본 발명은 제 1 LGIC로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 제 2 LGIC로부터 유래된 이온 기공 도메인을 포함하는 조작된 키메라 리간드-개폐 이온 채널(LGIC)을 제공하며, 여기서 제 1 LGIC는 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7- nAChR)이고 SEQ ID NO: 4의 W77, R101, Y115, L131, Q139, Y140, S170, S172 또는 Y210에 상응하는 아미노산 잔기에서 아미노산 돌연변이를 포함한다.

[0049] 일부 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 SEQ ID NO: 4의 지시된 위치에 상응하는 아미노산 잔기(들)에서 돌연

변이를 포함한다:

[0050] a. Y140;

[0051] b. R101 및 L131;

[0052] c. Y115 및 Y210;

[0053] d. R101 및 Y210;

[0054] e. R101, Y115 및 Y210;

[0055] f. W77, R101 및 L131;

[0056] g. R101, L131 및 S172;

[0057] h. Q139 및 S172D;

[0058] i. S172 및 Y210

[0059] j. L131 및 S172;

[0060] k. Y115 및 S170; 또는

[0061] l. Y115 및 L131

[0062] 일부 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 SEQ ID NO: 4의 지시된 위치에 상응하는 아미노산 치환(들)을 포함한다:

[0063] a. Y140I;

[0064] b. R101F 및 L131G;

[0065] c. R101F 및 L131D;

[0066] d. Y115E 및 Y210W;

[0067] e. R101W 및 Y210V;

[0068] f. R101F 및 Y210V;

[0069] g. R101F 및 Y210F;

[0070] h. R101M 및 L131A;

[0071] i. R101M 및 L131F;

[0072] j. R101W, Y115E 및 Y210W;

[0073] k. R101F, Y115E 및 Y210W;

[0074] l. W77F, R101F 및 L131D;

[0075] m. R101F, L131N 및 S172D;

[0076] n. Q139E 및 S172D;

[0077] o. S172D 및 Y210W;

[0078] p. L131S 및 S172D;

[0079] q. L131T 및 S172D;

[0080] r. L131D 및 S172D;

[0081] s. Y115D 및 S170T;

[0082] t. Y115D 및 L131Q;

[0083] u. Y115D 및 L131E;

[0084] v. L131E;

[0085] w. Y140C;

[0086] x. R101W;

[0087] y. Y210V; 또는

[0088] z. Q139E.

[0089] 일부 실시태양에서, 제 2 LGIC는 인간 글리신 수용체이다. 일부 실시태양에서, 인간 글리신 수용체는 인간 글리신 수용체 α1이다. 일부 실시태양에서, 조작된 키메라 LGIC는 SEQ ID NO: 33과 적어도 85%의 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드 서열을 포함한다.

[0090] 일부 실시태양에서, 아세틸콜린에 대한 조작된 수용체의 효능은 아세틸콜린에 대한 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR) 또는 대조군 수용체의 효능보다 낮다. 일부 실시태양에서, 아세틸콜린에 대한 조작된 수용체의 효능은 아세틸콜린에 대한 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR) 또는 대조군 수용체의 효능보다 적어도 2배 더 낮다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드에 대한 조작된 수용체의 효능은 비천연 리간드에 대한 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR) 또는 대조군 수용체의 효능과 거의 동일하다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드에 대한 조작된 수용체의 효능은 비천연 리간드에 대한 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR) 또는 대조군 수용체의 효능보다 더 높다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드에 대한 조작된 수용체의 효능은 비천연 리간드에 대한 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR) 또는 대조군 수용체의 효능보다 적어도 2배 더 높다. 일부 실시태양에서, 리간드에 대한 조작된 수용체의 효능은 Lenti-X 293T 세포를 사용하는 YFP 형광 소광 검정에 따라 리간드에 대한 수용체의 EC50에 의해 결정된다.

[0091] 일부 실시태양에서, 비천연 리간드의 존재하에서 조작된 수용체의 효능은 비천연 리간드의 존재하에서 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR) 또는 대조군 수용체의 효능보다 더 높다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드의 존재하에서 조작된 수용체의 효능은 비천연 리간드의 존재하에서 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR) 또는 대조군 수용체의 효능보다 적어도 2배 더 높다. 일부 실시태양에서, 효능을 결정하는 것은 비천연 리간드의 존재하에서 시험관 내에서 조작된 수용체를 통과하는 전류의 양을 결정하는 것을 포함한다.

[0092] 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 AZD-0328, TC-6987, ABT-126, CNL002, TC-5619, CNL001, TC-6683, 바레니클린 및 파시니클린/RG3487로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 ABT-126, RG3487 및 CNL002로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 TC-5619이다.

[0093] 본 발명은 본 발명의 조작된 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 일부 실시태양에서, 폴리뉴클레오타이드는 SEQ ID NO: 58-78 및 88 중 임의의 하나의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 수용체를 암호화한다. 일부 실시태양에서, 폴리뉴클레오타이드는 조작된 수용체를 암호화하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함한다. 일부 실시태양에서, 프로모터는 조절가능한 프로모터이다. 일부 실시태양에서, 조절가능한 프로모터는 흥분성 세포에서 활성이 있다. 일부 실시태양에서, 흥분성 세포는 뉴런 또는 근세포이다. 일부 실시태양에서, 흥분성 세포는 뉴런이다.

[0094] 본 발명은 본 명세서에 개시된 폴리뉴클레오타이드 중 임의의 하나를 포함하는 벡터를 제공한다. 일부 실시태양에서, 벡터는 플라스미드 또는 바이러스 벡터이다. 일부 실시태양에서, 벡터는 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노 관련 바이러스(AAV) 벡터 및 단순 헤르페스-1 바이러스 벡터(HSV-1)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 바이러스 벡터이다. 일부 실시태양에서, 바이러스 벡터는 AVV 벡터이고, AAV 벡터는 AAV5 또는 이의 변이체, AAV6 또는 이의 변이체 또는 AAV9 또는 이의 변이체이다.

[0095] 본 발명은 본 명세서에 개시된 조작된 수용체 중 임의의 하나, 본 명세서에 개시된 폴리뉴클레오타이드 중 임의의 하나, 또는 본 명세서에 개시된 벡터 중 임의의 하나를 포함하는 조성물을 제공한다. 본 발명은 본 명세서에 개시된 조작된 수용체 중 임의의 하나, 본 명세서에 개시된 폴리뉴클레오타이드 중 임의의 하나, 또는 본 명세서에 개시된 벡터 중 임의의 하나 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 추가로 제공한다.

[0096] 본 발명은 뉴런을 본 명세서에 개시된 폴리뉴클레오타이드 중 임의의 하나, 본명세서에 개시된 벡터 중 임의의 하나, 본 명세서에 개시된 조성물 중 임의의 하나, 또는 본 명세서에 개시된 약학적 조성물과 접촉하는 단계를 포함하여 뉴런에서 조작된 수용체를 발현하는 방법을 제공한다. 일부 실시태양에서, 뉴런은 말초신경계의 뉴런이다. 일부 실시태양에서, 뉴런은 중추신경계의 뉴런이다. 일부 실시태양에서, 뉴런은 통각 수용성 뉴런이다.

일부 실시태양에서, 뉴런은 비통각 수용성 뉴런이다. 일부 실시태양에서, 뉴런은 후근신경절(DRG) 뉴런, 삼차신경절(TG) 뉴런, 운동 뉴런, 흥분성 뉴런, 억제성 뉴런, 또는 감각 뉴런이다. 일부 실시태양에서, 뉴런은 Aδ 구심성 섬유, C 섬유 또는 Aβ 구심성 섬유이다. 일부 실시태양에서, 뉴런은 Aβ 구심성 섬유이다. 일부 실시태양에서, Aβ 구심성 섬유는 손상된 Aβ 구심성 섬유이다. 일부 실시태양에서, Aβ 구심성 섬유는 손상되지 않은 Aβ 구심성 섬유이다. 일부 실시태양에서, 뉴런은 신경필라멘트 200(NF200), 피에조 2 및 TLR-5를 발현한다. 일부 실시태양에서, 뉴런은 TrpV1, 전립선산 포스파타제, NaV1.1을 발현하지 않는다.

[0097] 일부 실시태양에서, 접촉 단계는 시험관내, 생체외 또는 생체내에서 수행된다. 일부 실시태양에서, 접촉 단계는 대상에서 생체내에서 수행된다. 일부 실시태양에서, 접촉 단계는 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 조성물, 또는 약학적 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시태양에서, 접촉 단계는 시험관내 또는 생체외에서 수행된다. 일부 실시태양에서, 접촉 단계는 리포펙션, 나노입자 전달, 입자 충격, 전기천공, 초음파처리 또는 미세주입을 포함한다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 뉴런의 세포 표면에 국소화할 수 있다.

[0098] 본 발명은 (a) 뉴런을 본 명세서에 개시된 조작된 수용체 중 임의의 하나, 본 명세서에 개시된 폴리뉴클레오타이드 중 임의의 하나, 본 명세서에 개시된 벡터 중 임의의 하나, 본 명세서에 개시된 조성물, 또는 본 명세서에 개시된 약학적 조성물 중 임의의 하나와 접촉시키는 단계, 및 (b) 뉴런을 조작된 수용체의 비천연 리간드와 접촉시키는 단계를 포함하여 뉴런의 활성을 억제하는 방법을 제공한다. 일부 실시태양에서, 뉴런은 말초신경계의 뉴런이다. 일부 실시태양에서, 뉴런은 중추신경계의 뉴런이다. 일부 실시태양에서, 뉴런은 통각 수용성 뉴런이다. 일부 실시태양에서, 뉴런은 비통각 수용성 뉴런이다. 일부 실시태양에서, 뉴런은 후근신경절(DRG) 뉴런, 삼차신경절(TG) 뉴런, 운동 뉴런, 흥분성 뉴런, 억제성 뉴런, 또는 감각 뉴런이다. 일부 실시태양에서, 뉴런은 Aδ 구심성 섬유, C 섬유 또는 Aβ 구심성 섬유이다. 일부 실시태양에서, 뉴런은 Aβ 구심성 섬유이다. 일부 실시태양에서, Aβ 구심성 섬유는 손상된 Aβ 구심성 섬유이다. 일부 실시태양에서, Aβ 구심성 섬유는 손상되지 않은 Aβ 구심성 섬유이다. 일부 실시태양에서, 뉴런은 신경필라멘트 200(NF200), 피에조 2 및 TLR-5를 발현한다. 일부 실시태양에서, 뉴런은 TrpV1, 전립선산 포스파타제, NaV1.1을 발현하지 않는다.

[0099] 일부 실시태양에서, 접촉 단계(a)는 시험관내, 생체외 또는 생체내에서 수행된다. 일부 실시태양에서, 접촉 단계(b)는 시험관내, 생체외 또는 생체내에서 수행된다. 일부 실시태양에서, 접촉 단계(a) 및/또는 (b)는 대상에서 생체내에서 수행된다. 일부 실시태양에서, 접촉 단계(a)는 조작된 수용체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터 또는 약학적 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함하고; 및/또는 접촉 단계(b)는 대상에게 비천연 리간드를 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시태양에서, 접촉 단계(a) 및/또는 (b)는 리포펙션, 나노입자 전달, 입자 충격, 전기천공, 초음파처리 또는 미세주입을 포함한다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 뉴런의 세포 표면에 국소화할 수 있다.

[0100] 본 발명은 치료 유효량의 본 명세서에 개시된 조작된 수용체 중 어느 하나, 본 명세서에 개시된 폴리뉴클레오타이드, 본 명세서에 개시된 벡터 중 임의의 하나, 본 명세서에 개시된 조성물 중 임의의 하나, 또는 본 명세서에 개시된 약학적 조성물 중 임의의 하나를 대상에게 투여하는 단계, 및 조작된 수용체의 비천연 리간드를 대상에게 투여하는 단계를 포함하여 필요로 하는 대상에서 신경학적 장애의 개시를 치료 및/또는 지연시키는 방법을 제공한다. 일부 실시태양에서, 대상은 단계(a) 후에 비천연 리간드를 투여받는다. 일부 실시태양에서, 대상은 단계(a)와 동시에 비천연 리간드를 투여받는다.

[0101] 일부 실시태양에서, 신경학적 장애는 발작 장애, 운동 장애, 섭식 장애, 척수 손상, 신경인성 방광, 이질통, 경직 장애, 소양증, 알츠하이머병, 파킨슨병, 외상 후 스트레스 장애(PTSD), 위식도 역류 질환(GERD), 중독, 불안, 우울증, 기억 상실, 치매, 수면 무호흡증, 뇌졸중, 기면증, 요실금, 본태성 떨림, 삼차 신경통, 구강 작열감 증후군 또는 심방 세동이다. 일부 실시태양에서, 신경학적 장애는 이질통이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 AZD-0328, ABT-126, TC6987, CNL002, TC-5619, CNL001, TC-6683, 바레니클린 및 파시니클린/RG3487로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0102] 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 경구, 피하, 국소 또는 정맥내로 투여된다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 경구로 투여된다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 조성물 또는 약학적 조성물은 피하, 경구, 경막내, 국소, 정맥내, 신경절내, 신경내, 두개내, 척수내 또는 대수조에 투여된다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 조성물, 또는 약학적 조성물은 추간공 주사에 의해 또는 척수강내로 투여된다. 일부 실시태양에서, 대상은 삼차 신경통을 앓고 있고, 조작된 수용체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 조성물, 또는 약학적 조성물은 대상의 삼차 신경절(TG)에 투여된다. 일부 실시태양에서, 대상은 신경병증성 통증을 앓고 있고, 조작된 수용체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 조성물, 또는 약학적 조성물은 대상

의 후근 신경절(DRG)에 투여된다. 일부 실시태양에서, 대상은 인간이다.

[0103] 일부 실시태양에서, 치료적 유효량은 신경학적 장애의 징후 및/또는 증상의 중증도를 감소시킨다. 일부 실시태양에서, 치료적 유효량은 신경학적 장애의 징후 및/또는 증상의 개시를 지연시킨다. 일부 실시태양에서, 치료적 유효량은 신경학적 장애의 징후 및/또는 증상을 제거한다. 일부 실시태양에서, 신경학적 장애의 징후는 신경 손상, 신경 위축 및/또는 발작이다. 일부 실시태양에서, 신경 손상은 말초 신경 손상이다. 일부 실시태양에서, 신경학적 장애의 증상은 통증이다.

[0104] 본 발명은 치료적 유효량의 본 명세서에 개시된 조작된 수용체 중 어느 하나, 본 명세서에 개시된 폴리뉴클레오타이드, 본 명세서에 개시된 벡터 중 임의의 하나, 본 명세서에 개시된 조성물 중 임의의 하나 또는 본 명세서에 개시된 약학적 조성물 중 임의의 하나를 대상에게 투여하는 단계, 및 조작된 수용체의 비천연 리간드를 대상에게 투여하는 단계를 포함하여 필요로 하는 대상에서 통증의 개시를 치료 및/또는 지연시키는 방법을 제공한다. 일부 실시태양에서, 대상은 단계(a) 후에 비천연 리간드를 투여받는다. 일부 실시태양에서, 대상은 단계(a)와 동시에 비천연 리간드를 투여받는다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 AZD-0328, ABT-126, TC6987, CNL002, TC-5619, CNL001, TC-6683, 바레니클린 및 파시니클린/RG3487로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

[0105] 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 경구, 피하, 국소 또는 정맥내로 투여된다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 경구로 투여된다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 조성물 또는 약학적 조성물은 피하, 경구, 경막내, 국소, 정맥내, 신경절내, 신경내, 두개내, 척수내 또는 대수조에 투여된다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 조성물, 또는 약학적 조성물은 추간공 주사에 의해 또는 척수강내로 투여된다.

[0106] 일부 실시태양에서, 대상은 삼차 신경통을 앓고 있고, 여기서 조작된 수용체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 조성물, 또는 약학적 조성물은 대상의 삼차신경절(TG)에 투여된다. 일부 실시태양에서, 대상은 신경병증성 통증을 앓고 있고, 조작된 수용체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 조성물, 또는 약학적 조성물은 대상의 후근 신경절(DRG)에 투여된다.

[0107] 일부 실시태양에서, 대상은 인간이다. 일부 실시태양에서, 통증은 신경병성 통증이다. 일부 실시태양에서, 통증은 화학요법과 연관되거나, 이에 의해 야기되거나, 또는 이로부터 초래된다. 일부 실시예에서, 통증은 외상과 연관되거나, 외상에 의해 야기되거나, 외상으로부터 초래된다. 일부 실시태양에서, 대상은 이질통을 앓고 있다. 일부 실시태양에서, 통증은 의료 시술 후에 나타난다. 일부 실시태양에서, 통증은 출산 또는 제왕절개와 연관되거나, 이에 의해 야기되거나, 또는 이로부터 초래된다. 일부 실시태양에서, 통증은 편두통과 연관되거나, 이에 의해 야기되거나, 또는 이로부터 초래된다. 일부 실시태양에서, 치료적 유효량은 대상의 통증을 일시적으로 감소시키고, 대상의 통증을 영구적으로 감소시키고, 대상의 통증 개시를 예방하고/하거나 대상의 통증을 제거한다. 일부 실시태양에서, 단계(a) 및 (b)는 대상에서 통증이 나타나기 전에 수행된다.

[0108] 본 발명은 (a) 본 발명의 벡터 및 (b) 벡터에 의해 암호화된 조작된 수용체의 비천연 리간드를 포함하는 키트를 제공한다. 본 발명은 (a) 본 발명의 조작된 수용체, 및 (b) 조작된 수용체의 비천연 리간드를 포함하는 키트를 제공한다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체 및 비천연 리간드의 조합은 표 29에 제공된 조합 중 어느 하나에 따른다. 일부 실시태양에서, 키트는 벡터의 투여에 적합한 장치를 포함한다.

발명의 효과

[0109] 본 발명의 내용 중에 포함되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0110] 본 발명은 첨부된 도면과 함께 읽을 때 다음의 상세한 설명으로부터 가장 잘 이해된다. 특허 또는 출원 파일은 컬러로 작성된 적어도 하나의 도면을 함유한다. 일반적인 관례에 따르면, 도면의 다양한 특징부는 축척에 맞지 않는다는 점을 강조한다. 반대로, 다양한 특징부의 치수는 명확성을 위해 임의로 확장되거나 축소된다. 다음 특징부들이 도면에 포함된다:

도 1a - 도 1j는 다양한 투여량의 아세틸콜린 또는 표시된 비천연 리간드에 의한 자극 후 표시된 아미노산 치환을 포함하는 조작된 키메라 수용체 SEQ ID NO: 33의 돌연변이체에서 YFP 형광의 소광 백분율의 열 지도를 도시한다. 리간드 투여량은 각 차트의 상단에 기록된다. 상자 안의 숫자는 관찰된 소광의 상대적인 양을 도시한다.

더 높은 수준의 소광은 지시된 투여량에서 리간드에 의한 더 높은 수준의 수용체 활성화를 도시한다. 소광 수준은 색상 그라데이션으로도 표시된다. 어두운 색 = YFP 리포터의 최대 소광의 70% 초과(즉, 대부분의 조작된 수용체가 활성화된다). 흰색 = 10% 미만 소광(즉, 조작된 수용체 중 일부가 활성화된다). 음수 값은 자극 흔적(stimulation artifact)으로 인해 음수 소광이 있는 비반응자를 나타낸다. SEQ ID NO: 29는 음성 대조군으로 사용되는 비반응 키메라이다. CODA283은 복제 중에 도입된 추가 N379K 돌연변이를 포함하며, 이는 리간드 결합 도메인 외부에 위치하므로 리간드 결합에 영향을 미치지 않는다. **도 1a**는 아세틸콜린을 사용한 YFP 형광 소광을 도시하고; **도 1b**는 CNL001을 사용한 YFP 형광 소광을 도시하고; **도 1c**는 TC-6683을 사용한 YFP 형광 소광을 도시하고; **도 1d**는 TC-5619/브라다니클린을 사용한 YFP 형광 소광을 도시하고; **도 1e**는 CNL002를 사용한 YFP 형광 소광을 도시하고; **도 1f**는 ABT-126을 사용한 YFP 형광 소광을 도시하고; **도 1g**는 AZD-0328을 사용한 YFP 형광 소광을 도시하고; **도 1h**는 파시니클린을 사용한 YFP 형광 소광을 도시하고; **도 1i**는 TC-6987을 사용한 YFP 형광 소광을 도시하고; **도 1j**는 바레니클린을 사용한 YFP 형광 소광을 도시한다. 비고유 리간드 이름에 대한 약어: abt: ABT-126; ach: 아세틸콜린; azd: AZD-0328; brd: TC-5619(브라다니클린); fac: RG3487(파시니클린); tc6: TC-6987; var: 바레니클린.

도 2a - 도 2b는 아세틸콜린뿐만 아니라 비천연 리간드 RG-3487(SA-2, Synthetic Agonist-2)에 대해 HEK 293 세포에서 발현된 CR-11(화학적 수용체-11, SEQ ID NO: 33에서 Y115D 및 L131Q의 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 조작된 수용체)의 농도-반응 곡선을 도시한다. 응답은 수동 패치 클램프 전기 생리학을 사용하여 평가되었다. 전력은 최대 응답을 위해 1로 정규화하였다. 데이터 포인트를 통과하는 연속선은 힐(Hill) 방정식으로 얻은 가장 적합한 적합이며 각 리간드에 대한 EC50은 농도-반응 곡선에서 추정된다. **도 2a**는 아세틸콜린에 대한 야생형 및 CR-11 수용체의 농도-반응 곡선을 도시한다. **도 2b**는 RG-3487(SA-2)에 대한 야생형 및 CR-11 수용체의 농도-반응 곡선을 도시한다.

도 3은 도 0012 도 3은 CR-11을 발현하는 렌티바이러스로 형질도입된 성인 래트 DRG 뉴런에서 RG-3487(SA-2)에 의해 유도된 예시적인 클로라이드 전류를 도시한다(화학적 수용체-11, SEQ ID NO: 33에서 Y115D 및 L131Q의 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 조작된 수용체).

도 4a는 다른 전류 주입(50pA 내지 700pA)에서 CR-11(SEQ ID NO: 33에서 Y115D 및 L131Q의 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 조작된 수용체)을 발현하는 형질도입된 DRG 뉴런 또는 대조군 DRG 뉴런(CR-11 발현 없음)의 유발된 활동 전위를 도시한다. 상단 패널은 제어 DGF 뉴런의 유발 활동 전위를 도시한다. 왼쪽 하단 패널은 3μM RG-3487(SA-2)의 존재하에서 CR-11을 발현하는 형질도입된 DRG 뉴런의 유발된 활동 전위를 도시한다. 오른쪽 아래 패널은 RG-3487(SA-2)이 씻어낸 후 CR-11을 발현하는 형질도입된 DRG 뉴런의 유발 활동 전위를 도시한다. **도 4b**는 지시된 리간드의 부재 또는 존재하에서 CR-11을 발현하는 형질도입된 DRG 뉴런 및 대조군 DRG 뉴런에 대한 레오베이스 값(활동 전위를 유도하는데 필요한 전류)을 도시한다.

도 5는 SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 발현하는 대조군 세포에 대해 정규화된, 조작된 수용체를 발현하고 있는 HA-태그 양성 세포의 %("정규화된 HA %") 및 SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 발현하는 대조군 세포에 대해 정규화된 조작된 수용체를 발현하고 있는 α-벙가로톡신 양성 세포의 %("정규화된 AB %")를 도시한다. **도 5**는 또한 항-HA 항체("정규화된 HA MFI")를 사용하거나 또는 형광적으로 평가된 Alexa Fluor 647에 접합된 형광 표지된 α-벙가로톡신("정규화된 AB MFI")을 사용하여 평가된 바와 같이, SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 발현하는 대조군 세포로 정규화된 조작된 수용체를 발현하는 세포의 중앙 형광 강도(MFI)를 도시한다.

도 6a는 배양된 DRG 뉴런 또는 HEK 세포에서 지시된 조작된 수용체의 상대적인 표면 및 전체 발현을 도시한다. **도 6b**는 배양된 해마 뉴런에서 지시된 조작된 수용체의 상대적인 표면 및 전체 발현을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0111] **A. 개요**

[0112] 조작된 리간드-개폐 이온 통로(LGIC) 수용체, 폴리뉴클레오타이드 암호화된 조작된 LGIC 수용체, 및 조작된 LGIC 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 유전자 요법 벡터를 이용하여 세포의 활성을 조절하는 조성물 및 방법이 제공된다. 이들 조성물 및 방법은 뉴런, 예를 들어, 질환의 치료에서 또는 뉴런회로의 연구에서, 뉴런의 활성을 조절함에 있어서 특정 용도를 발견한다. 추가로, 대상 방법을 실행함에 있어서 용도를 발견하는 시약, 장치 및 이의 키트가 제공된다.

[0113] 특히, 본 발명은 리간드에 결합하고 이에 반응하여 신호전달하는 조작된 수용체를 제공한다. 일부 실시태양에서, 리간드는 약물이다. 일부 실시태양에서, 리간드는 "결합제"로 불린다. 일부 실시태양에서, 본 명

세서에 기술된 조작된 수용체는 공지된 효현제 리간드에 대해 증가된 친화도를 입증한다. 일부 실시태양에서, 본 명세서에 기술된 조작된 수용체는 길항제 또는 조절제 리간드에 대한 친화도를 입증하며, 이들이 효현제 리간드인 것과 같이 길항제 및/또는 조절제 리간드에 반응한다. 본 발명은 신경학적 질환의 치료가 필요한 대상에서 신경학적 질환을 치료하는 방법을 추가로 제공한다. 본 발명은 야생형 내인성 수용체와 별개인 방식으로 공지된 약물에 반응하는 조작된 수용체를 이용함으로써 공지된 약물이 사용될 수 있다는 임상적 적응증의 수를 증가시킨다.

[0114] 본 방법 및 조성물을 기술하기 전에, 본 발명은 기술된 특정 방법 또는 조성물로 제한되지 않으며, 이들은 물론 달라질 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 또한 본 명세서에서 사용되는 용어는 단지 특정의 실시태양을 기술하는 목적을 위한 것이며, 제한하는 것으로 의도되지 않는다는 것이 이해되어야 하는데, 본 발명의 범주는 첨부된 청구항에 의해서만 제한될 것이기 때문이다.

[0115] 다양한 값이 제공되는 경우에, 문맥이 달리 분명하게 나타내지 않는 한 하한 단위의 1/10까지의 각각의 개재값, 해당 범위의 상한과 하한이 또한 구체적으로 개시된다는 것이 이해된다. 임의의 언급된 값 또는 언급된 범위 내의 개재값과 임의의 다른 언급되거나 상기 언급된 범위에서의 개재값 사이의 각각의 더 작은 범위는 본 발명에 포함된다. 이들 더 작은 범위의 상한 및 하한은 해당 범위에 독립적으로 포함되거나 제외될 수 있고, 한계 중 하나, 둘 다가 더 작은 범위에 포함되거나 어떤 것도 포함되지 않는 각각의 범위는 또한 본 발명에 포함되며, 언급된 범위에서 임의의 구체적으로 제한된 한계로 처리된다. 언급된 범위가 한계 중 하나 또는 둘 다를 포함하는 경우에, 한계를 포함하는 것 중 하나 또는 둘 다를 제외하는 범위가 또한 본 발명에 포함된다.

[0116] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모들 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본 명세서에 기술된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 물질이 본 발명의 실행 또는 시험에서 사용될 수 있지만, 일부 잠재적이고 바람직한 방법 및 물질이 현재 기술된다. 본 명세서에 언급된 모든 간행물은 간행물과 함께 인용되는 방법 및/또는 물질을 개시하고 기술하기 위해 본 명세서에 참고로 포함된다. 본 발명은 모순이 있는 정도로 포함된 간행물의 임의의 발명을 대체한다는 것이 이해된다.

[0117] 본 발명을 읽을 때 당업자에 의해 분명할 바와 같이, 본 명세서에 기술되고 도시된 개개 실시태양 각각은 본 발명의 취지 또는 범주로부터 벗어나는 일 없이 다른 몇몇 실시태양 중 어느 것의 특징으로부터 용이하게 분리되거나 이와 조합될 수 있는 별개의 성분 및 특징을 가진다. 임의의 열거된 방법은 열거된 사건의 순서로 또는 논리적으로 가능한 임의의 다른 순서로 수행될 수 있다.

[0118] 본 명세서에 논의된 간행물은 본 출원의 출원일 전의 이들의 발명에 대해서만 제공된다. 본 명세서의 어떤 것도 본 발명이 선행 발명 때문에 이러한 간행물 보다 선행한다는 자격이 부여되지 않는다는 용인으로서 해석되어서는 안 된다. 추가로, 제공된 공개일은 독립적으로 확인될 필요가 있을 수 있는 실제 공개일과 상이할 수 있다.

[0119] B. 정의

[0120] 본 명세서 및 첨부하는 청구범위에 사용되는 바와 같은 단수 형태는 문맥에서 달리 분명하게 표시되지 않는 한 복수의 대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "세포"에 대한 언급은 복수의 이러한 세포를 포함하고, "펩타이드"에 대한 언급은 하나 이상의 펩타이드 및 이의 동등물, 예를 들어, 당업자에게 공지된 폴리펩타이드에 대한 언급을 포함한다.

[0121] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "및/또는"은 본 명세서에서 달리 표시되지 않는 한 "및" 또는 "또는"에 대해 사용된다.

[0122] 본 명세서 전체적으로, 문맥에서 달리 요구되지 않는 한, 단어 "포함하다(comprise)", 또는 변형, 예컨대 "포함하다(comprises)" 또는 "포함하는(comprising)"은 언급된 요소 또는 정수 또는 요소 또는 정수의 그룹의 포함을 의미하지만, 임의의 다른 요소 또는 정수 또는 요소 또는 정수의 그룹의 제외를 의미하지는 않는다. 추가로, 본 명세서 전체적으로 수치 범위의 언급은 이들 사이의 모든 정수 및 소수점을 포함한다.

[0123] 본 명세서 전체적으로, 문맥이 달리 요구하지 않는 한, 어구 "로 필수적으로 이루어진"은 대상 발명의 기본적 및 신규한 특징(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 구체화된 물질 또는 단계에 대해 기재된 조성물, 방법 또는 키트 범주의 제한을 의미한다. 예를 들어, 개시된 서열"로 필수적으로 이루어진" 리간드 결합 도메인은 개시된 서열의 아미노산 서열 + 또는 - 서열의 경계에서 열거된 결합 중인 아미노산 잔기보다 약 5개의 아미노산 잔기, 예를 들어, 약 5개의 잔기, 4개의 잔기, 3개의 잔기, 2개의 잔기 또는 약 1개 미만의 잔기, 또는 열거된 결합 중인 아미노산 잔기보다 약 1개의 잔기, 2개의 잔기, 3개의 잔기, 4개의 잔기 또는 5개 초과의 잔기를 가진

다.

[0124] 문맥에서 달리 요구하지 않는 한, 본 명세서 전체적으로, 어구 "이루어진"은 청구범위에 구체화되지 않은 임의의 요소, 단계 또는 성분의 조성물, 방법 또는 키트로부터의 제외를 의미한다. 예를 들어, 개시된 서열"로 이루어진" 리간드 결합 도메인은 개시된 아미노산 서열만으로 이루어진다.

[0125] 본 명세서에서 사용되는 용어 "약" 및 "대략"은 동의어로서 사용된다. 약/대략과 함께 또는 이들 없이 본 명세서에서 사용되는 임의의 숫자는 적절한 기술에서 당업자에 의해 인식되는 임의의 정상적 변동을 아우르는 것을 의미한다. 특정 실시태양에서, 용어 "대략" 또는 "약"은 달리 언급되지 않는 한 또는 문맥으로부터 달리 분명하지 않다면(이러한 숫자가 가능한 값의 100%를 초과하는 경우를 제외), 언급된 기준 값의 방향 중 하나(초과 또는 미만)에서 25%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 이하 내에 속하는 값의 범위를 의미한다.

[0126] 본 명세서에서 사용된 바와 같은 용어 "분리된"은 천연 상태에서 발견된 바와 같이 정상적으로 수반하는 성분이 실질적으로 또는 본질적으로 없는 물질을 의미한다. 일부 실시태양에서, 용어 "얻어진" 또는 "유래된"은 분리된과 동의어로 사용된다.

[0127] 용어 "대상", "개체" 및 "환자"는 포유 동물과 같은 척추 동물을 의미하기 위해 본 명세서에서 상호 호환적으로 사용된다. 포유 동물은 예를 들어, 마우스, 랫트, 토끼, 고양이, 개, 돼지, 양, 말, 인간이 아닌 영장류(예를 들어, 시노몰구스 원숭이, 침팬지) 또는 인간일 수 있다. 생체내에서 획득되거나 시험관내에서 배양된 피험자의 조직, 세포 또는 이의 유도체도 포함된다. 인간 대상은 성인, 십대, 어린이(2세 내지 14세), 유아(1개월 내지 24개월) 또는 신생아(1개월 이하)일 수 있다. 일부 실시태양에서, 성인은 약 65세 이상 또는 약 60세 이상의 노인이다. 일부 실시태양에서, 대상은 임신한 여성 또는 임신을 하고자 하는 여성이다.

[0128] 용어 "샘플"은 분석이 실시되는 생물학적 물질의 용적 및/또는 질량을 의미한다. 일부 실시태양에서, 샘플은 조직 샘플, 세포 샘플, 유체 샘플 등을 포함한다. 일부 실시태양에서, 샘플은 대상(예를 들어, 인간 대상)로부터 취해지거나 대상에 의해 제공된다. 일부 실시태양에서, 샘플은 임의의 내부 기관, 암성, 전암성, 또는 비암성 종양, 뇌, 피부, 모발(뿌리를 포함), 눈, 근육, 골수, 연골, 백색 지방조직, 및/또는 갈색 지방조직으로부터 취한 조직의 일부를 포함한다. 일부 실시태양에서, 유체 샘플은 구강 상피세포 채취, 혈액, 제대혈, 타액, 정액, 소변, 복수액, 흉수, 수액, 폐 세척, 눈물, 땀 등을 포함한다. 당업자는, 일부 실시태양에서, "샘플"이 공급원(예를 들어, 대상)으로부터 직접적으로 얻어진다는 점에서 "1차 샘플"이라는 것을 인식할 것이다. 일부 실시태양에서, "샘플"은, 예를 들어, 성분을 잠재적으로 오염시키는 어떤 것을 제거하기 위한, 특정 성분을 분리시키기 위한 그리고/또는 관심 대상의 특정 성분을 정제하기 위한, 1차 샘플의 가공 결과이다. 일부 실시태양에서, 샘플은 세포 또는 세포 집단(예를 들어, 뉴런 세포)이다. 세포 샘플은 대상로부터 직접적으로 유래될 수 있거나(예를 들어, 1차 샘플) 세포주일 수 있다. 세포주는 비포유류 세포(예를 들어, 곤충 세포, 효모 세포 및/또는 박테리아 세포) 또는 포유류 세포(예를 들어, 불멸 세포주)를 포함할 수 있다.

[0129] 본 명세서에서 사용되는 "치료하는" 또는 "치료"는 대상 및/또는 생리학적 결과에 영향을 미치는 세포의 집단에 조성물(예를 들어, 조작된 수용체 및/또는 리간드)을 전달하는 것을 의미한다. 특정 실시태양에서, 치료는 하나 이상의 질환 증상의 개선(예를 들어, 감소, 개선 또는 교정)을 초래한다. 개선은 관찰 가능한 또는 측정 가능한 개선일 수 있거나, 대상의 웰빙의 일반적 느낌의 개선일 수 있다. 질환 치료는 질환 증상 중증도의 감소를 의미할 수 있다. 일부 실시태양에서, 치료는 질환 개시 전과 비슷한 수준으로 질환 증상 중증도의 감소를 의미할 수 있다. 일부 실시태양에서, 치료는 질환 증상의 단기간(예를 들어, 일시적 또는 급성) 및/또는 장기간(예를 들어, 지속 또는 만성) 감소를 의미할 수 있다. 일부 실시태양에서, 치료는 질환 증상의 관해를 의미할 수 있다. 일부 실시태양에서, 치료는 질환 발생을 예방하기 위해 특정 질환이 발생할 위험에 있는 대상의 예방적 치료를 의미할 수 있다. 질환 발생의 예방은 질환 증상의 완전한 예방, 질환 개시의 지연, 후속적으로 발생된 질환 증상 중증도의 감소 또는 질환 발생 가능성의 감소를 의미할 수 있다.

[0130] 본 명세서에서 사용되는, "관리" 또는 "제어하는"은 특정 질환을 앓고 있는 개체에 대해 삶의 질을 개선시키기 위해 본 명세서에 고려된 조성물 또는 방법의 사용을 의미한다. 특정 실시태양에서, 본 명세서에 기술된 조성물 및 방법은 통증을 앓고 있는 대상에 무통증을 제공한다.

[0131] "치료적 유효량"은 목적하는 치료적 결과를 달성하는 데 필요한 조성물의 양이다. 치료적 유효량은, 예컨대, 이하로 제한되는 것은 아니지만, 질환 상태 및 연령 및 대상의 체중에 따라 다를 수 있다. 일반적으로, 치료적 유효량은 또한 치료적으로 유리한 효과가 조성물의 임의의 독성 또는 해로운 효과보다 큰 것이다. "치료적

유효량"은 대상을 치료하는 데 효과적인 조성물의 양을 포함한다.

[0132] "증가"는 기준 또는 대조군 수준에 비해 적어도 5%의 값의 증가(예를 들어, 증가된 결합 친화도, 증가된 생리학적 반응, 증가된 치료 효과 등)를 의미한다. 예를 들어, 증가는 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 500, 1000% 이상의 증가를 포함할 수 있다. 증가는 또한 기준 또는 대조군 수준보다 1.1, 1.2, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30배 이상(예를 들어, 500, 1000배) 더 높은 증가를 의미한다.

[0133] "감소", "줄이다", "축소하다" 또는 이의 동의어는 기준 또는 대조군 수준에 비해 적어도 5%의 값의 감소(예를 들어, 감소된 결합 친화도, 감소된 생리학적 반응, 감소된 치료 효과, 대상의 통증 감소 등)를 의미한다. 예를 들어, 감소는 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 500, 1000% 이상의 감소를 포함할 수 있다. 감소는 기준 또는 대조군 수준보다 1.1, 1.2, 1.5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30배 이상(예를 들어, 500, 1000배)인 감소를 의미한다.

[0134] "유지하다" 또는 "보존하다" 또는 "유지" 또는 "변화 없음" 또는 "실질적인 변화 없음" 또는 "실질적인 감소 없음"은 일반적으로 비히클, 또는 대조군 분자/조성물에 의해 야기되는 효과와 비슷한 생리학적 및/또는 치료적 효과를 의미한다. 비슷한 반응은 기준 반응과 유의하게 다르지 않은 또는 측정 가능하게 다르지 않은 것이다.

[0135] 용어 "기준" 또는 "대조군" 수준은 본 명세서에서 상호 호환적으로 사용되고, 본 명세서에 기술된 조성물로 치료되지 않은 대상 또는 샘플, 또는 비히클 대조군으로 치료된 대상 또는 샘플에서 특정 생리학적 및/또는 치료적 효과의 값을 의미한다. 일부 실시태양에서, 기준 수준은 본 명세서에 기재된 조성물의 투여 전에 대상 또는 샘플에서의 측정인 특정 생리학적 및/또는 치료적 효과의 값(예를 들어, 기준 수준)을 의미한다.

[0136] 본 명세서에서 사용되는 "리간드"는 다른 더 큰 분자에 결합하는 분자를 의미한다. 일부 실시태양에서, 리간드는 수용체에 결합한다. 일부 실시태양에서, 수용체에 대한 리간드의 결합은 수용체의 기능을 변경하여 그 기능을 활성화하거나 억제한다. 일부 실시태양에서, 리간드-개폐 이온 채널(LGIC)과 같은 수용체에 대한 리간드의 결합은 이온 채널의 개방 또는 폐쇄를 야기한다.

[0137] "수용체-리간드 결합" 및 "리간드 결합"은 본 명세서에서 상호 호환적으로 사용되고, 수용체(예를 들어, LGIC)와 리간드 사이의 물리적 상호작용을 의미한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "리간드"는 내인성 또는 천연 유래 리간드를 의미할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시태양에서, 리간드는 신경 전달 물질(예를 들어, λ-아미노뷰티르산(GABA), 아세틸콜린, 세로토닌 및 기타) 및 신호전달 중간체(예를 들어, 포스파티딜이노시톨 4,5-비스포스페이트(PIP_2)), 아미노산(예를 들어, 글리신) 또는 뉴클레오타이드(예를 들어, ATP)를 의미한다. 일부 실시태양에서, 리간드는 비천연, 즉, 합성 또는 비자연적으로 생기는, 리간드를 의미할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시태양에서, 리간드는 소분자를 의미한다. 리간드 결합은 당업계에 공지된 다양한 방법에 의해 측정될 수 있다(예를 들어, 방사성 표지된 리간드와의 결합 검출).

[0138] "결합 친화도"는 일반적으로 수용체의 신호 결합 부위와 리간드의 비공유 상호작용의 총 합의 강도를 의미한다. 달리 표시되지 않는 한, 본 명세서에 사용되는 바와 같은 "결합 친화도"는 결합 쌍의 구성원(예를 들어, 수용체 및 리간드) 사이의 1:1 상호작용을 반영하는 고유한 결합 친화도를 의미한다. 분자의 상대 Y에 대한 친화도는 일반적으로 해리 상수(K_d)로 나타낼 수 있다. 친화도는 본 명세서에 기술된 것을 포함하는 당업계에 공지된 통상적인 방법에 의해 측정될 수 있다.

[0139] 용어 "특이적 결합 친화도" 또는 "특이적 결합"은 본 명세서 및 청구범위 전체적으로 상호 호환적으로 사용되고, 분자의 짝지어진 종, 예를 들어, 수용체 및 리간드 간에 생기는 결합을 의미한다. 두 종의 상호작용이 비공유적으로 결합된 복합체를 생성할 때, 생기는 결합은 전형적으로 정전기적, 수소-결합 또는 친유성 상호작용의 결과이다. 다양한 실시태양에서, 하나 이상의 종 사이의 특이적 결합은 직접적이다. 한 실시태양에서, 특이적 결합의 친화도는 배경 결합(비-특이적 결합)보다 약 2배 더 크거나, 배경 결합보다 약 5배 더 크거나, 배경 결합보다 약 10배 더 크거나, 배경 결합보다 약 20배 더 크거나, 배경 결합보다 약 50배 더 크거나, 배경 결합보다 약 100배 더 크거나, 또는 배경 결합보다 약 1000배 이상이다.

[0140] "신호전달"은 수용체에 대한 리간드 결합의 결과로서 생화학적 또는 생리학적 반응의 생성을 의미한다.

[0141] 용어 "야생형" 또는 "천연"은 당업자에 의해 이해되는 당업계의 용어이고 유기체, 변종, 유전자, 단백질, 또는 돌연변이 또는 변이체와 구별되는 자연에서 발생하는 특성의 전형적인 형태를 의미한다. 예를 들어, 야생형 단백질은 자연에서 발생하는 단백질의 전형적인 형태이다.

[0142] 용어 "비천연", "변이체" 및 "돌연변이체"는 천연 또는 야생형, 조성물의 돌연변이체, 예를 들어, 천연 또는 야생형, 서열과 100% 미만의 서열 동일성을 갖는 변이체 폴리펩타이드를 의미하기 위해 본 명세서 및 청구항 전체적으로 상호 호환적으로 사용된다.

[0143] "아미노산 변형" 또는 "아미노산 돌연변이"는 아미노산 치환, 아미노산 결실 및/또는 아미노산 삽입일 수 있다. 아미노산 치환은 보존적 아미노산 치환 또는 비보존적 아미노산 치환일 수 있다. 보존적 대체(보존적 돌연변이, 보존적 치환 또는 보존적 변이라고도 함)는 주어진 아미노산을 유사한 생화학적 특성(예를 들어, 전하, 소수성 및 크기)을 가진 다른 아미노산으로 변경하는 단백질의 아미노산 대체이다. 본 명세서에서 사용되는 "보존적 변이"는 아미노산 잔기가 생물학적으로 유사한 또 다른 잔기로 대체되는 것을 의미한다. 보존적 변이의 예는 아이소류신, 발린, 류신 또는 메티오닌과 같은 하나의 소수성 잔기의 다른 것으로의 치환; 또는 리신을 아르기닌으로, 아스파르트산을 글루탐산으로, 또는 아스파라긴을 글루타민으로 치환하는 것과 같이 극성 잔기를 다른 것으로 치환하는 것 등이다. 보존적 치환의 다른 예시적인 예는 다음의 변화를 포함한다: 알라닌에서 세린으로; 아르기닌에서 라이신으로; 아스파라긴에서 글루타민 또는 히스티딘으로; 아스파르테이트에서 글루타메이트로; 시스테인에서 세린으로; 글루타민에서 아스파라긴으로; 글루타메이트에서 아스파르테이트로; 글리신에서 프랄린으로; 히스티딘에서 아스파라긴 또는 글루타민으로; 아이소류신에서 류신 또는 발린으로; 류신에서 발린 또는 아이소류신으로; 라이신에서 아르기닌, 글루타민 또는 글루타메이트로; 메티오닌에서 류신 또는 아이소류신으로; 페닐알라닌에서 티로신, 류신 또는 메티오닌으로; 세린에서 트레오닌으로; 트레오닌에서 세린으로; 트립토판에서 티로신으로; 티로신에서 트립토판 또는 페닐알라닌으로; 발린에서 이소류신 또는 류신으로 등.

[0144] 용어 "모" 또는 "개시자"는 신규한 특성을 갖는 조작된 조성물을 생성하기 위해 돌연변이되고, 변형되거나 유도체화된 초기 조성물 또는 단백질을 의미하기 위하여 본 명세서 및 청구범위 전체적으로 상호 호환적으로 사용된다. 일부 실시태양에서, 모 단백질은 키메릭 단백질이다.

[0145] 용어 "조작된"은 유도체화된 모 조성물 또는 단백질과 별개인 특성을 갖는 비천연 유래 조성물 또는 단백질을 의미하기 위해 본 명세서 및 청구항 전체에서 사용된다.

[0146] 일반적으로, "서열 동일성" 또는 "서열 상동성"은 각각 두 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 서열의 뉴클레오타이드-대-뉴클레오타이드 또는 아미노산-대-아미노산 대응을 의미한다. 전형적으로, 서열 동일성을 결정하기 위한 기법은 폴리뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 서열을 결정하는 것 및/또는 이에 의해 암호화된 아미노산 서열을 결정하는 것, 및 이들 서열을 제 2 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열과 비교하는 것을 포함한다. 둘 이상의 서열(폴리뉴클레오타이드 또는 아미노산)은 이들의 "동일성 백분율"을 결정함으로써 비교될 수 있다. 핵산이든 또는 아미노산 서열이든 두 서열의 동일성 백분율은 두 정렬된 서열 사이의 정확한 매칭의 수를 더 짧은 서열의 길이로 나누고, 100을 곱한다. 동일성 백분율은 또한, 예를 들어, 미국 국립 보건원으로부터 이용 가능한 컴퓨터 프로그램 버전 2.2.9를 포함하는 어드밴스드 BLAST 이용하여 서열 정보를 비교함으로써 결정될 수 있다. BLAST 프로그램은 Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268 (1990)] 및 Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990); Karlin And Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877 (1993); 및 Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)에서 논의되는 바와 같은 정렬 방법에 기반한다. 간략하게, BLAST 프로그램은 동일한 정렬된 기호(일반적으로 뉴클레오타이드 또는 아미노산)의 수를 두 서열 중 더 짧은 기호의 총 수로 나눈 것으로서 동일성을 정한다. 프로그램은 비교 중인 단백질의 전체 길이에 걸쳐 동일성 백분율을 결정하는 데 사용될 수 있다. 디폴트 파라미터는, 예를 들어, blastp 프로그램에 의해 더 짧은 질의 서열로 검색을 최적화하도록 제공된다. 프로그램은 또한 Wootton and Federhen, Computers and Chemistry 17:149-163 (1993)의 SEG 프로그램에 의해 결정되는 바와 같은 질의 서열의 마스크-오프 세그먼트에 대한 SEG 필터의 사용을 가능하게 한다. 서열 동일성의 목적하는 정도의 범위는 대략 80% 내지 100% 및 개재된 정수 값이다. 전형적으로, 개시된 서열과 청구된 서열 사이의 동일성 백분율은 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 98%이다.

[0147] 본 명세서에 사용되는 바와 같은, "실질적으로 동일한"은 85% 이상, 예를 들어 90% 이상, 예를 들어, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.9% 또는 100%인 서열 동일성을 갖는 것을 의미하되, 조성물의 활성은 서열 동일성의 차이를 초래하는 서열의 변형에 의해 변경되지 않는다.

[0148] 아미노산 또는 뉴클레오타이드의 위치와 관련하여 본 명세서에서 사용되는 용어 "상응하는" 또는 "상응한다"는 제 1 폴리펩타이드 및 참조 폴리펩타이드 서열이 정렬될 때 참조 폴리펩타이드 서열의 주어진 아미노산과 정렬되는 제 1 폴리펩타이드 서열 내의 아미노산을 의미하거나 제 1 폴리펩타이드 및 참조 폴리펩타이드 서열이 정렬될 때 참조 폴리펩타이드 서열의 주어진 아미노산과 정렬되는 제 1 폴리펩타이드 서열 내의 뉴클레오타이드를

의미하거나 제 1 폴리뉴클레오타이드 및 참조 폴리뉴클레오타이드 서열이 정렬될 때 참조 폴리뉴클레오타이드 서열의 주어진 뉴클레오타이드와 정렬되는 제 1 폴리뉴클레오타이드 서열의 뉴클레오타이드를 의미한다. 정렬은 당업자가 이 목적을 위해 설계된 소프트웨어, 예를 들어, 해당 버전의 기본 파라미터가 있는 BLAST 프로그램 버전 2.2.9를 사용하여 수행한다.

[0149] 본 명세서에서 사용되는 용어 "프로모터"는 작동 가능하게 연결된 핵산의 전사를 지시하는 하나 이상의 핵산 제어 서열을 의미한다. 프로모터는 TATA 요소와 같은 전사 시작 부위 근처의 핵산 서열을 포함할 수 있다. 프로모터는 또한 전사 인자에 의해 결합될 수 있는 시스 작용 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. "구성적" 프로모터는 대부분의 환경 및 발달 조건하에서 활성인 프로모터이다. "유도성" 프로모터는 환경 또는 발달 규제하에서 활성인 프로모터이다. 용어 "작동가능하게 연결된"은 핵산 발현 제어 서열(예를 들어, 프로모터 또는 전사 인자 결합 부위의 어레이)과 제 2 핵산 서열 사이의 기능적 연결을 의미하며, 여기서 발현 제어 서열은 제 2 서열에 상응하는 핵산의 전사를 지시한다.

[0150] 본 명세서에서 사용되는 용어 "바이러스 벡터", "바이러스성 벡터" 또는 "유전자 전달 벡터"는 핵산 전달 비히클로 기능하고 핵산(예를 들어, AAV 발현 카세트) 비리온 내에 패키징된 핵산(예를 들어, AAV 발현 카세트)를 포함하는 바이러스 입자를 의미한다. 본 발명의 예시적인 바이러스 벡터는 아데노바이러스 벡터, 아데노 관련 바이러스 벡터(AAV), 렌티바이러스 벡터 및 레트로바이러스 벡터를 포함한다.

[0151] 본 명세서에서 사용된 "뉴런 활성", "뉴런의 활성", "뉴런 발화" 및 이들의 변형 및 동의어는 뉴런의 자극 또는 여기로부터 발생하는 전기적 활성을 의미한다. 일부 실시태양에서, 뉴런 활성은 자동 또는 수동 패치 클램프 기술을 사용하여 측정된다. 일부 실시태양에서, 뉴런의 활성을 결정하는 것은 뉴런의 흥분성 시냅스후 전위(EPSP), 억제성 시냅스후 전위(IPSP) 및/또는 활동 전위를 결정하는 것을 포함한다. 일부 실시태양에서, 뉴런의 활성 수준은 흥분성 시냅스후 전위(EPSP), 억제성 시냅스후 전위(IPSP) 및/또는 활동 전위에 의존하거나 영향을 받는다.

[0152] 본 명세서에서 사용된 "신경학적 질환" 또는 "신경학적 장애"는 신경계의 질환 또는 장애를 의미한다. 일부 실시태양에서, 신경학적 질환은 뇌, 척수, 신경 또는 신경계의 임의의 구성요소의 구조적, 생화학적 및/또는 전기적 이상과 관련되거나, 이에 의해 유발되거나, 또는 그 결과이다.

[0153] 본 명세서에서 사용된 질환의 "징후"는 질환 상태를 나타내는 것으로 간주되는 신체적 또는 정신적 특징을 의미한다. 일부 실시태양에서, 징후는 질환의 객관적 표시이다. 일부 실시태양에서, 징후는 의사와 같은 환자 이외의 사람에 의해 객관적으로 평가, 검사, 관찰 또는 측정된다.

[0154] 본 명세서에 사용된 질환의 "증상"은 질환의 상태를 나타내는 것으로 간주되는 신체적 또는 정신적 특징, 특히 환자에게 명백한 이러한 특징을 의미한다. 일부 실시태양에서, 증상은 환자에 의해 주관적으로 평가된다. 예를 들어, 일부 실시태양에서, 증상은 통증이다.

[0155] 본 명세서에 사용된 "효능"은 특정 리간드에 반응하는 본 명세서에 기술된 수용체의 능력을 의미한다. 따라서 효능의 증가는 특정 리간드에 대한 수용체의 반응성 증가를 의미한다. 따라서 효능의 감소는 특정 리간드에 대한 수용체의 반응성 감소를 의미한다. 수용체의 효능은 일반적으로 본 명세서에서 특정 수용체의 특정 리간드에 대한 최대 유효 농도의 절반(EC50)에 의해 결정된다. EC50은 특정 노출 시간 후 기준선과 최대값 사이의 중간에서 반응을 유도하는 리간드의 농도를 의미한다. 일부 실시태양에서, 반응은 수용체에서 이온 채널의 개방 또는 폐쇄이다.

[0156] 본 명세서에 사용된 리간드에 대한 "실질적으로 효능을 유지하는"은 특정 리간드에 대한 EC50이 변경되지 않았거나 변경되었으며 모 또는 제어 수용체에 비해 2배 미만으로 증가 또는 감소된 조작된 수용체를 의미한다.

[0157] 본 명세서에 사용된 리간드와 관련하여 수용체의 "효과"는 리간드의 존재하에서 수용체의 활성의 척도를 의미한다. 일부 실시태양에서, 효과는 리간드의 특정 농도의 존재와 같은 특정 조건하에서 수용체를 통과하는 전류의 양을 의미한다. 일부 실시태양에서, 효능을 결정하는 것은 수용체 및/또는 수용체의 레오베이스를 통과하는 전류의 양을 결정하는 것을 포함한다.

[0158] **C. 조작된 수용체**

[0159] 본 발명은 조작된 수용체, 조작된 수용체 돌연변이체, 및 이들의 사용을 위한 방법에 관한 것이다. 본 명세서에서 사용된 용어 "수용체"는 세포 표면 상에 위치되고 세포에 대한 그리고/또는 세포로부터의 신호전달을 매개할 수 있는 임의의 단백질을 의미한다. 용어 "조작된 수용체"는 대응하는 모 수용체와 물리적으로 그리고/또는 기

능적으로 별개가 되도록 실험적으로 변경된 수용체를 의미하기 위해 본 명세서에서 사용된다. 일부 실시태양에서, 모 수용체는 야생형 수용체이다. 용어 "야생형 수용체"는 천연에서 발견되는 단백질의 폴리펩타이드 서열과 동일한 폴리펩타이드 서열을 갖는 수용체를 의미하기 위해 본 명세서에서 사용된다. 야생형 수용체는 인간에서 자연적으로 생기는 수용체뿐만 아니라 다른 진핵생물, 예를 들어, 원생생물, 진균, 식물 또는 동물, 예를 들어, 효모, 곤충, 선충, 해면동물, 포유류, 비포유류 척추동물에서 자연적으로 생기는 오솔로그를 포함한다. 다른 일부 실시태양에서, 모 수용체는 비천연 수용체이고; 즉, 이는 천연에서 생기지 않는 수용체, 예를 들어, 야생형 수용체로부터 조작된 수용체이다. 예를 들어, 모 수용체는 하나의 야생형 수용체로부터의 하나 이상의 서브유닛을 제 2 야생형 수용체로부터의 하나 이상의 서브유닛과 함께 포함하는 조작된 수용체일 수 있다. 따라서 얻어진 단백질은 둘 이상의 야생형 수용체로부터의 서브유닛을 포함한다. 따라서, 일부 실시태양에서, 모 수용체는 키메라 수용체이다. 본 발명의 조작된 수용체는, 예를 들어, 모 수용체 돌연변이체 및 스위치 수용체를 포함한다.

[0160] 일부 양태에서, 본 발명의 조작된 수용체는 상응하는 모 수용체에 대한 적어도 하나의 아미노산 돌연변이, 예를 들어, 야생형 수용체의 하나 이상의 도메인에서의 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 일부 실시태양에서, 돌연변이는 아미노산 치환이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 이 사이의 모든 범위 및 하위 범위를 포함하는 상응하는 모 수용체와 약 99%, 약 98%, 약 95%, 약 90%, 약 85%, 약 80%, 약 70%, 약 60%, 약 50% 이하의 서열 동일성을 공유한다. 일부 실시태양에서, 모 수용체 돌연변이는 이 사이의 모든 범위 및 하위 범위를 포함하는 상응하는 모 수용체와 85% 이상, 예를 들어, 상응하는 모 수용체와 예를 들어, 90% 이상, 95% 이상, 예를 들어, 약 96%, 약 97%, 약 98% 또는 약 99%의 동일성을 공유한다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체(예를 들어, 모 수용체 돌연변이체)는 오류 유발 PCR에 의해 생성된다.

[0161] 일부 실시태양에서, 본 발명의 조작된 수용체의 리간드 결합 도메인(LBD)은 모 수용체의 상응하는 리간드 결합 도메인에 대해 적어도 하나의 아미노산 돌연변이, 예를 들어, 야생형 수용체의 리간드 결합 도메인에서 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 일부 실시태양에서, 돌연변이는 아미노산 치환이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체의 리간드 결합 도메인은 이 사이의 모든 범위 및 하위 범위를 포함하는 모 수용체의 상응하는 리간드 결합 도메인과 85% 이상의 서열 동일성, 예를 들어, 모 수용체의 상응하는 리간드 결합 도메인과 예를 들어, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 동일성, 또는 100% 동일성을 가진다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체의 리간드 결합 도메인은 이 사이의 모든 범위 및 하위 범위를 포함하는 모 수용체의 상응하는 리간드 결합 도메인과 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 공유한다.

[0162] 일부 실시태양에서, 본 발명의 조작된 수용체의 이온 기공 도메인(IPD)은 모 수용체의 상응하는 이온 기공 도메인에 대해 적어도 하나의 아미노산 돌연변이, 예를 들어, 야생형 수용체의 이온 기공 도메인에서 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 일부 실시태양에서, 돌연변이는 아미노산 치환이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체의 이온 기공 도메인은 이 사이의 모든 범위 및 하위 범위를 포함하는 모 수용체의 상응하는 이온 기공 도메인과 85% 이상의 서열 동일성, 예를 들어, 모 수용체의 상응하는 이온 기공 도메인과 예를 들어, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 동일성, 또는 100% 동일성을 가진다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체의 이온 기공 도메인은 이 사이의 모든 범위 및 하위 범위를 포함하는 모 수용체의 상응하는 이온 기공 도메인과 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일성을 공유한다.

[0163] 일부 실시태양에서, 아미노산 돌연변이는 상응하는 모 수용체에 대한 기능 상실 아미노산 돌연변이이다. "기능 상실" 아미노산 돌연변이는, 예를 들어, 모 수용체에 대한 내인성 리간드의 결합에 대해 조작된 수용체에 대한 내인성 리간드의 결합을 감소시킴으로써, 또는 상응하는 모 수용체에 대한 리간드의 결합에 대한 반응에서 전형적으로 활성화되는 조작된 수용체의 신호전달 경로(들) 하류의 활성을 감소시킴으로써, 모 수용체에 대한 조작된 수용체의 기능을 감소시키거나, 실질적으로 감소시키거나, 없애는 하나 이상의 돌연변이를 의미한다. 일부 실시태양에서, 돌연변이는 아미노산 치환이다.

[0164] 일부 실시태양에서, 아미노산 돌연변이는 상응하는 모 수용체에 대한 기능 획득 아미노산 돌연변이이다. "기능 획득" 아미노산 돌연변이는, 예를 들어 모 수용체에 대한 내인성 리간드의 결합에 대해 리간드에 대한 조작된 수용체의 친화도를 변경시키거나 향상시킴으로써, 또는 상응하는 모 수용체에 대한 내인성 리간드의 결합에 대해 조작된 수용체에 대한 리간드의 결합에 반응하여 활성화된 신호전달 경로의 활성을 변경시키거나 향상시킴으로써, 모 수용체에 대한 조작된 수용체의 기능을 변형시키는 하나 이상의 돌연변이를 의미한다. 일부 실시태양에서, 기능 획득 돌연변이는 리간드에 대한 조작된 수용체의 증가된 친화도를 초래한다. 특정 실시태양에서, 기

능 획득 돌연변이는 효현제 리간드에 대한 조작된 수용체의 증가된 친화도를 초래한다. 일부 실시태양에서, 기능 획득 돌연변이는 조작된 수용체에 결합시 작용제 리간드로서 작용하는 길항제 리간드를 초래한다(예를 들어, 길항제 신호 전달 경로 대신 효현제 신호 전달 경로의 활성화를 초래한다). 일부 실시태양에서, 기능 획득 돌연변이는 조작된 수용체에 결합시 효현제 리간드로서 작용하는 조절자 리간드를 초래한다. 일부 실시예에서, 돌연변이는 아미노산 치환이다.

[0165] 일부 실시태양에서, 본 발명의 주제 조작된 수용체, 또는 이의 리간드 결합 도메인 및/또는 이온 기공 도메인은 상응하는 모 수용체와 비교하여 하나 이상의 기능 상실 아미노산 돌연변이 및 하나 이상의 기능 획득 아미노산 돌연변이를 포함한다. 일부 실시태양에서, 돌연변이는 아미노산 치환이다.

[0166] 일부 실시태양에서, 기능 돌연변이의 손실 및 기능 돌연변이의 획득은 동일한 잔기에 존재하는데, 즉 동일한 돌연변이이다. 다른 실시태양에서, 기능 돌연변이의 손실 및 기능 돌연변이의 획득은 상이한 아미노산 잔기에서 돌연변이이다. 일부 실시태양에서, 돌연변이는 아미노산 치환이다. 일부 실시태양에서, 기능 돌연변이의 상실 및/또는 기능 돌연변이의 획득을 포함하는 주제 조작된 수용체(또는 리간드 결합 도메인 및/또는 이온 기공 도메인)는 상응하는 모 수용체, 예를 들어 야생형 수용체 또는 비천연 수용체(또는 리간드 결합 도메인 및/또는 이의 이온 기공 도메인)와 이 사이의 모든 범위 및 하위 범위를 포함하는 약 99%, 약 98%, 약 95%, 약 90%, 약 85%, 약 80%, 약 70%, 약 60%, 약 50%의 서열 동일성을 공유한다. 일부 실시태양에서, 주제 조작된 수용체(또는 리간드 결합 도메인 및/또는 이온 기공 도메인)는 상응하는 모 수용체(또는 리간드 결합 도메인 및/또는 이온 기공 도메인)와 이 사이의 모든 범위 및 하위 범위를 포함하는 85% 이상의 서열 동일성, 예를 들어 85%, 90% 또는 95% 이상의 서열 동일성, 일부 경우 96%, 97%, 98% 이상의 서열 동일성, 예를 들어 99% 또는 99.5% 이상의 서열 동일성을 공유한다.

[0167] 일부 양태에서, 본 발명의 조작된 수용체는 하나의 야생형 수용체로부터 유래된 하나 이상의 아미노산 서열, 예를 들어, 서브유닛과 제 2 야생형 수용체로부터 유래된 하나 이상의 아미노산 서열, 예를 들어, 서브유닛의 조합에 의해 생성되는 수용체를 포함한다. 다시 말해서, 조작된 수용체는 서로에 대해 이종성인 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 "이종성"은 천연에서 함께 생기지 않는다는 것을 의미한다. 이러한 수용체는 본 명세서에서 "키메라 수용체"로서 의미된다. 일부 실시태양에서, 키메라 수용체는 본 발명의 조작된 수용체가 생성되는 모 수용체로서 작용한다.

[0168] 일부 실시태양에서, 모 수용체 돌연변이체는 효현제 리간드에 대한 증가된 친화도를 입증한다. 일부 실시태양에서, 야생형 수용체에 결합할 때 길항제 또는 조절제로서 작용하는 리간드는 모 수용체 돌연변이체에 결합할 때 효현제로서 작용한다.

[0169] 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 "리간드-개폐 이온 통로" 또는 LGIC이다. LGIC는 특정 리간드에 의한 활성화 시 이온을 통과시키는 막관통 단백질의 거대 그룹을 의미한다. LGIC는 적어도 2개의 도메인으로 구성된다: 리간드 결합 도메인 및 막관통 이온 기공 도메인. LGIC에 대한 리간드 결합은 LGIC의 활성화 및 이온 기공의 개방을 초래한다. 리간드 결합은 특정 이온 또는 이온들에 대한 통로 투과성의 극적인 변화를 야기하고; 통로가 비활성이거나 폐쇄될 때 어떤 이온도 효과적으로 통로를 통과할 수 없지만, 리간드 결합 시 최대 10^7개의 이온/초로 통과할 수 있다. 일부 실시태양에서, LGIC는 세포외 리간드(예를 들어, 신경 전달 물질)에 반응하며, 사이토졸 내로의 이온 유입을 용이하게 한다. 일부 실시태양에서, LGIC는 세포내 리간드(예를 들어, ATP와 같은 뉴클레오타이드 및 PIP_2와 같은 신호전달 중간체)에 반응하고, 사이토졸로부터 세포외 환경으로 이온의 방출을 용이하게 한다. 중요하게는, LGIC의 활성화는 세포막을 가로지른 이온(예를 들어, Ca^{2+}, Na^+, K^+, Cl^- 등)의 수송을 초래하고, 리간드 그 자체의 수송을 초래하지 않는다.

[0170] LGIC 수용체는 다중 서브세트를 포함하고, 동종의 수용체 또는 이종의 수용체 중 하나일 수 있다. 동종의 수용체는 모든 동일 유형인 서브세트를 포함한다. 이종 수용체는 서브세트로 포함되며 적어도 하나의 서브세트는 수용체 내에 포함된 적어도 하나의 다른 서브세트와 상이하다. 예를 들어, 글리신 수용체는 두 가지 유형이 있는, 5개의 서브유닛을 포함한다: 4개의 아이소폼(α_1 내지 α_4)이 있는 α-서브유닛, 단일의 공지된 아이소폼이 있는 β-서브유닛. 예시적인 동종 GlyR은 5개의 α_1-GlyR 서브세트를 포함하는 GlyR이다. 유사하게, 동종 $GABA_A$ 수용체는 β_3-$GABA_A$ 서브유닛을 포함할 수 있고, nAchR 수용체는 α_7-nAchR 서브세트를 포함할 수 있다. 예시적인 이종 GlyR은 하나 이상의 α-서브세트 및 하나 이상의 β-서브세트(예를 들어, $\alpha_1\beta$-GlyR)를 포함할 수 있다. 예시적인 LGIC 수용체의 서브세트는 표 1에 도시된다.

표 1

[0171] LGIC 수용체 및 서브세트

수용체	서브유닛	서브유닛 아이소형
GlyR	GLRA1	
	GLRA2	
	GLRA3	
	GLRA4	
	GLRB	
$5HT_3$	5-HT3A	
	5-HT3B	
	5-HT3C	
	5-HT3D	
	5-HT3E	
nAChR	α	α 1
		α 2
		α 3
		α 4
		α 5
		α 6
		α 7
		α 8
		α 9
		α 10
	β	β 1
		β 2
		β 3
		β 4
	γ	γ
	δ	δ
	ε	ε
$GABA_A$	α	α 1
		α 2
		α 3
		α 4
		α 5
$GABA_A$	α	α 6
	β	β 1
		β 2
		β 3
	γ	γ 1
		γ 2
		γ 3
	δ	δ
	ε	ε
	π	π
	ρ	ρ 1
		ρ 2
		ρ 3
P2X	P2X1	
	P2X2	
	P2X3	
	P2X4	
	P2X5	
	P2X6	
	P2X7	
KCNQ	α	K_v α 1

	K_vα2
	K_vα3
	K_vα4
	K_vα5
	K_vα6
	K_vα7
	K_vα8
	K_vα9
	K_vα10
	K_vα11
	K_vα12
β	K_vβ1
	K_vβ2
	K_vβ3
	minK
	MiRP1
	MiRP2
	MiRP3
	KCNE1-유사
	KCNIP1
	KCNIP2
	KCNIP3
	KCNIP4

[0172] 특정 실시태양에서 사용하는 데 적합한 LGIC 패밀리의 예시적인 예는 Cys-루프 수용체, 예컨대 글리신 수용체(GlyR), 세로토닌 수용체(예를 들어, 5-HT3 수용체), λ-아미노뷰티르산 A(GABA-A) 수용체, 및 니코틴 아세틸콜린 수용체(nAchR)뿐만 아니라; 산-감지(양성자-개폐성) 이온 통로(ASIC), 상피 나트륨 통로(ENaC), 이오노트로픽 글루탐산염 수용체, IP3 수용체, P2X 수용체, 리아노딘(Ryanodine) 수용체, 및 아연 활성화 통로(Zinc activated channel: ZAC)를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0173] 본 명세서에 기술된 방법과 함께 사용하기에 적합한 LGIC의 특정 비제한적 예는 HTR3A; HTR3B; HTR3C; HTR3D; HTR3E; ASIC1; ASIC2; ASIC3; SCNN1A; SCNN1B; SCNN1D; SCNN1G; GABRA1; GABRA2; GABRA3; GABRA4; GABRA5; GABRA6; GABRB1; GABRB2; GABRB3; GABRG1; GABRG2; GABRG3; GABRD; GABRE; GABRQ; GABRP; GABRR1; GABRR2; GABRR3; GLRA1; GLRA2; GLRA3; GLRA4; GLRB; GRIA1; GRIA2; GRIA3; GRIA4; GRID1; GRID2; GRIK1; GRIK2; GRIK3; GRIK4; GRIK5; GRIN1; GRIN2A; GRIN2B; GRIN2C; GRIN2D; GRIN3A; GRIN3B; ITPR1; ITPR2; ITPR3; CHRNA1; CHRNA2; CHRNA3; CHRNA4; CHRNA5; CHRNA6; CHRNA7; CHRNA9; CHRNA10; CHRNB1; CHRNB2; CHRNB3; CHRNB4; CHRNG; CHRND; CHRNE; P2RX1; P2RX2; P2RX3; P2RX4; P2RX5; P2RX6; P2RX7; RYR1; RYR2; RYR3; 및 ZACN을 포함한다.

[0174] TRPV1, TRPM8 및 $P2X_2$는 구조적 특징뿐만 아니라 개폐성 원칙을 공유하는 거대 LGIC 패밀리의 구성원이다. 예를 들어, TRPV1과 유사한 TRPV4는 또한 열에 의해 촉발되지만, 캡사이신에 의해서는 촉발되지 않고; $P2X_3$은 ATP에 의해 촉발되지만, $P2X_2$보다 더 빠르게 탈감작화된다. 따라서, TRPV1, TRPM8 및 $P2X_2$는 특정 실시태양에서 사용하기에 적합한 LGIC의 비제한적 예이다.

[0175] 한 실시태양에서, 조작된 수용체는 TRPV1 또는 TRPM8 수용체 또는 이들의 뮤테인이다. TRPV1 및 TRPM8은 말초 신경계의 통각 수용 뉴런에 의해 발현되는 바닐로이드 및 멘톨 수용체이다. 통로는 둘 다 비-선택적, 나트륨- 및 칼슘-침투성 동종삼량체로서 작용하는 것으로 생각된다. 추가로, 통로와 이들의 주된 효현제--캡사이신 및 쿨링 화합물, 예컨대 멘톨 각각은 사실상 중추 신경계에 없다. 캡사이신, 및 멘톨 및 이실린(icilin)을 비롯한 일부 쿨링 화합물은 광불안정 차단기에 대한 잠재적 수용자(acceptor) 부위를 함유한다. 이러한 수용자와 광불안정 차단기의 결합은 활성 리간드를 방출함으로써 광이 간접적 촉발자로서 작용하는 리간드-개폐 이온 통로를 초래한다.

[0176] 한 실시태양에서, 조작된 수용체는 $P2X_2$ 수용체 또는 이의 뮤테인이다. $P2X_2$는 느린 속도의 탈감작에 의해 구별되는 ATP-개폐성 비-선택적 양이온 통로이다. $P2X_2$는 탈분극성 전류의 선택적으로 처리 가능한 공급원으로서 사용될 수 있고, 천연 효현제를 함께 결여하는 조작된 통로-리간드 조합의 생성을 위한 플랫폼을 제시한다.

[0177] 본 발명의 조작된 수용체의 생성에서의 용도를 발견하는 야생형 LGIC 수용체 서열의 비제한적 예는 다음을 포함한다. 서열에서, 신호 펩타이드는 이탤릭체이며, 리간드 결합 도메인은 볼드체이고, 이온 기공 도메인은 밑줄 표시되어 있다:

[0178] 일부 실시태양에서, 야생형 LGIC 수용체는 *GLRA1* 유전자(젠뱅크 수탁번호 NM_001146040.1(SEQ ID NO: 1)에 의해 암호화된 인간 알파 1 글리신 수용체(GlyRα1)(젠뱅크(GenBank) 수탁번호 NP_001139512.1, SEQ ID NO: 2)이다:

[0179]
```
    10      20      30      40      50      60
MYSFNTLRLY LWETIVFFSL AASKEAEAAR SAPKPMSPSD FLDKLMGRTS GYDARIRPNF
    70      80      90     100     110     120
KGPPVNVSCN IFINSFGSIA ETTMDYRVNI FLRQQWNDPR LAYNEYPDDS LDLDPSMLDS
    130     140     150     160     170     180
IWKPDLFFAN EKGAHFHEIT TDNKLLRISR NGNVLYSIRI TLTLACPMDL KNFPMDVQTC
    190     200     210     220     230     240
IMQLESFGYT MNDLIFEWQE QGAVQVADGL TLPQFILKEE KDLRYCTKHY NTGKFTCIEA
    250     260     270     280     290     300
RFHLERQMGY YLIQMYIPSL LIVILSWISF WINMDAAPAR VGLGITTVLT MTTQSSGSRA
    310     320     330     340     350     360
SLPKVSYVKA IDIWMAVCLL FVFSALLEYA AVNFVSRQHK ELLRFRRKRR HHKSPMLNLF
    370     380     390     400     410     420
QEDEAGEGRF NFSAYGMGPA CLQAKDGISV KGANNSNTTN PPPAPSKSPE EMRKLFIQRA
    430     440     450     457
KKIDKISRIG FPMAFLIFNM FYWIIYKIVR REDVHNQ
```

[0180] (SEQ ID NO: 2).

[0181] 일부 실시태양에서, 야생형 LGIC 수용체는 *GLRA2* 유전자(젠뱅크 수탁번호 NM_001118885, SEQ ID NO: 82)에 의해 암호화된 인간 알파 2 글리신 수용체(GlyRα2)(젠뱅크(GenBank) 수탁번호 NP_001112357.1, SEQ ID NO: 83)이다:

[0182]
```
    10      20      30      40      50      60
MNRQLVNILT ALFAFFLETN HFRTAFCKDH DSRSGKQPSQ TLSPSDFLDK LMGRTSGYDA
    70      80      90     100     110     120
RIRPNFKGPP VNVTCNIFIN SFGSVTETTM DYRVNIFLRQ QWNDSRLAYS EYPDDSLDLD
    130     140     150     160     170     180
PSMLDSIWKP DLFFANEKGA NFHDVTTDNK LLRISKNGKV LYSIRLTLTL SCPMDLKNFP
    190     200     210     220     230     240
MDVQTCTMQL ESFGYTMNDL IFEWLSDGPV QVAEGLTLPQ FILKEEKELG YCTKHYNTGK
    250     260     270     280     290     300
FTCIEVKFHL ERQMGYYLIQ MYIPSLLIVI LSWVSFWINM DAAPARVALG ITTVLTMTTQ
    310     320     330     340     350     360
SSGSRASLPK VSYVKAIDIW MAVCLLFVFA ALLEYAAVNF VSRQHKEFLR LRRRQKRQNK
    370     380     390     400     410     420
EEDVTRESRF NFSGYGMGHC LQVKDGTAVK ATPANPLPQP PKDGDAIKKK FVDRAKRIDT
    430     440     450     452
ISRAAFPLAF LIFNIFYWIT YKIIRHEDVH KK
```

[0183] (SEQ ID NO: 83).

[0184] 일부 실시태양에서, 야생형 LGIC 수용체는 *GLRA3* 유전자(젠뱅크 수탁번호 NM_006529.3, SEQ ID NO: 84)에 의해 암호화된 인간 알파 3 글리신 수용체(GlyRα3) 아이소폼 L(젠뱅크(GenBank) 수탁번호 NP_006520.2, SEQ ID NO: 85)이다:

```
    10      20      30      40      50      60
MAHVRHFRTL VSGFYFWEAA LLLSLVATKE TDSARSRSAP MSPSDFLDKL MGRTSGYDAR
    70      80      90     100     110     120
IRPNFKGPPV NVTCNIFINS FGSIAETTMD YRVNIFLRQK WNDPRLAYSE YPDDSLDLDP
    130     140     150     160     170     180
SMLDSIWKPD LFFANEKGAN FHEVTTDNKL LRIFKNGNVL YSIRLTLTLS CPMDLKNFPM
    190     200     210     220     230     240
DVQTCIMQLE SFGYTMNDLI FEWQDEAPVQ VAEGLTLPQF LLKEEKDLRY CTKHYNTGKF
    250     260     270     280     290     300
TCIEVRFHLE RQMGYYLIQM YIPSLLIVIL SWVSFWINMD AAPARVALGI TTVLTMTTQS
    310     320     330     340     350     360
SGSRASLPKV SYVKAIDIWM AVCLLFVFSA LLEYAAVNFV SRQHKELLRF RRKRKNKTEA
    370     380     390     400     410     420
FALEKFYRFS DMDDEVRESR FSFTAYGMGP CLQAKDGMTP KGPNHPVQVM PKSPDEMRKV
    430     440     450     460   464
FIDRAKKIDT ISRACFPLAF LIFNIFYWVI YKILRHEDIH QQQD
```

[0185]

[0186] (SEQ ID NO: 85).

[0187] 일부 실시태양에서, 야생형 LGIC 수용체는 *GLRA3* 유전자(젠뱅크 수탁번호 NM_001042543.3, SEQ ID NO: 86)에 의해 암호화된 인간 알파 3 글리신 수용체(GlyRα3) 아이소폼 K(젠뱅크(GenBank) 수탁번호 NP_001036008.1, SEQ ID NO: 87이다:

```
    10      20      30      40      50
MAHVRHFRTL VSGFYFWEAA LLLSLVATKE TDSARSRSAP MSPSDFLDKL
    60      70      80      90     100
MGRTSGYDAR IRPNFKGPPV NVTCNIFINS FGSIAETTMD YRVNIFLRQK
    110     120     130     140     150
WNDPRLAYSE YPDDSLDLDP SMLDSIWKPD LFFANEKGAN FHEVTTDNKL
    160     170     180     190     200
LRIFKNGNVL YSIRLTLTLS CPMDLKNFPM DVQTCIMQLE SFGYTMNDLI
    210     220     230     240     250
FEWQDEAPVQ VAEGLTLPQF LLKEEKDLRY CTKHYNTGKF TCIEVRFHLE
    260     270     280     290     300
RQMGYYLIQM YIPSLLIVIL SWVSFWINMD AAPARVALGI TTVLTMTTQS
    310     320     330     340     350
SGSRASLPKV SYVKAIDIWM AVCLLFVFSA LLEYAAVNFV SRQHKELLRF
    360     370     380     390     400
RRKRKNKDDE VRESRFSFTA YGMGPCLQAK DGMTPKGPNH PVQVMPKSPD
    410     420     430     440
EMRKVFIDRA KKIDTISRAC FPLAFLIFNI FYWVIYKILR HEDIHQQQD
```

[0188]

[0189] (SEQ ID NIO: 87).

[0190] 일부 실시태양에서, 야생형 LGIC 수용체는 *CHRNA7* 유전자(젠뱅크 수탁번호 NM_000746.5, SEQ ID NO: 3)에 의해 암호화된 인간 니코틴성 콜린성 수용체 알파 7 서브유닛(α7-nAchR)(젠뱅크(GenBank) 수탁번호 NP_000737.1, SEQ ID NO: 4)이다:

```
    10      20      30      40      50      60
MRCSPGGVWL ALAASLLHVS LQGEFQRKLY KELVKNYNPL ERPVANDSQP LTVYFSLSLL
    70      80      90     100     110     120
QIMDVDEKNQ VLTTNIWLQM SWTDHYLQWN VSEYPGVKTV RFPDGQIWKP DILLYNSADE
    130     140     150     160     170     180
RFDATFHTNV LVNSSGHCQY LPPGIFKSSC YIDVRWFPFD VQHCKLKFGS WSYGGWSLDL
    190     200     210     220     230     240
QMQEADISGY IPNGEWDLVG IPGKRSERFY ECCKEPYPDV TFTVTMRRRT LYYGLNLLIP
    250     260     270     280     290     300
CVLISALALL VFLLPADSGE KISLGITVLL SLTVFMLLVA EIMPATSDSV PLIAQYFAST
    310     320     330     340     350     360
MIIVGLSVVV TVIVLQYHHH DPDGGKMPKW TRVILLNWCA WFLRMKRPGE DKVRPACQHK
    370     380     390     400     410     420
QRRCSLASVE MSAVAPPPAS NGNLLYIGFR GLDGVHCVPT PDSGVVCGRM ACSPTHDEHL
    430     440     450     460     470     480
LHGGQPPEGD PDLAKILEEV RYIANRFRCQ DESEAVCSEW KFAACVVDRL CLMAFSVFTI
    490     500 502
ICTIGILMSA PNFVEAVSKD FA
```

[0191]

[0192] (SEQ ID NO: 4).

[0193] 일부 실시태양에서, 야생형 LGIC 수용체는 *HTR3A* 유전자(젠뱅크 수탁번호 NM_213621.3, SEQ ID NO: 5)에 의해 암호화된 인간 5-하이드록시트립타민 수용체 3A (5HT3A, 젠뱅크 수탁번호 NP_998786.2, SEQ ID NO: 6)이다:

(a) *MLGKLAMLLWVQQALLALLLPTL***LAQGEARRSRNTTRPALLRLSDYL LTNYRKGVRPVRDWRKPTTVSIDVIVYAILNVDEKNQVLTTYIWYRQYWTDEF LQWNPEDFDNITKLSIPTDSIWVPDILINEFVDVGKSPNIPYVYIRHQGEVQNYKP LQVVTACSLDIYNFPFDVQNCSLTFTSWLHTIQDINISLWRLPEKVKSDRSVFMN QGEWELLGVLPYFREFSMESSNYYAEMKFYVVIRRR**PLFYVVSLLLPSIFLMVMD IVGFYLPPNSGERVSFKITLLLGYSVFLIIVSDTLPATAIGTPLIGKAPPGSRAQSGEKPA PSHLLHVSLASALGCTGVYFVVCMALLVISLAETIFIVRLVHKQDLQQPVPAWLRHL VLERIAWLLCLREQSTSQRPPATSQATKTDDCSAMGNHCSHMGGPQDFEKSPRDRC SPPPPPREASLAVCGLLQELSSIRQFLEKRDEIREVARDWLRVGSVLDKLLFHIYLLAV LAYSITLVMLWSIWQYA (SEQ ID NO:6).

[0194]

[0195] 일부 실시태양에서, 야생형 LGIC 수용체는 *HTR3B* 유전자(젠뱅크 수탁번호 NM_006028.4, SEQ ID NO: 56)에 의해 암호화된 인간 5-하이드록시트립타민 수용체 3B (5HT3B 젠뱅크 수탁번호 NP_006019.1, SEQ ID NO: 57)이다:

(a) *MLSSVMAPLWACILVAAGILA***TDTHHPQDSALYHLSKQLLQKYHKEV RPVYNWTKATTVYLDLFVHAILDVDAENQILKTSVWYQEVWNDEFLSWNSSMF DEIREISLPLSAIWAPDIIINEFVDIERYPDLPYVYVNSSGTIENYKPIQVVSACSLE TYAFPFDVQNCSLTFKSILHTVEDVDLAFLRSPEDIQHDKKAFLNDSEWELLSVS STYSILQSSAGGFAQIQFNVVMRRHP**LVYVVSLLIPSIFLMLVDLGSFYLPPNCRARI VFKTSVLVGYTVFRVNMSNQVPRSVGSTPLIGHFFTICMAFLVLSLAKSIVLVKFLHD EQRGGQEQPFLCLRGDTDADRPRVEPRAQRAVVTESSLYGEHLAQPGTLKEVWSQL QSISNYLQTQDQTDQQEAEWLVLLSRFDRLLFQSYLFMLGIYTITLCSLWALWGGV (SEQ ID NO:57).

[0196]

[0197] 일부 실시태양에서, 야생형 LGIC 수용체는 *GABRB3* 유전자(젠뱅크 수탁번호 NM_000814.5, SEQ ID NO: 7)에 의해 암호화된 인간 감마-아미노뷰티르산 수용체 A(GABA-A), 서브세트 베타-3(GABA-A β3)(젠뱅크 수탁번호 NP_000805.1, SEQ ID NO: 8)이다:

(a) *MWGLAGGRLFGIFSAPVLVAVVCCA***QSVNDPGNMSFVKETVDKLLKG YDIRLRPDFGGPPVCVGMNIDIASIDMVSEVNMDYTLTMYFQQYWRDKRLAYS GIPLNLTLDNRVADQLWVPDTYFLNDKKSFVHGVTVKNRMIRLHPDGTVLYGL RITTTAACMMDLRRYPLDEQNCTLEIESYGYTTDDIEFYWRGGDKAVTGVERIE LPQFSIVEHRLVSRNVVFATGAYPRLSLSFRLKRNIGY**FILQTYMPSILITILSWVSF WINYDASAARVALGITTVLTMTTINTHLRETLPKIPYVKAIDMYLMGCFVFVFLALL EYAFVNYIFFGRGPQRQKKLAEKTAKAKNDRSKSESNRVDAHGNILLTSLEVHNEM NEVSGGIGDTRNSAISFDNSGIQYRKQSMPREGHGRFLGDRSLPHKKTHLRRRSSQLK IKIPDLTDVNAIDRWSRIVFPFTFSLFNLVYWLYYVN (SEQ ID NO:8).

[0198]

[0199] 일부 실시태양에서, 야생형 LGIC 수용체는 *GABRR1* 유전자(젠뱅크 수탁번호 NM_002042.4, SEQ ID NO: 9)에 의해 암호화된 인간 GABA-A, 서브세트 rho1(ρ1)(GABA-A ρ1)(젠뱅크 수탁번호 NP_002033.2, SEQ ID NO: 10)이다:

(a) *MLAVPNMRFGIFLLWWGWVLA***TESRMHWPGREVHEMSKKGRPQRQ**
RREVHEDAHKQVSPILRRSPDITKSPLTKSEQLLRIDDHDFSMRPGFGGPAIPVG
VDVQVESLDSISEVDMDFTMTLYLRHYWKDERLSFPSTNNLSMTFDGRLVKKI
WVPDMFFVHSKRSFIHDTTTDNVMLRVQPDGKVLYSLRVTVTAMCNMDFSRFP
LDTQTCSLEIESYAYTEDDLMLYWKKGNDSLKTDERISLSQFLIQEFHTTTKLAF
YSSTGWYNRLYINFTLRRHIFFFLLQTYFPATLMVMLSWVSFWIDRRAVPARVPLG
ITTVLTMSTIITGVNASMPRVSYIKAVDIYLWVSFVFVFLSVLEYAAVNYLTTVQERK
EQKLREKLPCTSGLPPPRTAMLDGNYSDGEVNDLDNYMPENGEKPDRMMVQLTLA
SERSSPQRKSQRSSYVSMRIDTHAIDKYSRIIFPAAYILFNLIYWSIFS (SEQ ID NO:10).

[0200]

[0201] 일부 실시태양에서, 야생형 LGIC 수용체는 GABRR2 유전자(젠뱅크 수탁번호 NM_002043.4, SEQ ID NO: 11)에 의해 암호화된 인간 GABA-A, 서브세트 rho2(ρ2)(GABA-A ρ2)(젠뱅크 수탁번호 NP_002034.3, SEQ ID NO: 12)이다:

(a) *MPYFTRLILFLFCLMVLVES***RKPKRKRWTGQVEMPKPSHLYKKNLD**
VTKIRKGKPQQLLRVDEHDFSMRPAFGGPAIPVGVDVQVESLDSISEVDMDFTM
TLYLRHYWKDERLAFSSASNKSMTFDGRLVKKIWVPDVFFVHSKRSFTHDTTT
DNIMLRVFPDGHVLYSMRITVTAMCNMDFSHFPLDSQTCSLELESYAYTDEDLM
LYWKNGDESLKTDEKISLSQFLIQKFHTTSRLAFYSSTGWYNRLYINFTLRRHIF
FFLLQTYFPATLMVMLSWVSFWIDRRAVPARVSLGITTVLTMTTIITGVNASMPRVS
YVKAVDIYLWVSFVFVFLSVLEYAAVNYLTTVQERKERKLREKFPCMCGMLHSKT
MMLDGSYSESEANSLAGYPRSHILTEEERQDKIVVHLGLSGEANAARKKGLLKGQT
GFRIFQNTHAIDKYSRLIFPASYIFFNLIYWSVFS (SEQ ID NO:12).

[0202]

[0203] 일부 실시태양에서, 야생형 LGIC 수용체는 GABRR3 유전자(젠뱅크 수탁번호 NM_001105580.2, SEQ ID NO: 13)에 의해 암호화된 인간 GABA-A, 서브세트 rho3(ρ3)(GABA-A ρ3)(젠뱅크 수탁번호 NP_001099050.1, SEQ ID NO: 14)이다:

(a) *MVLAFQLVSFTYIWIILKPNVCA***ASNIKMTHQRCSSSMKQTCKQETRM**
KKDDSTKARPQKYEQLLHIEDNDFAMRPGFGGSPVPVGIDVHVESIDSISETNMD
FTMTFYLRHYWKDERLSFPSTANKSMTFDHRLTRKIWVPDIFFVHSKRSFIHDT
TMENIMLRVHPDGNVLLSLRITVSAMCFMDFSRFPLDTQNCSLELESYAYNEDD
LMLYWKHGNKSLNTEEHMSLSQFFIEDFSASSGLAFYSSTGWYNRLFINFVLRR
HVFFFVLQTYFPAILMVMLSWVSFWIDRRAVPARVSLGITTVLTMSTIITAVSASMPQ
VSYLKAVDVYLWVSSLFVFLSVIEYAAVNYLTTVEERKQFKKTGKISRMYNIDAVQ
AMAFDGCYHDSEIDMDQTSLSLNSEDFMRRKSICSPSTDSSRIKRRKSLGGHVGRIILE
NNHVIDTYSRILFPIVYILFNLFYWGVYV (SEQ ID NO:14).

[0204]

[0205] 일부 양태에서, 조작된 수용체는 키메라 LGIC 수용체이다. 일부 실시태양에서, 키메라 수용체는 적어도 제 1 LGIC로부터 유래된 리간드 결합 도메인 서열 및 이온 기공 전도 도메인 서열, 또는 더 단순하게는, 적어도 제 2 LGIC로부터 유래된 "이온 기공 도메인 서열"을 포함한다. 일부 실시태양에서, 유래된 아미노산 서열은 이것이 유래된 LGIC의 상응하는 영역과 동일하다. 일부 실시태양에서, 유래된 아미노산 서열은 이것이 유래된 LGIC의 상응하는 영역과 비교하여 적어도 하나의 아미노산 위치에서 변경을 함유할 수 있다. 일부 실시태양에서, LGIC 서열로부터 유래된 아미노산 서열은 원래 아미노산 서열의 상응하는 영역과 최대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 아미노산 잔기까지 상이하다. 일부 실시태양에서, 유래된 아미노산 서열은 LGIC 아미노산 서열의 해당 영역에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 적어도 99.5% (이 사이의 모든 범위 및 하위 범위 포함) 서열 동일성을 가진다.

[0206] 일부 실시태양에서, 제 1 및 제 2 LGIC는 Cys-루프 수용체이다. Cys-루프 수용체의 리간드 결합 도메인 서열 및

이온 기공 도메인 서열은 당업계에 주지되어 있고, 공공연하게 입수 가능한 소프트웨어, 예를 들어, PubMed, Genbank, Uniprot 등의 사용에 의해 문헌으로부터 용이하게 확인될 수 있다. 일부 실시태양에서, 키메라 수용체의 리간드 결합 도메인은 제 1 LGIC의 리간드 결합 도메인에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5% 또는 100% 서열 동일성을 가진다. 일부 실시태양에서, 키메라 수용체의 이온 기공 도메인은 제 2 LGIC의 이온 기공 도메인에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5% 또는 100% 서열 동일성을 가진다. 위에 기술된 서열에서, 리간드 결합 도메인은 볼드체이며, 이온 기공 도메인은 밑줄 표시되어 있다.

[0207] 일부 실시태양에서, 키메라 수용체의 리간드 결합 도메인은 인간 글리신 수용체의 리간드 결합 도메인 서열로부터 유래된다. 일부 실시태양에서, 인간 글리신 수용체는 인간 GlyRα1(SEQ ID NO: 2)이다. 일부 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 SEQ ID NO: 2의 GlyRα1의 약 아미노산 29-235, 예를 들어, 아미노산 29-235, 아미노산 29-240, 아미노산 29-246, 아미노산 29-248, 아미노산 29-250, 또는 아미노산 29-252에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 특정의 이러한 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 29-235로 필수적으로 이루어지고, SEQ ID NO: 2의 아미노산 29-240으로 필수적으로 이루어지며, SEQ ID NO: 2의 아미노산 29-246으로 필수적으로 이루어지고, SEQ ID NO: 2의 아미노산 29-248로 필수적으로 이루어지며, SEQ ID NO: 2의 아미노산 29-250으로 필수적으로 이루어지고, SEQ ID NO: 2의 아미노산 29-252로 필수적으로 이루어진다. 일부 실시태양에서, 이온 기공 도메인 서열은 인간 GlyRα1 이외의 Cys-루프 수용체로부터 유래된다.

[0208] 일부 실시태양에서, 키메라 수용체의 리간드 결합 도메인은 인간 니코틴 콜린성 수용체의 리간드 결합 도메인 서열을 포함한다. 일부 실시태양에서, 인간 니코틴 콜린성 수용체는 인간 α7-nAChR이다. 일부 이러한 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 α7-nAChR(SEQ ID NO: 4)의 대략 아미노산 23-220, 예를 들어, SEQ ID NO: 4의 아미노산 23-220, 아미노산 23-221, 아미노산 23-222, 아미노산 23-223, 아미노산 23-224, 아미노산 23-225, 아미노산 23-226, 아미노산 23-227, 아미노산 23-228, 아미노산 23-229, 아미노산 23-230 또는 아미노산 23-231을 포함한다. 특정의 이러한 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 SEQ ID NO: 4의 아미노산 23-220, 아미노산 23-221, 아미노산 23-222, 아미노산 23-223, 아미노산 23-224, 아미노산 23-225, 아미노산 23-226, 아미노산 23-227, 아미노산 23-228, 아미노산 23-229, 아미노산 23-230, 또는 아미노산 23-231로 필수적으로 이루어진다. 일부 실시태양에서, 이온 기공 도메인 서열은 인간 α7-nAChR 이외의 Cys-루프 수용체로부터 유래된다.

[0209] 일부 실시태양에서, 키메라 수용체의 리간드 결합 도메인은 인간 세로토닌 수용체의 리간드 결합 도메인 서열로부터 유래된다. 일부 실시태양에서, 키메라 수용체의 리간드 결합 도메인은 인간 세로토닌 수용체의 리간드 결합 도메인 서열을 포함한다. 일부 실시태양에서, 인간 세로토닌 수용체는 인간 5HT3A 또는 5HT3B이다. 일부 이러한 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 5HT3A(SEQ ID NO: 6)의 대략 아미노산 23-247, 예를 들어, 아미노산 23-240, 아미노산 30-245, 아미노산 23-247, 아미노산 23-250, 일부 예에서 SEQ ID NO: 6의 아미노산 30-255를 포함한다. 특정 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 SEQ ID NO: 6의 아미노산 23-240으로 필수적으로 이루어지고, SEQ ID NO: 6의 아미노산 23-245로 필수적으로 이루어지며, SEQ ID NO: 6의 아미노산 30-247로 필수적으로 이루어지고, SEQ ID NO: 6의 아미노산 23-250으로 필수적으로 이루어지며, SEQ ID NO: 6의 아미노산 23-255로 필수적으로 이루어진다. 일부 이러한 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 5HT3B(SEQ ID NO: 57)의 대략 아미노산 21-239, 예를 들어, 아미노산 21-232, 아미노산 21-235, 아미노산 21-240, 아미노산 21-245, 일부 예에서 SEQ ID NO: 57의 아미노산 21-247을 포함한다. 특정 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 SEQ ID NO: 57의 아미노산 21-239로 필수적으로 이루어지고, SEQ ID NO: 57의 아미노산 21-232로 필수적으로 이루어지며, SEQ ID NO: 57의 아미노산 21-235로 필수적으로 이루어지고, SEQ ID NO: 57의 아미노산 21-240으로 필수적으로 이루어지며, SEQ ID NO: 57의 아미노산 21-245로 필수적으로 이루어진다. 일부 실시태양에서, 이온 기공 도메인 서열은 인간 5-하이드록시트립타민 수용체 3 이외의 Cys-루프 수용체로부터 유래된다.

[0210] 일부 실시태양에서, 키메라 수용체의 리간드 결합 도메인은 인간 GABA 수용체의 리간드 결합 도메인 서열로부터 유래된다. 일부 실시태양에서, 인간 GABA 수용체는 인간 GABA-A β3이다. 일부 이러한 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 GABA-A β3(SEQ ID NO: 8)의 대략 아미노산 26-245, 예를 들어, 아미노산 26-240, 아미노산 26-245, 아미노산 26-248, 아미노산 26-250, 일부 예에서 SEQ ID NO: 8의 아미노산 26-255를 포함한다. 특정의 이러한 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 SEQ ID NO: 8의 아미노산 26-240으로 필수적으로 이루어지거나, SEQ ID NO: 8의 아미노산 26-245로 필수적으로 이루어지거나, SEQ ID NO: 8의 아미노산 26-248로 필수적으로 이루어지거나, SEQ ID NO: 8의 아미노산 26-250으로 필수적으로 이루어지거나, SEQ ID NO: 8의 아미노산 26-255로 필

수적으로 이루어진다. 일부 실시태양에서, 이온 기공 도메인 서열은 인간 GABA-A 수용체 이외의 Cys-루프 수용체로부터 유래된다.

[0211] 일부 실시태양에서, 리간드 결합 도메인에 융합된 이온 기공 도메인은 음이온을 전도하며, 예를 들어, 인간 글리신 수용체 또는 인간 세로토닌 수용체의 이온 기공 도메인 서열을 포함한다. 다른 실시태양에서, 리간드 결합 도메인에 융합된 이온 전도 포어 도메인은 양이온을 전도하며, 예를 들어, 인간 아세틸콜린 수용체 또는 인간 감마-아미노뷰티르산 수용체 A의 이온 기공 도메인 서열을 포함한다.

[0212] 일부 실시태양에서, 조작된 수용체의 이온 기공 도메인은 인간 글리신 수용체의 이온 기공 도메인 서열로부터 유래된다. 일부 실시태양에서, 인간 글리신 수용체는 인간 GlyRα1이다. 일부 실시태양에서, 이온 기공 도메인은 GlyRα1(SEQ ID NO: 2)의 대략 아미노산 245-457, 예를 들어, SEQ ID NO: 2의 아미노산 240-457, 아미노산 245-457, 아미노산 248-457, 아미노산 249-457, 아미노산 250-457, 아미노산 255-457, 또는 아미노산 260-457에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시태양에서, 이온 기공 도메인은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 245-457로 필수적으로 이루어지거나, SEQ ID NO: 2의 아미노산 248-457로 필수적으로 이루어지거나, SEQ ID NO: 2의 아미노산 249-457로 필수적으로 이루어지거나, SEQ ID NO: 2의 아미노산 250-457로 필수적으로 이루어진다.

[0213] 일부 실시태양에서, 키메라 수용체의 이온 기공 도메인은 인간 GlyRα2의 이온 기공 도메인 서열(SEQ ID NO: 83)을 포함한다. 일부 실시태양에서, 키메라 수용체의 이온 기공 도메인은 인간 GlyRα2의 이온 기공 도메인 서열(SEQ ID NO: 83)로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다. 일부 실시태양에서, 키메라 수용체의 이온 기공 도메인은 인간 GlyRα2의 이온 기공 도메인 서열(SEQ ID NO: 83)에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 적어도 99.5% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다. 일부 실시태양에서, 키메라 수용체의 이온 기공 도메인은 인간 GlyRα2의 이온 기공 도메인 서열(SEQ ID NO: 83)과 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다. 일부 실시태양에서, 인간 GlyRα2의 이온 기공 도메인 서열은 SEQ ID NO: 83의 아미노산 254-452를 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다. 일부 실시태양에서, 인간 GlyRα2의 이온 기공 도메인 서열은 SEQ ID NO: 83의 아미노산 254-452를 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다. 일부 실시태양에서, 인간 GlyRα2의 이온 기공 도메인 서열은 SEQ ID NO: 83의 아미노산 260-452를 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다.

[0214] 일부 실시태양에서, 키메라 수용체의 이온 기공 도메인은 인간 GlyRα3 아이소형 L의 이온 기공 도메인 서열(SEQ ID NO: 85)을 포함한다. 일부 실시태양에서, 키메라 수용체의 이온 기공 도메인은 인간 GlyRα3 아이소형 L(SEQ ID NO: 85)의 이온 기공 도메인 서열로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다. 일부 실시태양에서, 키메라 수용체의 이온 기공 도메인은 인간 GlyRα3 아이소형 L(SEQ ID NO: 85)의 이온 기공 도메인 서열에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 적어도 99.5% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다. 일부 실시태양에서, 키메라 수용체의 이온 기공 도메인은 인간 GlyRα3 아이소형 L(SEQ ID NO: 85)의 이온 기공 도메인 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이루어지거나, 이루어진다. 일부 실시태양에서, 인간 GlyRα3 아이소형 L의 이온 기공 도메인 서열은 SEQ ID NO: 85의 아미노산 253-464를 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다. 일부 실시태양에서, 인간 GlyRα3 아이소형 L의 이온 기공 도메인 서열은 SEQ ID NO: 85의 아미노산 257-464를 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다. 일부 실시태양에서, 인간 GlyRα3 아이소형 L의 이온 기공 도메인 서열은 SEQ ID NO: 85의 아미노산 259-464를 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다.

[0215] 일부 실시태양에서, 키메라 수용체의 이온 기공 도메인은 인간 GlyRα3 아이소형 K의 이온 기공 도메인 서열(SEQ ID NO: 87)을 포함한다. 일부 실시태양에서, 키메라 수용체의 이온 기공 도메인은 인간 GlyRα3 아이소형 K(SEQ ID NO: 87)의 이온 기공 도메인 서열로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다. 일부 실시태양에서, 키메라 수용체의 이온 기공 도메인은 인간 GlyRα3 아이소형 K(SEQ ID NO: 87)의 이온 기공 도메인 서열에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 적어도 99.5% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다. 일부 실시태양에서, 키메라 수용체의 이온 기공 도메인은 인간 GlyRα3 아이소형 K(SEQ ID NO: 87)의 이온 기공 도메인 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다. 일부 실시태양에서, 인간 GlyRα3 아이소형 K의 이온 기공 도메인 서열은 SEQ ID NO: 87의 아미노

산 253-449를 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다. 일부 실시태양에서, 인간 GlyRα3 아이소형 K의 이온 기공 도메인 서열은 SEQ ID NO: 87의 아미노산 257-449를 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다. 일부 실시태양에서, 인간 GlyRα3 아이소형 K의 이온 기공 도메인 서열은 SEQ ID NO: 87의 아미노산 259-449를 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다.

[0216] 일부 실시태양에서, 이온 기공 도메인은 인간 니코틴 콜린성 수용체의 이온 기공 도메인 서열로부터 유래된다. 일부 실시태양에서, 인간 니코틴 콜린성 수용체는 인간 α7-nAChR이다. 일부 실시태양에서, 이온 기공 도메인은 α7-nAChR(SEQ ID NO: 4)의 대략 아미노산 230-502, 예를 들어, 아미노산 227-502, 아미노산 230-502, 아미노산 231-502, 아미노산 232-502, 또는 아미노산 235-502에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 특정의 이러한 실시태양에서, 이온 기공 도메인은 SEQ ID NO: 4의 아미노산 227-502로 필수적으로 이루어지거나, SEQ ID NO: 4의 아미노산 230-502로 필수적으로 이루어지거나, SEQ ID NO: 4의 아미노산 231-502로 필수적으로 이루어지거나, SEQ ID NO: 4의 아미노산 232-502로 필수적으로 이루어지거나, 또는 SEQ ID NO: 4의 아미노산 235 내지 502로 필수적으로 이루어진다.

[0217] 일부 실시태양에서, 이온 기공 도메인은 인간 세로토닌 수용체의 이온 기공 도메인 서열로부터 유래된다. 일부 실시태양에서, 인간 세로토닌 수용체는 인간 5HT3A 또는 5HT3B이다. 일부 이러한 실시태양에서, 이온 기공 도메인은 5HT3A(SEQ ID NO: 6)의 대략 아미노산 248-516, 예를 들어, SEQ ID NO: 6의 아미노산 240-516, 아미노산 245-516, 아미노산 248-516, 아미노산 250-516, 또는 아미노산 255-516에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 적어도 99.5% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 특정의 이러한 실시태양에서, 이온 기공 도메인은 SEQ ID NO: 6의 아미노산 240-516으로 필수적으로 이루어지거나, SEQ ID NO: 6의 아미노산 245-516으로 필수적으로 이루어지거나, SEQ ID NO: 6의 아미노산 248-516으로 필수적으로 이루어지거나, SEQ ID NO: 6의 아미노산 250-516으로 필수적으로 이루어지거나, 아미노산 253-516으로 필수적으로 이루어진다. 일부 실시태양에서, 이온 기공 도메인은 5HT3B(SEQ ID NO: 57)의 대략 아미노산 240-441, 예를 들어, SEQ ID NO: 57의 아미노산 230-441, 아미노산 235-441, 아미노산 240-441, 아미노산 245-441, 또는 아미노산 250-441에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 적어도 99.5% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 특정의 이러한 실시태양에서, 이온 기공 도메인은 SEQ ID NO: 57의 아미노산 230-441로 필수적으로 이루어지거나, SEQ ID NO: 57의 아미노산 235-441로 필수적으로 이루어지거나, SEQ ID NO: 57의 아미노산 240-441로 필수적으로 이루어지거나, SEQ ID NO: 57의 아미노산 245-441로 필수적으로 이루어지거나, 아미노산 250-441로 필수적으로 이루어진다.

[0218] 일부 실시태양에서, 이온 기공 도메인은 인간 GABA 수용체의 이온 기공 도메인 서열로부터 유래된다. 일부 실시태양에서, 인간 GABA 수용체는 인간 GABA-A β3이다. 일부 실시태양에서, 이온 기공 도메인은 GABA-A β3(SEQ ID NO: 8)의 대략 아미노산 246-473, 예를 들어, SEQ ID NO: 8의 아미노산 240-473, 아미노산 245-473, 아미노산 247-473, 아미노산 250-473, 또는 아미노산 253-473에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 적어도 99.5% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 특정의 이러한 실시태양에서, 이온 기공 도메인은 SEQ ID NO: 8의 아미노산 240-473, SEQ ID NO: 8의 아미노산 245-473, SEQ ID NO: 8의 아미노산 247-473, SEQ ID NO: 8의 아미노산 250-473 또는 SEQ ID NO: 8의 아미노산 253-473으로 필수적으로 이루어진다.

[0219] 일부 실시태양에서, 키메라 수용체의 이온 기공 도메인은 인간 GABA-A p1(GABRR1, SEQ ID NO: 10)의 이온 기공 도메인 서열을 포함한다. 일부 실시태양에서, 키메라 수용체의 이온 기공 도메인은 인간 GABA-A p1(SEQ ID NO: 10)의 이온 기공 도메인 서열로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다. 일부 실시태양에서, 키메라 수용체의 이온 기공 도메인은 인간 GABA-A p1(SEQ ID NO: 10)의 이온 기공 도메인 서열에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 적어도 99.5% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다. 일부 실시태양에서, 키메라 수용체의 이온 기공 도메인은 인간 GABA-A p1의 이온 기공 도메인 서열(SEQ ID NO: 10)과 동일한 아미노산 서열을 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다. 일부 실시태양에서, 인간 GABA-A p1의 이온 기공 도메인 서열은 SEQ ID NO: 10의 아미노산 284-479를 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다. 일부 실시태양에서, 인간 GABA-A의 이온 기공 도메인 서열은 p1은 SEQ ID NO: 10의 아미노산 288-479를 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다. 일부 실시태양에서, 인간 GABA-A p1의 이온 기공 도메인 서열은 SEQ ID NO: 10의 아미노산 290-479를 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다.

[0220] 일부 실시태양에서, 키메라 수용체의 이온 기공 도메인은 인간 GABA-A p2(GABRR2, SEQ ID NO: 12)의 이온 기공 도메인 서열을 포함한다. 일부 실시태양에서, 키메라 수용체의 이온 기공 도메인은 인간 GABA-A p2(SEQ ID NO: 12)의 이온 기공 도메인 서열로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다. 일부 실시태양에서, 키메라 수용체의 이온 기공 도메인은 인간 GABA-A p2(SEQ ID NO: 12)의 이온 기공 도메인 서열에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 적어도 99.5% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다. 일부 실시태양에서, 키메라 수용체의 이온 기공 도메인은 인간 GABA-A p2(SEQ ID NO: 12)의 이온 기공 도메인 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다. 일부 실시태양에서, 인간 GABA-A p2의 이온 기공 도메인 서열은 SEQ ID NO: 12의 아미노산 265-466을 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다. 일부 실시태양에서, 인간 GABA-A의 이온 기공 도메인 서열은 p2는 SEQ ID NO: 12의 아미노산 269-466을 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다. 일부 실시태양에서, 인간 GABA-A p2의 이온 기공 도메인 서열은 SEQ ID NO: 12의 아미노산 271-466을 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다.

[0221] 일부 실시태양에서, 키메라 수용체의 이온 기공 도메인은 인간 GABA-A p3(GABRR3, SEQ ID NO: 14)의 이온 기공 도메인 서열을 포함한다. 일부 실시태양에서, 키메라 수용체의 이온 기공 도메인은 인간 GABA-A p3(SEQ ID NO: 14)의 이온 기공 도메인 서열로부터 유래된 아미노산 서열을 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다. 일부 실시태양에서, 키메라 수용체의 이온 기공 도메인은 인간 GABA-A p3(SEQ ID NO: 14)의 이온 기공 도메인 서열에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 적어도 99.5% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다. 일부 실시태양에서, 키메라 수용체의 이온 기공 도메인은 인간 GABA-A p3(SEQ ID NO: 14)의 이온 기공 도메인 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다. 일부 실시태양에서, 인간 GABA-A p3의 이온 기공 도메인 서열은 SEQ ID NO: 14의 아미노산 271-468을 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다. 일부 실시태양에서, 인간 GABA-Ap3의 이온 기공 도메인 서열은 SEQ ID NO: 14의 아미노산 275-468을 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다. 일부 실시태양에서, 인간 GABA-A p3의 이온 기공 도메인 서열은 SEQ ID NO: 14의 아미노산 277-467을 포함하거나, 필수적으로 이루어지거나, 이루어진다.

[0222] 일부 실시태양에서, 대상 키메라 리간드-개폐 이온 통로의 이온 기공 도메인은 이온 기공 도메인의 M2-M3 링커 도메인에 대해 이종성인 M2-M3 링커 도메인을 포함한다. "M2-M3 링커 도메인", 또는 "M2-M3 링커"는 수용체의 막관통 도메인 2(M2)의 C-말단 단부에 의해 이의 아미노(N)말단에서 그리고 수용체의 막관통 도메인 3(M3)의 N-말단 단부에 의해 이의 카복시(C)말단에 플랭킹된 LGIC의 이온 기공 도메인 내의 서열을 의미한다. LGIC의 M2-M3 링커는 당업계로부터 용이하게 결정되고/되거나 임의의 공공연하게 이용 가능한 단백질 분석 툴, 예를 들어, Expasy, uniProt 등을 이용함으로써 용이하게 결정될 수 있다. 일부 실시태양에서, 키메라 수용체의 이온 기공 도메인이 이종성 M2-M3 링커를 포함할 때, M2-M3 링커는 키메라 수용체의 리간드 결합 도메인과 동일한 수용체로부터 유래된다. 예를 들어, 대상 리간드-개폐 이온 통로가 AChR로부터의 리간드 결합 도메인 및 GlyR로부터의 이온 기공 도메인을 포함할 때, 이의 이온 기공 도메인 서열은 AChR로부터 유래된 M2-M3 링커 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시태양에서, 이온 기공 도메인은 GlyRα1로부터 유래되고, M2-M3 링커는 α7-nAChR로부터 유래된다. 일부 실시태양에서, 이온 기공 도메인으로부터 제거된 천연 M2-M3 링커 서열은 GlyRα1의 대략 아미노산 293-313(SEQ ID NO: 2), 예를 들어, 아미노산 304-310, 293-306, 298-310, 305-311, 302-313 등에 상응한다. 일부 이러한 실시태양에서, 삽입된 M2-M3 링커는 α7-nAChR의 대략 아미노산 281-295(SEQ ID NO: 4), 예를 들어, 아미노산 290-295, 281-290, 281-295, 283-295, 287-292 등 또는 α7-nAChR의 아미노산 281-295 또는 283-295에 대해 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 100% 동일한 서열로부터 유래된다.

[0223] 일부 실시태양에서, 대상 키메라 리간드-개폐 이온 통로의 리간드 결합 도메인은 리간드 결합 도메인의 Cys-루프 서열에 대해 이종성인 Cys-루프 도메인 서열을 포함한다. "Cys-루프 도메인 서열" 또는 "Cys-루프 서열"은 N-말단 및 C-말단에서 시스테인에 플랭킹된 루프 구조를 형성하는 Cys-루프 LGIC의 리간드 결합 도메인 내의 도메인을 의미한다. 이론에 의해 구속되지 않고, 리간드 결합 도메인에 대한 리간드의 결합 시, Cys-루프는 M2-M3 루프에 매우 근접하게 구조적으로 이동하며, 이 움직임은 이온 기공 도메인 내 신호 전달에 대한 세포외 도메인 내 리간드 결합의 생물물리학적 번역을 매개하는 것으로 여겨진다(Miller and Smart, Trends in Pharmacological Sci 2009:31(4)에서 검토되는 바와 같음). 내인성 Cys-루프 서열의 이종성 Cys-루프 서열로의

치환은 1.5배 이상, 예를 들어, 적어도 2배, 3배 또는 4배, 일부 예에서 적어도 5배 또는 6배만큼, 그리고 특정 용량에서, 적어도 7배, 8배, 9배 또는 10배만큼 LGIC의 전도도를 증가시킬 수 있다. Cys-루프 수용체의 Cys-루프 도메인은 당업계로부터 그리고/또는 임의의 공공연하게 이용 가능한 단백질 분석 툴, 예를 들어, Expasy, uniProt 등을 이용함으로써 용이하게 결정될 수 있다. 전형적으로, 키메라 수용체의 리간드 결합 도메인이 이종성 Cys-루프 서열을 포함할 때, Cys-루프 서열은 키메라 수용체의 이온 기공 도메인과 동일한 수용체로부터 유래된다. 예를 들어, 대상 키메라 리간드-개폐 이온 통로가 AChR로부터의 리간드 결합 도메인 및 GlyR로부터의 이온 기공 도메인을 포함할 때, 대상 리간드-개폐 이온 통로는, 대신에 GlyR로부터 유래된 Cys-루프 도메인의 서열을 제외하고, AChR로부터의 리간드 결합 도메인 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 α7-nAChR로부터 유래되고, Cys-루프 서열은 GLyR로부터 유래된다. 일부 실시태양에서, 리간드 결합 도메인으로부터 제거된 Cys-루프 서열은 α7-nAChR(SEQ ID NO: 4)의 대략 아미노산 150-164, 예를 들어, α7-nAChR의 아미노산 150-157에 상응한다. 일부 실시태양에서, 삽입된 Cys 루프 서열은 GlyRα1(SEQ ID NO: 2)의 대략 아미노산 166-180, 예를 들어, GlyRα1의 아미노산 166-172, 또는 GlyRα1의 아미노산 166-180과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 서열로부터 유래된다.

[0224] 일부 실시태양에서, 삽입된 Cys 루프 서열은 GlyRα2(SEQ ID NO:83)의 대략 아미노산 172-186, 예를 들어 GlyRα2의 아미노산 172-178, 또는 GlyRα2의 아미노산 172-186과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 서열로부터 유래된다. 일부 실시태양에서, 삽입된 Cys 루프 서열은 GlyRα3(SEQ ID NO:85 또는 87)의 대략 아미노산 171-185, 예를 들어 GlyRα3의 아미노산 171-177, 또는 GlyRα3의 아미노산 171-185와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 서열로부터 유래된다. 일부 실시태양에서, 삽입된 Cys 루프 서열은 GABA-A p1(SEQ ID NO:10)의 대략 아미노산 198-212, 예를 들어 GABA-A p1의 아미노산 198-204, 또는 GABA-A p1의 아미노산 198-212와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 서열로부터 유래된다. 일부 실시태양에서, 삽입된 Cys 루프 서열은 GABA-A p2(SEQ ID NO:12)의 대략 아미노산 178-192, 예를 들어 GABA-A p2의 아미노산 178-184, 또는 GABA-A p2의 아미노산 178-192와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 서열로부터 유래된다. 일부 실시태양에서, 삽입된 Cys 루프 서열은 GABA-A p3(SEQ ID NO:14)의 대략 아미노산 184-198, 예를 들어 GABA-A p3의 아미노산 184-190, 또는 GABA-A p3의 아미노산 184-198과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도 95% 동일한 서열로부터 유래된다.

[0225] 일부 실시태양에서, 대상 키메라 리간드-개폐 이온 통로의 리간드 결합 도메인은 리간드 결합 도메인의 β1-2 루프 도메인 서열에 대해 이종성인 β1-2 루프 도메인 서열을 포함한다. "β1-2 루프 도메인 서열", 또는 "β1-2 루프, 또는 β1-β2 루프"는 β1 시트의 C-말단에 의해 이의 N-말단에서, 그리고 β2 시트의 N-말단에 의해 이의 C-말단에 플랭킹된 Cys-루프 LGIC의 리간드 결합 도메인 내의 도메인을 의미한다. 이론에 의해 구속되지 않고, β1-2 루프는 이온 기공 도메인에 대한 세포외 도메인 내 리간드 결합의 생물물리학적 번역 및 후속적 신호전달(즉, GlyR의 경우에 염화물 유입)을 매개하게 하는 것으로 여겨진다. 리간드의 결합 시 β1-2 루프는 Cys-루프와 함께, M2-M3 루프에 근접하게 되어, M2-M3 루프 잔기가 있는 이온 기공 도메인 내 신호 전달에 대한 세포외 도메인 내 리간드 결합의 생물물리학적 번역을 매개하는 것으로 여겨진다(상기 Miller and Smart에서 검토되는 바와 같음). 내인성 β1-2 루프 서열의 이종성 β1-2 루프 서열로의 치환은 LGIC의 전도도를 1.5배 이상, 예를 들어, 적어도 2배, 3배 또는 4배, 일부 예에서 적어도 5배 또는 6배, 특정 용량에서, 적어도 7배, 8배, 9배 또는 10배만큼 증가시킬 수 있다. Cys-루프 수용체의 β1-2 루프는 당업계로부터 그리고/또는 임의의 공공연하게 이용 가능한 단백질 분석 툴, 예를 들어, Expasy, uniProt 등을 이용함으로써 용이하게 결정될 수 있다. 전형적으로, 키메라 수용체의 리간드 결합 도메인이 이종성 β1-2 루프 서열을 포함할 때, β1-2 루프 서열은 키메라 수용체의 이온 기공 도메인과 동일한 수용체로부터 유래된다. 예를 들어, 대상 키메라 리간드-개폐 이온 통로가 AChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 GlyR로부터 유래된 이온 기공 도메인을 포함할 때, 리간드 결합 도메인의 β1-2 루프 도메인의 서열은 GlyR로부터 유래될 수 있다. 일부 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 α7-nAChR로부터 유래된다. 일부 실시태양에서, 리간드 결합 도메인으로부터 제거된 β1-2 루프 서열은 α7-nAChR(SEQ ID NO: 4)의 대략 아미노산 67-72 또는 67-70, 예를 들어, α7-nACh의 아미노산 67-70, 66-71 또는 64-72에 상응한다. 일부 실시태양에서, 삽입된 β1-2 루프 서열은 최대 3개, 최대 2개, 최대 1개 아미노산 돌연변이를 갖거나 아미노산 돌연변이가 없는 GlyRα1(SEQ ID NO: 2)의 대략 아미노산 79-85, 예를 들어, GlyRα1의 아미노산 80-85, 81-84, 79-85, 또는 81-84이다. 일부 실시태양에서, 이온 기공 도메인은 GlyRα2로부터 유래되고 삽입된 β1-2 루프는 최대 3개, 최대 2개, 최대 1개 아미노산 돌연변이를 갖거나 아미노산 돌연변이가 없는 GlyRα2(SEQ ID NO:83)의 대략 아미노산 86-91에 상응한다. 일부 실시태양에서, 이온 기공 도메인은 GlyRα3에서 유래되고 삽입된 β1-2 루프는 최대 3개, 최대 2개, 최대 1개 아미노산 돌연변이를 갖거나 아미노산 돌연변이가 없는 GlyRα3(SEQ ID NO:85 또는 87)의 대략 아미노산 85-90에 상응한다. 일부 실시태양에서, 이온 기

공 도메인은 GABA-A p1로부터 유래되고 삽입된 β1-2 루프는 최대 3개, 최대 2개, 최대 1개 아미노산 돌연변이를 갖거나 아미노산 돌연변이가 없는 GABA-A p1(SEQ ID NO:10)의 대략 아미노산 112-117에 상응한다. 일부 실시태양에서, 이온 기공 도메인은 GABA-A p2로부터 유래되고 삽입된 β1-2 루프는 최대 3개, 최대 2개, 최대 1개 아미노산 돌연변이를 갖거나 아미노산 돌연변이가 없는 GABA-A p2(SEQ ID NO:12)의 대략 아미노산 92-97에 상응한다. 일부 실시태양에서, 이온 기공 도메인은 GABA-A p3에서 유도되고 삽입된 β1-2 루프는 최대 3개, 최대 2개, 최대 1개 아미노산 돌연변이를 갖거나 아미노산 돌연변이가 없는 GABA-A p3(SEQ ID NO:14)의 대략 아미노산 98-103에 상응한다. 일부 실시태양에서, 돌연변이는 아미노산 치환이다.

[0226] 일부 실시태양에서, 본 발명은 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인을 포함하는 키메라 LGIC 수용체를 제공하며, 여기서 리간드 결합 도메인은 본 발명의 하나 이상의 아미노산 치환 및 인간 글리신 수용체로부터 유래된 이온 기공 도메인을 포함한다. 일부 실시태양에서, 인간 글리신 수용체는 인간 글리신 수용체 α1, 인간 글리신 수용체 α2, 또는 인간 글리신 수용체 α3이다. 일부 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 인간 글리신 수용체로부터 유래된 Cys-루프 도메인을 포함한다. 일부 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 인간 글리신 수용체로부터 유래된 β1-2 루프 도메인을 포함한다.

[0227] 일부 실시태양에서, 본 발명은 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인을 포함하는 키메라 LGIC 수용체를 제공하며, 여기서 리간드 결합 도메인은 본 발명의 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하고, 인간 GABA 수용체로부터 유래된 이온 기공 도메인을 포함한다. 일부 실시태양에서, 인간 GABA 수용체는 인간 GABA-A p1, 인간 GABA-A p2 또는 인간 GABA-A p3이다. 일부 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 인간 GABA 수용체로부터 유래된 Cys-루프 도메인을 포함한다. 일부 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 인간 GABA 수용체로부터 유래된 β1-2 루프 도메인을 포함한다.

[0228] 본 발명의 키메라 LGIC 수용체의 서열의 비제한적 예는 SEQ ID NO: 15 - SEQ ID NO: 52로서 본 명세서에 개시된 서열을 포함한다. 일부 실시태양에서, 암호화하는 키메라 LGIC 수용체 또는 폴리뉴클레오타이드는 본 명세서의 SEQ ID NO: 15 - SEQ ID NO: 52에 제공된 서열에 대해 85% 이상의 서열 동일성, 예를 들어, 즉, 90% 이상, 93% 이상, 또는 95% 이상의 서열 동일성, 즉, SEQ ID NO: 15 - SEQ ID NO: 52에 제공된 서열에 대해 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 약 100%을 가진다. 서열에서, 신호 펩타이드는 이탤릭체이며, 리간드 결합 도메인은 볼드체이고, 이온 기공 도메인은 밑줄 표시된다.

[0229] 일부 실시태양에서, 키메라 LGIC 수용체는 인간 GlyRα1 이온 기공 도메인(밑줄 표시)에 융합된 인간 α7-nAChR 신호 펩타이드(이탤릭체) 및 리간드 결합 도메인(볼드체)을 포함하는 CHRNA7/GLRA1 키메라(R229 접합)이다:

*MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQ***GEFQRKLYKELVKNYNPLERPVANDSQPLTV**
YFSLSLLQIMDVDEKNQVLTTNIWLQMSWTDHYLQWNVSEYPGVKTVRFP
DGQIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGHCQYLPPGIFKSSCYIDVR
WFPFDVQHCKLKFGSWSYGGWSLDLQMQEADISGYIPNGEWDLVGIPGKR
SERFYECCKEPYPDVTFTVTMRRRMGYYLIQMYIPSLLIVILSWISFWINMDAA
PARVGLGITTVLTMTTQSSGSRASLPKVSYVKAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAV
NFVSRQHKELLRFRRKRRHHKSPMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAK
DGISVKGANNSNTTNPPPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFY
WIIYKIVRREDVHNQ

[0230]

[0231] (SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:15에 의해 암호화됨).

[0232] 일부 실시태양에서, 키메라 LGIC 수용체는 인간 GlyRα1 이온 기공 도메인(밑줄 표시)에 융합된 인간 α7-nAChR 신호 펩타이드(이탤릭체) 및 리간드 결합 도메인(볼드체)를 포함하는 CHRNA7/GLRA1(R228 접합) 키메라이다:

*MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQ***GEFQRKLYKELVKNYNPLERPVANDSQPLTV**
YFSLSLLQIMDVDEKNQVLTTNIWLQMSWTDHYLQWNVSEYPGVKTVRFP
DGQIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGHCQYLPPGIFKSSCYIDVR
WFPFDVQHCKLKFGSWSYGGWSLDLQMQEADISGYIPNGEWDLVGIPGKR
SERFYECCKEPYPDVTFTVTMRRQMGYYLIQMYIPSLLIVILSWISFWINMDAA
PARVGLGITTVLTMTTQSSGSRASLPKVSYVKAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAV
NFVSRQHKELLRFRRKRRHHKSPMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAK
DGISVKGANNSNTTNPPPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFY
WIIYKIVRREDVHNQ

[0233]

[0234] (SEQ ID NO:17).

[0235] 일부 실시태양에서, 키메라 LGIC 수용체는 인간 GlyRα1 이온 기공 도메인(밑줄 표시)에 융합된 인간 α7-nAChR 신호 펩타이드(이탤릭체) 및 리간드 결합 도메인(볼드체)을 포함하는 CHRNA7/GLRA1(V224 접합) 키메라이다:

*MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQ***GEFQRKLYKELVKNYNPLERPVANDSQPLTV**
YFSLSLLQIMDVDEKNQVLTTNIWLQMSWTDHYLQWNVSEYPGVKTVRFP
DGQIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGHCQYLPPGIFKSSCYIDVR
WFPFDVQHCKLKFGSWSYGGWSLDLQMQEADISGYIPNGEWDLVGIPGKR
SERFYECCKEPYPDVTFTVHLERQMGYYLIQMYIPSLLIVILSWISFWINMDAAP
ARVGLGITTVLTMTTQSSGSRASLPKVSYVKAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAV
NFVSRQHKELLRFRRKRRHHKSPMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAK
DGISVKGANNSNTTNPPPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFY
WIIYKIVRREDVHNQ

[0236]

[0237] (SEQ ID NO:18).

[0238] 일부 실시태양에서, 키메라 LGIC 수용체는 인간 GlyRα1 이온 기공 도메인(밑줄 표시)에 융합된 인간 α7-nAChR 신호 펩타이드(이탤릭체) 및 리간드 결합 도메인(볼드체)을 포함하는 CHRNA7/GLRA1(Y233 접합) 키메라이다:

*MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQ***GEFQRKLYKELVKNYNPLERPVANDSQPLTV**
YFSLSLLQIMDVDEKNQVLTTNIWLQMSWTDHYLQWNVSEYPGVKTVRFP
DGQIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGHCQYLPPGIFKSSCYIDVR
WFPFDVQHCKLKFGSWSYGGWSLDLQMQEADISGYIPNGEWDLVGIPGKR
SERFYECCKEPYPDVTFTVTMRRRTLYYLIQMYIPSLLIVILSWISFWINMDAAP
ARVGLGITTVLTMTTQSSGSRASLPKVSYVKAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAV
NFVSRQHKELLRFRRKRRHHKSPMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAK
DGISVKGANNSNTTNPPPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFY
WIIYKIVRREDVHNQ

[0239]

[0240] (SEQ ID NO:19).

[0241] 일부 실시태양에서, 키메라 LGIC 수용체는 α7-nAChR M2-M3 링커(소문자)를 포함하는 인간 GlyRα1 이온 기공 도메인(밑줄 표시)에 융합된 인간 α7-nAChR 신호 펩타이드(이탤릭체) 및 리간드 결합 도메인(볼드체)을 포함하는 CHRNA7/GLRA1 키메라(R229 접합)이다:

(a) *MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQ***GEFQRKLYKELVKNYNPLERPVAND SQPLTVYFSLSLLQIMDVDEKNQVLTTNIWLQMSWTDHYLQWNVSEYPGVKTV RFPDGQIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGHCQYLPPGIFKSSCYIDVR WFPFDVQHCKLKFGSWSYGGWSLDLQMQEADISGYIPNGEWDLVGIPGKRSER FYECCKEPYPDVTFTVTMRRR**MGYYLIQMYIPSLLIVILSWISFWINMDAAPARVG LGITTVLTMTTQSSGSeimpatsdsvSYVKAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVNFVSRQH KELLRFRRKRRHHKSPMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKDGISVKGANN SNTTNPPPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFYWIIYKIVRREDVH NQ

[0242]

[0243] (SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:20에 의해 암호화됨);

(b) *MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQ***GEFQRKLYKELVKNYNPLERPVAND SQPLTVYFSLSLLQIMDVDEKNQVLTTNIWLQMSWTDHYLQWNVSEYPGVKTV RFPDGQIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGHCQYLPPGIFKSSCYIDVR WFPFDVQHCKLKFGSWSYGGWSLDLQMQEADISGYIPNGEWDLVGIPGKRSER FYECCKEPYPDVTFTVTMRRR**MGYYLIQMYIPSLLIVILSWISFWINMDAAPARVG LGITTVLTMTTQSSGSeimpatsdsvpliaqAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVNFVSRQHK ELLRFRRKRRHHKSPMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKDGISVKGANNS NTTNPPPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFYWIIYKIVRREDVHN Q

[0244]

[0245] (SEQ ID NO:23, SEQ ID NO:22에 의해 암호화됨);

(c) *MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQ***GEFQRKLYKELVKNYNPLERPVANDSQ PLTVYFSLSLLQIMDVDEKNQVLTTNIWLQMSWTDHYLQWNVSEYPGVKTVRFPD GQIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGHCQYLPPGIFKSSCYIDVRWFPFDV QHCKLKFGSWSYGGWSLDLQMQEADISGYIPNGEWDLVGIPGKRSERFYECCKEP YPDVTFTVTMRRR**MGYYLIQMYIPSLLIVILSWISFWINMDAAPARVGLGITTVLTMTT QSSGSRASLPKVsdsvplIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVNFVSRQHKELLRFRRKRRHHK SPMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKDGISVKGANNSNTTNPPPAPSKSPEEM RKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFYWIIYKIVRREDVHNQ

[0246]

[0247] (SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:24에 의해 암호화됨);

(d) *MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQ***GEFQRKLYKELVKNYNPLERPVAND SQPLTVYFSLSLLQIMDVDEKNQVLTTNIWLQMSWTDHYLQWNVSEYPGVKTV RFPDGQIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGHCQYLPPGIFKSSCYIDVR WFPFDVQHCKLKFGSWSYGGWSLDLQMQEADISGYIPNGEWDLVGIPGKRSER FYECCKEPYPDVTFTVTM**ERQMGYYLIQMYIPSLLIVILSWISFWINMDAAPARVGL GITTVLTMTTQSSGSeimpatsdsvpliaqAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVNFVSRQHKE LLRFRRKRRHHKSPMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKDGISVKGANNSN TTNPPPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFYWIIYKIVRREDVHNQ

[0248]

[0249] (SEQ ID NO:27, SEQ ID NO:26에 의해 암호화됨);

(e) *MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQ***GEFQRKLYKELVKNYNPLERPVAND SQPLTVYFSLSLLQIMDVDEKNQVLTTNIWLQMSWTDHYLQWNVSEYPGVKTV RFPDGQIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGHCQYLPPGIFKSSCYIDVR WFPFDVQHCKLKFGSWSYGGWSLDLQMQEADISGYIPNGEWDLVGIPGKRSER FYECCKEPYPDVTFTVTMRRRT**GYYLIQMYIPSLLIVILSWISFWINMDAAPARVGL GITTVLTMTTQSSGSeimpatsdsvpliaqAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVNFVSRQHKE LLRFRRKRRHHKSPMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKDGISVKGANNSN TTNPPPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFYWIIYKIVRREDVHNQ

[0250]

[0251] (SEQ ID NO:29, SEQ ID NO:28에 의해 암호화됨); 또는

(f) *MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQ***GEFQRKLYKELVKNYNPLERPVAND SQPLTVYFSLSLLQIMDVDEKNQVLTTNIWLQMSWTDHYLQWNVSEYPGVKTV RFPDGQIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGHCQYLPPGIFKSSCYIDVR WFPFDVQHCKLKFGSWSYGGWSLDLQMQEADISGYIPNGEWDLVGIPGKRSER FYECCKEPYPDVTFTVTMRRRTL**YYLIQMYIPSLLIVILSWISFWINMDAAPARVGL GITTVLTMTTQSSGSeimpatsdsvpliaqAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVNFVSRQHKE LLRFRRKRRHHKSPMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKDGISVKGANNSN TTNPPPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFYWIIYKIVRREDVHNQ

[0252]

[0253] (SEQ ID NO:31, SEQ ID NO:30에 의해 암호화됨).

[0254] 일부 실시태양에서, 키메라 LGIC 수용체는 인간 GlyRα1 이온 기공 도메인(밑줄 표시)에 융합된, GlyRα1 Cys-루프 서열(소문자)을 포함하는 리간드 결합 도메인(볼드체) 및 인간 α7-nAChR 신호 펩타이드(이탤릭체)를 포함하는 CHRNA7/GLRA1 키메라이다. 일부 실시태양에서, 키메라 LGIC 수용체는 SEQ ID NO: 33에 대해 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 98% 이상, 99% 이상 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다:

```
    10      20      30      40      50      60
MRCSPGGVWL ALAASLLHVS LQGEFQRKLY KELVKNYNPL ERPVANDSQP LTVYFSLSLL
    70      80      90     100     110     120
QIMDVDEKNQ VLTTNIWLQM SWTDHYLQWN VSEYPGVKTV RFPDGQIWKP DILLYNSADE
    130     140     150     160     170     180
RFDATFHTNV LVNSSGHCQY LPPGIFKSSc pmdlknfpmd vqtcKLKFGS WSYGGWSLDL
    190     200     210     220     230     240
QMQEADISGY IPNGEWDLVG IPGKRSERFY ECCKEPYPDV TFTVTMRRRM GYYLIQMYIP
    250     260     270     280     290     300
SLLIVILSWI SFWINMDAAP ARVGLGITTV LTMTTQSSGS RASLPKVSYV KAIDIWMAVC
    310     320     330     340     350     360
LLFVFSALLE YAAVNFVSRQ HKELLRFRRK RRHHKSPMLN LFQEDEAGEG RFNFSAYGMG
    370     380     390     400     410     420
PACLQAKDGI SVKGANNSNT TNPPPAPSKS PEEMRKLFIQ RAKKIDKISR IGFPMAFLIF
    430     439
NMFYWIIYKI VRREDVHNQ
```

[0255]

[0256] (SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:32에 의해 암호화됨).

(a)

*MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQ***GEFQRKLYKELVKNYNPLERPVANDSQPLTVYFS**
LSLLQIMDVDEKNQVLTTNIWLQMSWTDHYLQWNVSEYPGVKTVRFPDGQIW
KPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGHCQYLPPGIFKSScpmdlknFPFDVQHCK
LKFGSWSYGGWSLDLQMQEADISGYIPNGEWDLVGIPGKRSERFYECCKEPYP
DVTFTVTMRRRMGYYLIQMYIPSLLIVILSWISFWINMDAAPARVGLGITTVLTMTT
QSSGSRASLPKVSYVKAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVNFVSRQHKELLRFRRKRR
HHKSPMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKDGISVKGANNSNTTNPPPAPS
KSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFYWIIYKIVRREDVHNQ

[0257]

[0258] (SEQ ID NO:35, SEQ ID NO:34에 의해 암호화됨).

[0259] 일부 실시태양에서, 키메라 LGIC 수용체는 인간 GlyRα1 이온 기공 도메인(밑줄 표시)에 융합된 GlyRα1 β1-2 루프 서열(소문자)을 포함하는 리간드 결합 도메인(볼드체) 및 인간 α7-nAChR 신호 펩타이드(이탤릭체)를 포함하는 CHRNA7/GLRA1 키메라이다:

(a) *MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQ***GEFQRKLYKELVKNYNPLERPVANDSQ**
PLTVYFSLSLLQIMDVDettmVLTTNIWLQMSWTDHYLQWNVSEYPGVKTVRFPDG
QIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGHCQYLPPGIFKSSCYIDVRWFPFDVQ
HCKLKFGSWSYGGWSLDLQMQEADISGYIPNGEWDLVGIPGKRSERFYECCKEPY
PDVTFTVTMRRRMGYYLIQMYIPSLLIVILSWISFWINMDAAPARVGLGITTVLTMTTQ
SSGSRASLPKVSYVKAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVNFVSRQHKELLRFRRKRRHHK
SPMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKDGISVKGANNSNTTNPPPAPSKSPEEM
RKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFYWIIYKIVRREDVHNQ

[0260]

[0261] (SEQ ID NO:37, SEQ ID NO:36에 의해 암호화됨).

[0262] 일부 실시태양에서, 키메라 LGIC 수용체는 인간 GlyRα1 이온 기공 도메인(밑줄 표시)에 융합된, GlyRα1 β1-2 루프 서열(소문자) 및 Cys-루프 서열(소문자)를 포함하는 리간드 결합 도메인(볼드체) 및 인간 α7-nAChR 신호 펩타이드(이탤릭체)을 포함하는 CHRNA7/GLRA1 키메라이다:

(a) *MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQ***GEFQRKLYKELVKNYNPLERPVAND**
SQPLTVYFSLSLLQIMDiaettmdLTTNIWLQMSWTDHYLQWNVSEYPGVKTVRFP
DGQIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGHCQYLPPGIFKSScpmdlknfpmd
vqtcKLKFGSWSYGGWSLDLQMQEADISGYIPNGEWDLVGIPGKRSERFYECCK
EPYPDVTFTVTMRRRMGYYLIQMYIPSLLIVILSWISFWINMDAAPARVGLGITTVL
TMTTQSSGSRASLPKVSYVKAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVNFVSRQHKELLRFR
RKRRHHKSPMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKDGISVKGANNSNTTNPP
PAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFYWIIYKIVRREDVHNQ

[0263]

[0264] (SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:38에 의해 암호화됨).

(b) *MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQ***GEFQRKLYKELVKNYNPLERPVAND SQPLTVYFSLSLLQIMDVDettmVLTTNIWLQMSWTDHYLQWNVSEYPGVKTVR FPDGQIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGHCQYLPPGIFKSScpmdlknfp mdvqtcKLKFGSWSYGGWSLDLQMQEADISGYIPNGEWDLVGIPGKRSERFYEC CKEPYPDVTFTVTMRRR**MGYYLIQMYIPSLLIVILSWISFWINMDAAPARVGLGITT VLTMTTQSSGSRASLPKVSYVKAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVNFVSRQHKELLR FRRKRRHHKSPMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKDGISVKGANNSNTTN PPPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFYWIIYKIVRREDVHNQ

[0265]

[0266] (SEQ ID NO:41, SEQ ID NO:40에 의해 암호화됨).

(c) *MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQ***GEFQRKLYKELVKNYNPLERPVAND SQPLTVYFSLSLLQIMDVDettmVLTTNIWLQMSWTDHYLQWNVSEYPGVKTVR FPDGQIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGHCQYLPPGIFKSScpmdlknfp mdvqtcKLKFGSWSYGGWSLDLQMQEADISGYIPNGEWDLVGIPGKRSERFYEC CKEPYPDVTFTVTM**ERQMGYYLIQMYIPSLLIVILSWISFWINMDAAPARVGLGITT VLTMTTQSSGSRASLPKVSYVKAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVNFVSRQHKELLR FRRKRRHHKSPMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKDGISVKGANNSNTTN PPPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFYWIIYKIVRREDVHNQ

[0267]

[0268] (SEQ ID NO:43, SEQ ID NO:42에 의해 암호화됨).

(d) *MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQ***GEFQRKLYKELVKNYNPLERPVAND SQPLTVYFSLSLLQIMDiaettmdLTTNIWLQMSWTDHYLQWNVSEYPGVKTVRFP DGQIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGHCQYLPPGIFKSScpmdlknfpmd vqtcKLKFGSWSYGGWSLDLQMQEADISGYIPNGEWDLVGIPGKRSERFYECCK EPYPDVTFTVTM**ERQMGYYLIQMYIPSLLIVILSWISFWINMDAAPARVGLGITTVLT MTTQSSGSRASLPKVSYVKAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVNFVSRQHKELLRFRR KRRHHKSPMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKDGISVKGANNSNTTNPPP APSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFYWIIYKIVRREDVHNQ

[0269]

[0270] (SEQ ID NO:45, SEQ ID NO:44에 의해 암호화됨).

[0271] 일부 실시태양에서, 키메라 LGIC 수용체는 인간 α7-nAChR M2-M3 링커(소문자)를 포함하는 인간 GlyRα1 이온 기공 도메인(밑줄 표시)에 융합된, GlyRα1 β1-2 루프 서열(소문자)을 포함하는 리간드 결합 도메인(볼드체) 및 인간 α7-nAChR 신호 펩타이드(이탤릭체)를 포함하는 CHRNA7/GLRA1 키메라이다:

(a) *MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQ***GEFQRKLYKELVKNYNPLERPVANDSQ PLTVYFSLSLLQIMDVDettmVLTTNIWLQMSWTDHYLQWNVSEYPGVKTVRFPDG QIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGHCQYLPPGIFKSSCYIDVRWFPFDVQ HCKLKFGSWSYGGWSLDLQMQEADISGYIPNGEWDLVGIPGKRSERFYECCKEPY PDVTFTVTMRRR**MGYYLIQMYIPSLLIVILSWISFWINMDAAPARVGLGITTVLTMTTQ SSGSeimpatsdsvpliaqAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVNFVSRQHKELLRFRRKRRHHKS PMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKDGISVKGANNSNTTNPPPAPSKSPEEMR KLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFYWIIYKIVRREDVHNQ

[0272]

[0273] (SEQ ID NO:47, SEQ ID NO:46에 의해 암호화됨).

[0274] 일부 실시태양에서, 키메라 LGIC 수용체는 인간 α7-nAChR M2-M3 링커(소문자)를 포함하는 인간 GlyRα1 이온

기공 도메인(밑줄 표시)에 융합된, GlyRα1 Cys-루프 서열(소문자)을 포함하는 리간드 결합 도메인(볼드체) 및 인간 α7-nAChR 신호 펩타이드(이탤릭체)를 포함하는 CHRNA7/GLRA1 키메라이다:

(a) *MRCSPGGVWLALAASLLHVSLQ***GEFQRKLYKELVKNYNPLERPVANDSQ PLTVYFSLSLLQIMDVDEKNQVLTTNIWLQMSWTDHYLQWNVSEYPGVKTVRFPD GQIWKPDILLYNSADERFDATFHTNVLVNSSGHCQYLPPGIFKSScpmdlknfpmdvqtc KLKFGSWSYGGWSLDLQMQEADISGYIPNGEWDLVGIPGKRSERFYECCKEPYPD VTFTVTMRRR**MGYYLIQMYIPSLLIVILSWISFWINMDAAPARVGLGITTVLTMTTQSS GSeimpatsdsvpliaqAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVNFVSRQHKELLRFRRKRRHHKSPM LNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKDGISVKGANNSNTTNPPPAPSKSPEEMRKL FIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFYWIIYKIVRREDVHNQ

[0275]

[0276] (SEQ ID NO:49, SEQ ID NO:48에 의해 암호화됨).

[0277] 일부 실시태양에서, 키메라 LGIC 수용체는 인간 GlyRα1 이온 기공 도메인(밑줄 표시)에 융합된 리간드 결합 도메인(볼드체) 및 인간 5HT3A 세로토닌 수용체 신호 펩타이드(이탤릭체)을 포함하는 HTR3A/GLRA1 키메라(R241 접합)이다:

(a) *MLLWVQQALLALLLPTLLAQGEA***RRSRNTTRPALLRLSDYLLTNYRKGV RPVRDWRKPTTVSIDVIVYAILNVDEKNQVLTTYIWYRQYWTDEFLQWNPEDFDNI TKLSIPTDSIWVPDILINEFVDVGKSPNIPYVYIRHQGEVQNYKPLQVVTACSLDIYN FPFDVQNCSLTFTSWLHTIQDINISLWRLPEKVKSDRSVFMNQGEWELLGVLPYFR EFSMESSNYYAEMKFYVVIRRR**MGYYLIQMYIPSLLIVILSWISFWINMDAAPARVGLG ITTVLTMTTQSSGSRASLPKVSYVKAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVNFVSRQHKELL RFRRKRRHHKSPMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKDGISVKGANNSNTTNP PPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFYWIIYKIVRREDVHNQ

[0278]

[0279] (SEQ ID NO:50).

[0280] 일부 실시태양에서, 키메라 LGIC 수용체는 인간 GlyRα1 이온 기공 도메인(밑줄 표시)에 융합된, 인간 5HT3A 세로토닌 수용체 신호 펩타이드(이탤릭체) 및 리간드 결합 도메인(볼드체)을 포함하는 HTR3A/GLRA1 키메라(V236 접합)이다:

(a) *MLLWVQQALLALLLPTLLAQGEA***RRSRNTTRPALLRLSDYLLTNYRKGV RPVRDWRKPTTVSIDVIVYAILNVDEKNQVLTTYIWYRQYWTDEFLQWNPEDFDNI TKLSIPTDSIWVPDILINEFVDVGKSPNIPYVYIRHQGEVQNYKPLQVVTACSLDIYN FPFDVQNCSLTFTSWLHTIQDINISLWRLPEKVKSDRSVFMNQGEWELLGVLPYFR EFSMESSNYYAEMKFYV**HLERQMGYYLIQMYIPSLLIVILSWISFWINMDAAPARVGLG ITTVLTMTTQSSGSRASLPKVSYVKAIDIWMAVCLLFVFSALLEYAAVNFVSRQHKELL RFRRKRRHHKSPMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGPACLQAKDGISVKGANNSNTTNP PPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIFNMFYWIIYKIVRREDVHNQ

[0281]

[0282] (SEQ ID NO:51).

[0283] 일부 실시태양에서, 키메라 LGIC 수용체는 인간 GlyRα1 이온 기공 도메인(밑줄 표시)에 융합된, 인간 GABA-A β3 신호 펩타이드(이탤릭체) 및 리간드 결합 도메인(볼드체)을 포함하는 GABRB3/GLRA1 키메라(Y245 접합)이다:

(a) *MWGLAGGRLFGIFSAPVLVAVVCCA***QSVNDPGNMSFVKETVDKLLKG**
YDIRLRPDFGGPPVCVGMNIDIASIDMVSEVNMDYTLTMYFQQYWRDKRLAYS
GIPLNLTLDNRVADQLWVPDTYFLNDKKSFVHGVTVKNRMIRLHPDGTVLYGL
RITTTAACMMDLRRYPLDEQNCTLEIESYGYTTDDIEFYWRGGDKAVTGVERIE
LPQFSIVEHRLVSRNVVFATGAYPRLSLSFRLKRNIGYMGYYLIQMYIPSLLIVILS
WISFWINMDAAPARVGLGITTVLTMTTQSSGSRASLPKVSYVKAIDIWMAVCLLFVF
SALLEYAAVNFVSRQHKELLRFRRKRRHHKSPMLNLFQEDEAGEGRFNFSAYGMGP
ACLQAKDGISVKGANNSNTTNPPPAPSKSPEEMRKLFIQRAKKIDKISRIGFPMAFLIF
NMFYWIIYKIVRREDVHNQ

[0284]

[0285] (SEQ ID NO:52).

[0286] ***C1. 아미노산 돌연변이***

[0287] 상기 논의한 바와 같이, 일부 양태에서, 주제 조작된 수용체는 돌연변이되지 않은 모 수용체 상에서의 효능에 비해 조작된 수용체 상의 리간드 효능을 변경시키는 적어도 하나의 아미노산 돌연변이를 포함한다. 바꿔 말하면, 하나 이상의 아미노산 돌연변이, 예를 들어, 기능 상실 돌연변이 또는 기능 획득 돌연변이는 돌연변이되지 않은 모 수용체의 효능에 비해 리간드에 대한 조작된 수용체의 효능을 이동시킨다. 일부 실시태양에서, 돌연변이는 아미노산 치환이다. 일부 실시태양에서, 하나 이상의 돌연변이는 조작된 수용체의 리간드 결합 도메인에 있다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체의 리간드 결합 도메인이 Cys-루프 수용체 단백질일 때와 같이, 하나 이상의 아미노산 돌연변이는 W77, Y94, R101, W108, Y115, T128, N129, V130, L131, Q139, L141, Y151, S170, W171, S172, S188, Y190, Y210, C212, C213 및 Y217로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 α7-nAChR(SEQ ID NO: 4)의 잔기에 대응하는 잔기에서의 치환이다. 일부 실시태양에서, 하나의 잔기는 치환된다. 일부 실시태양에서, 2, 3, 4 또는 5개 이상의 잔기가 치환되며, 예를 들어, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 잔기가 치환된다. 특정 실시태양에서, 잔기는 W77, R101, Y115, N129, L131, S170, S172 및 S188로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 α7-nAChR(SEQ ID NO: 4)의 잔기에 대응한다. 특정 실시태양에서, 하나 이상의 치환은 α7-nAChR 서열 내에 있다.

[0288] 일부 실시태양에서, 하나 이상의 치환은 아세틸콜린 및 비천연 리간드에 대한 조작된 수용체의 효능을, 예를 들어, 2배 이상, 3배 이상, 4배 이상, 5배 이상, 10배 이상, 20배 이상, 30배 이상, 50배 이상 또는 100배 감소시킨다. 특정 실시태양에서, 하나 이상의 치환은 α7-nAChR의 R101I, R101S, R101D, Y115L, Y115M, Y115D, Y115T, T128M, T128R, T128I, N129I, N129V, N129P, N129W, N129T, N129D, N129E, L131E, L131P, L131T, L131D, L131S, L141S, L141R, W171F, W171H, S172F, S172Y, S172R, S172D, C212A, C212L 또는 C213P에 대응하는 치환이다. 다른 예에서, 하나 이상의 치환은 조작된 수용체 상에서 선택적으로 아세틸콜린의 효능을 감소시킨다. 다시 말해서, 하나 이상의 치환은 아세틸콜린에 대한 조작된 수용체의 반응성을 감소시키는 한편, 비천연 리간드에 대한 효능을 본질적으로 유지하거나, 다르게는 비천연 리간드에 대한 조작된 수용체의 효능을 감소시키는 것보다 아세틸콜린에 대한 조작된 수용체의 효능을 2배 이상, 예를 들어, 3배, 4배, 5배 이상, 일부 예에서 10배, 20배, 50배 또는 100배 이상 감소시킨다. 일부 실시태양에서, 치환은 α7-nAChR의 L131E, L131S, L131T, L131D 또는 S172D에 상응한다. 또 다른 실시태양에서, 하나 이상의 치환은 조작된 수용체 상에서 선택적으로 비천연 리간드의 효능을 감소시킨다. 다시 말해서, 하나 이상의 치환은 비천연 리간드에 대한 조작된 수용체의 효능을 감소시키는 한편, 아세틸콜린에 대한 효능을 본질적으로 유지하거나 다르게는 아세틸콜린에 대한 조작된 수용체의 효능을 감소시키는 것보다 비천연 리간드에 대한 조작된 수용체의 효능을 2배 이상, 예를 들어, 3배, 5배 이상, 일부 예에서 10배, 20배 또는 50배 이상 감소시킨다. 일부 실시태양에서, 치환은 α7-nAChR의 W77M, Y115W, S172T 또는 S172C에 상응한다. 특정 실시태양에서, 하나 이상의 치환은 α7-nAChR 서열 내에 있다. 특정 실시태양에서, 비천연 리간드는 AZD-0328, TC6987, ABT-126 및 파시니클린/RG3487로부터 선택된다.

[0289] 다른 실시태양에서, 하나 이상의 치환은 아세틸콜린 및/또는 비천연 리간드에 대한 조작된 수용체의 효능을, 예를 들어, 2배 이상, 3배 이상, 4배 이상. 5배 이상, 10배 이상, 20배 이상, 30배 이상, 50배 이상, 또는 100배 증가시킨다. 일부 실시태양에서, 치환은 L131N, L141W, S170G, S170A, S170L, S170I, S170V, S170P, S170F, S170M, S170T, S170C, S172T, S172C, S188I, S188V, S188F, S188M, S188Q, S188T, S188P 또는 S188W에 상응한다. 일부 실시태양에서, 하나 이상의 치환은 아세틸콜린과 비천연 리간드 둘 다의 효능을 증가시킨다. 일부 실

시태양에서, 치환은 α7-nAChR의 L131N, S170G, S170A, S170L, S170I, S170V, S170P, S170F, S170M, S170T, S170C, S172T, S188I, S188V, S188F, S188M, S188Q 또는 S188T에 상응한다. 다른 예에서, 하나 이상의 치환은 조작된 수용체 상에서 선택적으로 아세틸콜린의 효능을 증가시킨다. 다시 말해서, 하나 이상의 치환은 비천연 리간드에 대한 조작된 수용체의 효능을 증가시키는 것보다 아세틸콜린에 대한 조작된 수용체의 반응성을 2배 이상, 예를 들어, 3배, 4배 또는 5배 이상, 일부 예에서 10배, 20배, 50배 또는 100배 증가시킨다. 일부 실시태양에서, 치환은 α7-nAChR의 L141W, S172T, S172C, S188P 또는 S188W에 상응한다. 특정 실시태양에서, 하나 이상의 치환은 α7-nAChR 서열 내에 있다. 특정 실시태양에서, 비천연 리간드는 AZD-0328, TC6987, ABT-126 및 파시니클린/RG3487로부터 선택된다. 또 다른 예에서, 하나 이상의 치환은 조작된 수용체 상에서 비천연 리간드의 효능을 선택적으로 증가시킨다. 다시 말해서, 하나 이상의 치환은 아세틸코린에 대한 조작된 수용체의 효능을 증가시키는 것보다 비천연 리간드에 대한 조작된 수용체의 효능을 2배 이상, 예를 들어, 3배, 5배 이상, 일부 예에서 10배, 20배 또는 50배 이상 증가시킨다.

[0290] 일부 실시태양에서, 주제 조작된 수용체에서 돌연변이된 아미노산 잔기는 야생형 a7 nAChR(SEQ ID NO: 4)의 R27, E41, Q79, Q139, L141, G175, Y210, P216, Y217 또는 D219에 대응하는 아미노산이 아니다. 일부 실시태양에서, 돌연변이는 아미노산 치환이다. 일부 실시태양에서, 주제 조작된 수용체에서 돌연변이된 아미노산 잔기는 야생형 a7 nAChR(SEQ ID NO:4)의 R27, E41, Q79, Q139, L141, G175, Y210, P216, Y217, 또는 D219에 상응하는 아미노산이다. 일부 실시태양에서, 치환은 야생형 α7 nAChR에서 W77F, W77Y, W77M, Q79A, Q79Q, Q79S, Q79G, Y115F, L131A, L131G, L131M, L131N, L131Q, L131V, L131F, Q139G, Q139L, G175K, G175A, G175F, G175H, G175M, G175R, G175S, G175V, Y210F, P216I, Y217F 또는 D219A에 상응하는 치환이 아니다. 일부 실시태양에서, 치환은 야생형 α7 nAChR에서 W77F, W77Y, W77M, Q79A, Q79Q, Q79S, Q79G, Y115F, L131A, L131G, L131M, L131N, L131Q, L131V, L131F, Q139G, Q139L, G175K, G175A, G175F, G175H, G175M, G175R, G175S, G175V, Y210F, P216I, Y217F, 또는 D219A에 상응하는 치환이다. 일부 실시태양에서, 이런 치환이 조작된 수용체 내에 존재한다면, 본 명세서에 기술된 아미노산 돌연변이 중 하나 이상과 조합하여 존재한다.

[0291] 일부 실시태양에서, α7-nAChR(SEQ ID NO: 4)의 잔기 Y94, Y115, Y151 및 Y190은 천연 리간드 아세틸콜린의 결합을 매개한다. 일부 실시태양에서, 이들 잔기에서 돌연변이는 아세틸콜린의 결합을 감소시킬 수 있으며 따라서 기능 상실 돌연변이로 생각될 수 있다. 일부 실시태양에서, α7-nAChR의 잔기 W77, Y115, N129, V130, L131, Q139, L141, S170, Y210, C212, C213 및 Y217은 이 수용체에 대한 비천연 리간드 AZD0328의 결합을 매개할 수 있고 이들 잔기의 돌연변이는 수용체에 대한 AZD0328 및/또는 다른 리간드의 친화도를 증가시킬 수 있으며, 따라서 기능 획득 돌연변이로 생각될 수 있다. 일부 실시태양에서, 주제 조작된 수용체는 α7-nAChR(SEQ ID NO: 4)의 리간드 결합 도메인 영역 또는 α7-nAChR의 리간드 결합 도메인 영역을 포함하는 키메라 수용체의 리간드 결합 도메인 중 하나 이상의 아미노산 잔기에서 돌연변이를 포함하며, 여기서 하나 이상의 아미노산 잔기는 W77, Y94, Y115, N129, V130, L131, Q139, L141, Y151, S170, Y190, Y210, C212, C213 및 Y217로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 실시태양에서, 돌연변이는 아미노산 치환이다. 특정 실시태양에서, α7-nAChR(SEQ ID NO: 4)의 리간드 결합 도메인 영역 또는 α7-nAChR의 리간드 결합 도메인 영역을 포함하는 키메라 수용체의 리간드 결합 도메인 중 하나 이상의 아미노산 잔기에서 돌연변이는 W77, Y94, Y115, N129, V130, L131, Q139, L141, Y151, S170, Y190, Y210, C212, C213 및 Y217로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 잔기에서의 치환이다.

[0292] 일부 실시태양에서, α7-nAChR(SEQ ID NO: 4)의 잔기 Y115, L131, L141, S170, W171, S172, C212 및 Y217은 아세틸콜린 및/또는 니코틴의 결합을 매개할 수 있고 이들 잔기 중 하나 이상에서 돌연변이는 아세틸콜린 및/또는 니코틴의 결합을 감소시킬 수 있다. 일부 실시태양에서, α7-nAChR의 R101, Y115, L131, L141, W171, S172, S188, Y210 및 Y217은 비천연 리간드 ABT126의 결합을 매개할 수 있고 이들 잔기 중 하나 이상의 돌연변이는 α7-nAChR에 대한 ABT126 및/또는 다른 리간드의 친화도를 증가시킬 수 있다. 일부 실시태양에서, α7-nAChR의 R101, Y115, T128, N129, L131, L141, W171, S172, Y210, C212, C213 및 Y217은 비천연 리간드 TC6987의 결합을 매개할 수 있고 이들 잔기 중 하나 이상의 돌연변이는 α7-nAChR에 대한 TC6987 및/또는 다른 리간드의 친화도를 증가시킬 수 있다. α7-nAChR의 R101, N120, L131, L141, S170, W171, S172, Y210 및 Y217은 비천연 리간드 파시니클린/RG3487의 결합을 매개하고, 이들 잔기 중 하나 이상의 돌연변이는 α7-nAChR에 대한 파시니클린/RG3487 및/또는 다른 리간드의 친화도를 증가시키는 것으로 예상된다. 일부 실시태양에서, 주제 조작된 수용체는 α7-nAChR의 리간드 결합 도메인 영역 또는 α7-nAChR의 리간드 결합 도메인 영역을 포함하는 키메라 수용체의 리간드 결합 도메인 중 하나 이상의 아미노산 잔기에서 돌연변이를 포함하며, 여기서, 하나 이상의 아미노산 잔기는 R101, Y115, T128, N120, N129, L131, L141, S170, W171, S172, S188, Y210, C212, C213 및 Y217로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 실시태양에서, 하나 이상의 아미노산 잔기는 α7-nAChR에 대한 아세틸콜린

및/또는 니코틴의 결합을 변경시키며, 아미노산은 α7-nAChR의 Y115, L131, L141, S170, W171, S172, C212 및 Y217로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 특정의 이러한 실시태양에서, 아미노산은 C212 및 S170으로부터 선택된다. 일부 실시태양에서, 하나 이상의 아미노산 잔기에서 돌연변이는 α7-nAChR에 대한 ABT126의 결합을 변경시키며 하나 이상의 아미노산 잔기는 α7-nAChR의 R101, Y115, L131, L141, W171, S172, S188, Y210 및 Y217로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 특정의 이러한 실시태양에서, 아미노산은 R101, S188 및 Y210으로부터 선택된다. 일부 실시태양에서, 하나 이상의 아미노산 잔기에서 돌연변이는 α7-nAChR에 대한 TC6987의 결합을 변경시키며 하나 이상의 아미노산 잔기는 α7-nAChR의 R101, Y115, T128, N129, L131, L141, W171, S172, Y210, C212, C213 및 Y217로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 특정의 이러한 실시태양에서, 아미노산은 R101, T128, N129, Y210 및 C213으로부터 선택된다. 일부 실시태양에서, 하나 이상의 아미노산 잔기에서 돌연변이는 α7-nAChR에 대한 파시니클린/RG3487의 결합을 변경시키며 하나 이상의 아미노산 잔기는 α7-nAChR의 R101, N120, L131, L141, S170, W171, S172, Y210 및 Y217로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 특정의 이러한 실시태양에서, 아미노산은 Y210, R101 및 N129로부터 선택된다.

[0293] 일부 실시태양에서, 5HT3(SEQ ID NO: 6)의 잔기 W85, R87, Y136, Y138, G146, N147, Y148, K149, S177, S178, L179, Y228 및 Y229가 세로토닌의 결합을 매개할 수 있고 이들 잔기 중 하나 이상에서 돌연변이가 5HT3에 대한 세로토닌의 결합을 감소시킬 수 있다. 5HT3의 D64, I66, W85, R87, Y89, N123, G146, Y148, T176, S177, S178, W190, R191, F221, E224, Y228, Y229 및 E231은 비천연 리간드 실란세트론의 결합을 매개하고, 이들 잔기 중 하나 이상의 돌연변이는 5HT3에 대한 실란세트론 및/또는 다른 리간드의 친화도를 증가시킬 수 있다. 일부 실시태양에서, 돌연변이는 아미노산 치환이다. 일부 실시태양에서, 주제 조작된 수용체는 리간드 결합 도메인 영역 5HT3A 또는 5HT3의 리간드 결합 도메인 영역을 포함하는 키메라 수용체의 리간드 결합 도메인 중 하나 이상의 아미노산 잔기에서 돌연변이를 포함하되, 여기서 하나 이상의 아미노산 잔기는 D64, I66, W85, R87, Y89, N123, Y136, Y138, G146, N147, Y148, K149, T176, S177, S178, L179, W190, R191, F221, E224, Y228, Y229 및 E231로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 실시태양에서, 하나 이상의 아미노산 잔기에서 돌연변이는 5HT3에 대한 세로토닌의 결합을 변경시키며 아미노산은 5HT3A의 W85, R87, Y136, Y138, G146, N147, Y148, K149, S177, S178, L179, Y228 및 Y229로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 특정의 이러한 실시태양에서, 아미노산은 Y136, Y138, N147, K149 및 L179로부터 선택된다. 일부 실시태양에서, 하나 이상의 아미노산 잔기에서 돌연변이는 5HT3에 대한 실란세트론의 결합을 변경시키며 하나 이상의 아미노산 잔기는 5HT3A의 D64, I66, W85, R87, Y89, N123, G146, Y148, T176, S177, S178, W190, R191, F221, E224, Y228, Y229 및 E231로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 특정의 이러한 실시태양에서, 아미노산은 D64, I66, Y89, N123, T176, W190, R191, F221, E224 및 E231로부터 선택된다.

[0294] 일부 실시태양에서, LGIC의 활성을 조절하는 리간드의 능력에 영향을 미치는 하나 이상의 돌연변이는 LGIC의 이온 기공 도메인에 위치된다. 일부 실시태양에서, 돌연변이는 아미노산 치환이다. 예를 들어, 세로토닌 수용체 5HT3A의 잔기 T279는, 이 잔기의, 예를 들어, 세린으로의 돌연변이(T279S)가 효과를 길항적(즉, LGIC 활성을 감소시킴)으로부터 작용적으로(즉, 통로 활성을 촉진) 전환시키도록, 리간드가 통로 활성을 조절하는 방법을 매개한다. 일부 실시태양에서, 대상은 리간드-개폐 이온 통로는 인간 5HT3A(SEQ ID NO: 6)의 이온 기공 도메인 또는 5HT3A의 이온 기공 도메인을 포함하는 키메라 LGIC 수용체의 이온 기공 도메인 중 하나 이상의 아미노산 잔기에서 돌연변이를 포함하며, 치환은 SEQ ID NO: 6의 279에 대응하는아미노산에 있다. 특정 실시태양에서, 치환은 SEQ ID NO: 6에 대한 T279S 치환이다.

[0295] 본 발명은 모 수용체와 비교하여 아미노산 치환과 같은 2개 이상의 돌연변이를 갖는 조작된 수용체를 제공한다. 일부 실시태양에서, 모 수용체는 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR)로부터 유래된 리간드 결합 도메인을 포함한다. 일부 실시태양에서, 모 수용체는 키메라 수용체이다. 일부 실시태양에서, 모 수용체는 인간 글리신 수용체로부터 유래된 이온 기공 도메인을 포함한다. 일부 실시태양에서, 인간 글리신 수용체는 인간 글리신 수용체 α1, 인간 글리신 수용체 α2, 또는 인간 글리신 수용체 α3이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체의 리간드 결합 도메인은 인간 글리신 수용체로부터 유래된 Cys-루프 도메인을 포함한다. 일부 실시태양에서, 모 수용체는 SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 포함하는 모 수용체와 비교하여 2개의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체의 리간드 결합 도메인은 인간 글리신 수용체 α1 서브유닛으로부터의 β1-2 루프 도메인을 포함한다.

[0296] 일부 실시태양에서, 조작된 수용체의 리간드 결합 도메인은 인간 α7-nAChR(SEQ ID NO: 4)의 W77, R101, Y115, L131, Q139, Y140, S170, S172 및 Y210에 상응하는 것으로부터 선택된 2개 이상의 아미노산 잔기에서 아미노산 치환을 포함한다.

[0297] 일부 실시태양에서, 2개의 아미노산 치환은 L131 및 S172, Y115 및 S170, 및 Y115 및 L131로 이루어진 그룹으로부터 선택된 한 쌍의 아미노산 잔기에 있다. 일부 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 L131 및 S172, Y115 및 S170, 및 Y115 및 L131로 이루어진 그룹으로부터 선택된 한 쌍의 아미노산 잔기에서 2개의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 잔기 L131에서 아미노산 치환 및 S172D의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 잔기 L131에서 아미노산 치환 및 Y115D의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 L131S 및 S172D, L131T 및 S172D, L131D 및 S172D, Y115D 및 S170T, Y115D 및 L131Q, 및 Y115D 및 L131E로 이루어진 그룹으로부터 선택된 한 쌍의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 L131E의 아미노산 치환을 포함한다.

[0298] 일부 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 Y140, R101, L131, Y115 및 Y210으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기에서 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하며, 여기서 아미노산 잔기는 α7-nAChR의 아미노산 잔기에 상응한다. 일부 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 R101W 및/또는 Y210V의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 R101, L131, Y115, Y210 및 Y140으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기에서 2개 이상의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 R101, L131, Y115, Y210 및 Y140으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 잔기에서 2개의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 R101 및 L131, Y115 및 Y210, R101 및 Y210으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 한 쌍의 아미노산 잔기에서 2개의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 R101F 및 L131G, R101F 및 L131D, Y115E 및 Y210W, R101W 및 Y210V, R101F 및 Y210V, R101F 및 Y210F, R101M 및 L131A, 및 R101M 및 L131F로 이루어진 그룹으로부터 선택된 한 쌍의 아미노산을 포함한다. 일부 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 아미노산 잔기 R101, Y115 및 Y210에서 3개의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 아미노산 치환 R101W, Y115E 및 Y210W, 또는 아미노산 치환 R101F, Y115E 및 Y210W를 포함한다.

[0299] 일부 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 잔기 L131에서 아미노산 치환 및 R101F 또는 R101M의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 잔기 L131에서 아미노산 치환은 L131G, L131D, L131A, L131F 또는 L131N이다.

[0300] 일부 실시태양에서, 리간드 결합 도메인은 잔기 Y210에서의 소수성 아미노산 치환 및 R101W 또는 R101F의 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 잔기 Y210에서 아미노산 치환은 Y210V, Y210F 또는 Y210W이다.

[0301] 당업자는 본 발명의 조작된 수용체와 비교하기 위해 적절한 대조군 수용체를 쉽게 인식할 것이다. 일부 실시태양에서, 대조군 수용체는 하나 이상의 구별되는 아미노산 돌연변이(예를 들어, 치환)를 제외하고 조작된 수용체와 서열이 동일하다. 모든 경우에, 대조군 수용체에 대한 언급은 인용된 특성의 변화(예를 들어, 리간드에 대한 효능)가 발명의 조작된 수용체의 아미노산 돌연변이(들)의 결과임을 나타내는 것을 의미한다.

[0302] 본 발명은 조작된 수용체를 제공하며, 여기서 조작된 수용체는 키메라 리간드-개폐 이온 채널(LGIC) 수용체이고 다음을 포함한다: (a) 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR)로부터 유도되고 인간 글리신 수용체 α1 서브유닛의 Cys-루프 도메인을 포함하는 리간드 결합 도메인; 및 (b) 인간 글리신 수용체 α1 서브유닛으로부터 유도된 이온 기공 도메인. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진 모 조작된 수용체로부터 유도되고, 모 조작된 수용체에 기초한 하나 이상의 아미노산 치환을 추가로 포함한다.

[0303] 일부 실시태양에서, 아세틸콜린에 대한 조작된 수용체의 효능은 아세틸콜린에 대한 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR)의 효능보다 낮다. 일부 실시태양에서, 아세틸콜린에 대한 조작된 수용체의 효능은 아세틸콜린에 대한 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR)의 효능보다 적어도 약 1.5배(예를 들어, 그 사이에 있는 모든 하위 범위와 값을 포함하는 약 2배 낮음, 약 3배, 약 4배, 약 5배, 약 6배, 약 7배, 약 8배, 약 9배, 약 10배, 약 12배, 약 15배, 약 20배, 약 30배, 약 40배, 약 50배, 약 60배, 약 70배, 약 80배, 약 90배 또는 약 100배)이다. 일부 실시태양에서, 아세틸콜린에 대한 조작된 수용체의 효능은 발명의 실시예 2에 기술된 바와 같이 YFP 형광 소광을 사용하는 세포 리포터 분석에 기초한 아세틸콜린에 대한 EC50에 의해 평가된다. 일부 실시태양에서, 아세틸콜린에 대한 조작된 수용체의 EC50은 적어도 100uM, 적어도 200uM, 적어도 300uM, 적어도 500uM, 적어도 700uM, 적어도 1mM, 적어도 2mM, 적어도 3mM, 적어도 4mM, 적어도 5mM, 적어도 6mM, 적어도 7mM, 적어도 8mM, 적어도 9mM 또는 적어도 10mM이다. 일부 실시태양에서, 아세틸콜린에 대한 조작된 수용체의 EC50은 적어도 1mM이다. 일부 실시태양에서, 아세틸콜린에 대한 조작된 수용체의 EC50은 적어도 3mM이다. 일부 실시태양에서, 아세틸콜린에 대한 더 높은 EC50을 갖는 것은 아세틸콜린의 생리학적 농도의 존재에서 상당한 양

의 전류를 세포로 통과시키지 않고 세포에서 또는 세포 표면에서 조작된 수용체의 더 높은 발현 수준을 허용한다.

[0304] 일부 실시태양에서, 비천연 리간드에 대한 조작된 수용체의 효능은 비천연 리간드에 대한 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR)의 효능과 거의 동일하다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드에 대한 조작된 수용체의 효능은 비천연 리간드에 대한 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR)의 효능보다 더 높다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드에 대한 조작된 수용체의 효능은 비천연 리간드에 대해 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR)의 효능보다 적어도 약 1.5배이다. 일부 실시태양에서, 효능을 결정하는 것은 본 발명의 실시예 2에 기술된 바와 같이 YFP 형광 소광을 사용하는 세포 리포터 검정에 기초하여 EC50을 결정하는 것을 포함한다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드에 대한 조작된 수용체의 EC50은 1nM 미만, 2nM 미만, 3nM 미만, 4nM 미만, 5nM 미만, 6nM 미만, 7nM 미만, 8nM 미만, 9nM 미만, 10nM 미만, 15nM 미만, 20nM 미만, 30nM 미만, 40nM 미만, 50nM 미만, 60nM 미만, 70nM 미만 nM, 80nM 미만, 90nM 미만, 100nM 미만, 150nM 미만, 200nM 미만, 300nM 미만, 400nM 미만, 500nM 미만, 600nM 미만, 700nM 미만, 800nM 미만, 900nM 미만, 1uM 미만, 2uM 미만, 3uM 미만, 4uM 미만, 5uM 미만, 6uM 미만, 7uM 미만, 8uM 미만, 9uM 미만 또는 10uM 미만이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드에 대한 조작된 수용체의 EC50은 10nM 미만이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드에 대한 조작된 수용체의 EC50은 100nM 미만이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드에 대한 조작된 수용체의 EC50은 1uM 미만이다.

[0305] 일부 실시태양에서, 비천연 리간드의 존재하에서 조작된 수용체의 효능은 비천연 리간드의 존재하에서 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR)의 효능보다 더 높다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드의 존재하에서 조작된 수용체의 효능은 비천연 리간드의 존재하에서 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR)의 효능보다 적어도 약 1.5배(예를 들어, 그 사이에 있는 모든 하위 범위와 값을 포함하는 약 2배 낮음, 약 3배, 약 4배, 약 5배, 약 6배, 약 7배, 약 8배, 약 9배, 약 10배, 약 12배, 약 15배, 약 20배, 약 30배, 약 40배, 약 50배, 약 60배, 약 70배, 약 80배, 약 90배 또는 약 100배)이다. 일부 실시태양에서, 효능을 결정하는 것은 비천연 리간드의 존재하에서 시험관 내에서 조작된 수용체를 통과하는 전류의 양을 결정하는 것을 포함한다.

[0306] 일부 양태에서, 대상 리간드-개폐 이온 통로는 하나 이상의 비-탈감작성 돌연변이를 포함한다. 일부 실시태양에서, 돌연변이는 아미노산 치환이다. 리간드-개폐 이온 통로와 관련하여 사용될 때, "탈감작화"는 효현제의 장기적 존재하에서 이온 흐름의 진행성 감소를 지칭한다. 이는 리간드에 대한 뉴런 효능의 진행성 상실을 초래한다. 비-탈감작성 돌연변이는 LGIC가 리간드에 대해 탈감작화되는 것을 방지함으로써, 뉴런이 리간드에 대해 덜 반응성 또는 비반응성이 되는 것을 방지하는 아미노산 돌연변이를 의미한다. 비-탈감작성 돌연변이는 돌연변이를 운반하는 LGIC를 뉴런 내로 도입함으로써 그리고 리간드에 대한 장기간의 노출 동안 시간에 따른 전류 흐름을 분석함으로써 용이하게 확인될 수 있다. LGIC가 비-탈감작성 돌연변이를 포함하지 않는다면, 전류는 연장기간의 노출 동안 피크로부터 정적 상태로 회복되는 반면, LGIC가 비-탈감작성 돌연변이를 포함한다면, 전류는 리간드에 대한 노출의 지속기간 동안 피크 흐름에 남아있을 것이다. 탈감작을 초래하는 예시적인 아미노산 돌연변이는 인간 GlyRα1에서의 V322L 돌연변이(신호 펩타이드를 제거하기 위해 전-단백질의 가공 후 V294L) 및 인간 GABA-A 수용체 GABRB3에서의 L321V 돌연변이(신호 펩타이드를 제거하기 위해 전-단백질의 가공 후 L296V)를 포함한다. 일부 실시태양에서, 탈감작성 돌연변이는 LGIC의 C-말단에서 또는 근처에서 아미노산 잔기의 탈감작성 서열, 예를 들어, GABAR1에 의해 암호화된 단백질의 C 말단으로부터 유래된 IDRLSRIAFPLLFGIFNLVYWATYLNREPQL (SEQ ID NO: 53)에 대해 90% 이상의 동일성을 갖는 서열로의 대체, 예를 들어, GABRR1에서의 잔기 455-479의 IDRLSRIAFPLLFGIFNLVYWATYLNREPQL(SEQ ID NO: 53)로의 대체이다. LGIC 탈감작화, LGIC의 탈감작화를 측정하는 방법, 및 비-탈감작성인 돌연변이는 당업계에 잘 공지되어 있다; 예를 들어, Gielen et al. Nat Commun 2015 Apr 20, 6:6829, 및 Keramidas et al. Cell Mol Life Sci. 2013 Apr;70(7):1241-53을 참조하고, 이의 전체 내용은 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0307] 일부 양태에서, 대상 리간드-개폐 이온 통로는 하나 이상의 전환 돌연변이를 포함한다. 일부 실시태양에서, 돌연변이는 아미노산 치환이다. 전환 돌연변이는 비천연 이온, 즉, 통과하는 것이 자연적으로 가능하게 되지 않는 이온의 전도도에 허용적이 되도록, LGIC의 이온 기공 도메인의 투과성을 변화시키는 돌연변이를 의미한다. 일부 경우에, 돌연변이는 양이온으로부터 음이온으로 투과성을 전환시키며, 예를 들어, 인간 α7-nAChR에서 아미노산 잔기 260 내지 281(CHRNA7)(EKISLGITVLLSLTVFMLLVAE, SEQ ID NO: 54) 또는 다른 양이온-허용적 LGIC에서 대응하는 아미노산의 펩타이드 서열 PAKIGLGITVLLSLTTFMSGVAN(SEQ ID NO: 55)로의 대체이다. 일부 경우에, 돌연변이는 양이온으로부터 음이온으로 투과성을 전환시키며, 예를 들어, GLRA1의 아미노산 잔기 279 또는 다른 음이온-허용적 LGIC에서 대응하는 아미노산의 글루탐산(E)으로의 치환, (GLRA1에서 A293E 치환은 LGIC를 음이온-허

용적으로부터 칼슘-투과성으로 전환시킴), 또는 GLRA1의 아미노산 잔기 278 또는 다른 양이온-허용적 LGIC에서 대응하는 아미노산의 결실, GLRA1의 아미노산 잔기 279 또는 다른 음이온-허용적 LGIC에서 대응하는 아미노산의 글루탐산(E)으로의 치환, 및 GLRA1의 아미노산 잔기 293 또는 다른 음이온-허용적 LGIC에서 대응하는 아미노산의 발린(V)으로의 치환(GLRA1에서 P278, A279E, T293V는 LGIC를 음이온-허용적으로부터 양이온-허용적으로 전환시킴)이다.

[0308] 본 명세서에 기술된 것 이상의 추가적인 조작된 수용체는 시험관내 선별 및 검증 방법에 의해 용이하게 확인될 수 있다. 일부 실시태양에서, 모 수용체 돌연변이체의 라이브러리는 제한된 수의 모 수용체로부터 생성된다. 모 수용체는 오류 유발 PCR을 포함하는 당업계에 공지된 방법을 이용하여 돌연변이될 수 있다. 일부 실시태양에서, 이어서, 모 수용체 돌연변이체의 라이브러리는 효모 또는 포유류 세포에 형질감염되고 기능성 수용체를 확인하기 위해(예를 들어, 리간드에 반응하여 신호전달할 수 있는 모 수용체를 확인하기 위해) 고속대량(high throughput)으로 선별된다. 일부 실시태양에서, 이어서, 이런 1차 선별에서 확인된 기능성 모 수용체 돌연변이체는 포유류 세포에서 발현되고, 예를 들어, 플레이트 판독기 및/또는 본 명세서에 기재된 전기생리학 분석에 의해 리간드에 대한 효능에 대해 선별된다. 이어서, 효현제 리간드에 대해 증가된 결합 친화도를 입증하거나, 제 2 선별에서 효현제로서 길항제 또는 조절제 리간드의 사용을 가능하게 하는 모 수용체 돌연변이체는 선별되고 추가적인 시험관내 및/또는 생체내 검증 및 특성규명 분석을 통해 선택되고 운반될 수 있다. 이러한 선별 분석은 당업계에, 예를 들어 Armbruster, B.N. *et al*. (2007) PNAS, 104, 5163 내지 5168; Nichols, C.D. and Roth, B.L. (2009) Front. Mol. Neurosci. 2, 16; Dong, S. *et al*. (2010) Nat. Protoc. 5, 561-573; Alexander, G.M. *et al*. (2009) Neuron 63, 27-39; Guettier, J.M. *et al*. (2009) PNAS 106, 19197-19202; Ellefson J.W. *et al*. (2014) Nat Biotechnol. 32(1):97-101; Maranhao AC and Ellington AD. (2017) ACS Synth Biol. 20;6(1):108-119; Talwar S *et al*. (2013) PLoS One;8(3):e58479; Gilbert D.F. *et al*. (2009) Front Mol Neurosci. 30;2:17; Lynagh and Lynch, (2010), Biol Chem. 14:285(20), 14890-14897; Islam R. *et al*. (2016) ACS Chem Neurosci. 21;7(12):1647-1657; 및 Myers *et al*. (2008) Neuron. 8:58(3): 362-373에 공지되어 있다.

[0309] ***C2. 예시적인 키메라 LGIC***

[0310] 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 α7-nAChR의 LBD에서 L131S 및 S172D에 상응하는 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 치환이 없거나 이러한 치환 중 하나만을 갖는 대조군 수용체와 비교할 때 아세틸콜린에 대해 더 낮은 효능(예를 들어, 더 높은 EC50에 의해 결정됨)을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 하나만을 갖는 대조군 수용체와 비교할 때 비천연 리간드에 대한 효능을 실질적으로 유지한다(또는 더 높은 효능을 갖는다). 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 CNL001이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 GlyRα1로부터 유래된 이온 기공 도메인을 포함하는 키메라 LGIC이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 CODA534(SEQ ID NO: 59)이고, 대조군 수용체는 CODA71, CODA333 또는 CODA377이다.

[0311] 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 α7-nAChR의 LBD에서 L131T 및 S172D에 상응하는 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 치환이 없거나 이러한 치환 중 하나만을 갖는 대조군 수용체와 비교할 때 아세틸콜린에 대해 더 낮은 효능(예를 들어, 더 높은 EC50에 의해 결정됨)을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 >3mM의 아세틸콜린에 대한 EC50을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 하나만을 갖는 대조군 수용체와 비교할 때 비천연 리간드에 대한 효능을 실질적으로 유지한다(또는 더 높은 효능을 갖는다). 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 CNL001이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 GlyRα1로부터 유래된 이온 기공 도메인을 포함하는 키메라 LGIC이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 CODA535(SEQ ID NO: 60)이고, 대조군 수용체는 CODA71, CODA335 또는 CODA377이다.

[0312] 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 α7-nAChR의 LBD에서 L131D 및 S172D에 상응하는 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 하나만을 갖는 대조군 수용체와 비교할 때 아세틸콜린에 대해 더 낮은 효능(예를 들어, 더 높은 EC50에 의해 결정됨)을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 하나만을 갖는 대조군 수용체와 비교할 때 비천연 리간드에 대한 효능을 실질적으로 유지한다(또는 더 높은 효능을 갖는다). 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 및/

또는 이러한 치환 중 하나만 있는 대조군 수용체와 비교하여 CNL002에 대해 더 높은 효능(더 낮은 EC50)을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체에 대한 비천연 리간드는 CNL002, AZD-0328 또는 파시니클린이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 파시니클린이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 AZD-0328이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 CNL002이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 GlyRα1로부터 유래된 이온 기공 도메인을 포함하는 키메라 LGIC이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 CODA536(SEQ ID NO: 58)이고, 대조군 수용체는 CODA71, CODA339 또는 CODA377이다.

[0313] 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유도된 리간드 결합 도메인 및 인간 α7-nAChR의 LBD에서 Y115D 및 S170T에 상응하는 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 및/또는 이러한 치환 중 하나만 있는(예를 들어, S170T만) 대조군 수용체와 비교할 때 아세틸콜린에 대해 더 낮은 효능(예를 들어, 더 높은 EC50에 의해 결정됨)을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 >3mM의 아세틸콜린에 대한 EC50을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 하나만 있는(예를 들어, S170T만) 대조군 수용체와 비교할 때 비천연 리간드에 대한 효능을 실질적으로 유지한다(또는 더 높은 효능을 갖는다). 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체에 대한 비천연 리간드는 파시니클린 또는 TC-6987이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 파시니클린이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 TC-6987이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 GlyRα1로부터 유래된 이온 기공 도메인을 포함하는 키메라 LGIC이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 CODA805(SEQ ID NO: 63)이고, 대조군 수용체는 CODA71, CODA282 또는 CODA109이다.

[0314] 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 α7-nAChR의 LBD에서 Y115D 및 L131Q에 상응하는 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 하나만 있는(예를 들어, L131Q만) 대조군 수용체와 비교할 때 아세틸콜린에 대해 더 낮은 효능(예를 들어, 더 높은 EC50에 의해 결정됨)을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 >3mM의 아세틸콜린에 대한 EC50을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 하나만을 갖는 대조군 수용체와 비교할 때 비천연 리간드에 대한 효능을 실질적으로 유지한다(또는 더 높은 효능을 갖는다). 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체에 대한 비천연 리간드는 AZD-0328, 파시니클린 또는 TC-6987이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 파시니클린이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 AZD-0328이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 TC-6987이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 GlyRα1로부터 유래된 이온 기공 도메인을 포함하는 키메라 LGIC이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 CODA806(SEQ ID NO: 62)이고, 대조군 수용체는 CODA71, CODA282 또는 CODA334이다.

[0315] 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 α7-nAChR의 LBD에서 Y115D 및 L131E에 상응하는 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 하나만을 갖는 대조군 수용체와 비교할 때 아세틸콜린에 대해 더 낮은 효능(예를 들어, 더 높은 EC50에 의해 결정됨)을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 하나만을 갖는 대조군 수용체와 비교할 때 비천연 리간드에 대한 효능을 실질적으로 유지한다(또는 더 높은 효능을 갖는다). 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체에 대한 비천연 리간드 리간드는 TC-5619, AZD-0328, 파시니클린 또는 TC-6987이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 TC-5619이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 파시니클린이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 AZD-0328이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 TC-6987이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 GlyRα1로부터 유래된 이온 기공 도메인을 포함하는 키메라 LGIC이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 CODA807(SEQ ID NO: 61)이고, 대조군 수용체는 CODA71, CODA282 또는 CODA340이다.

[0316] 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 α7-nAChR의 LBD에서 R101F 및 L131G에 상응하는 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 하나만을 갖는 대조군 수용체와 비교할 때 아세틸콜린에 대해 더 낮은 효능(예를 들어, 더 높은 EC50에 의해 결정됨)을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 하나만을 갖는 대조군 수용체와 비교할 때 비천연 리간드에 대한 효능을 실질적으로 유지한다(또는 더 높은 효능을 갖는다). 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체에 대한 비천연 리간드는 CNL001, TC-5619, CNL002, AZD-0328, TC-6987 또는 바레니클린이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는

CNL001이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 TC-5619이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 CNL002이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 AZD-0328이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 TC-6987이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 바레니클린이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 GlyRα1로부터 유래된 이온 기공 도메인을 포함하는 키메라 LGIC이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 CODA1025(SEQ ID NO: 65)이고, 대조군 수용체는 CODA71, CODA236 또는 CODA325이다.

[0317] 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 α7-nAChR의 LBD에서 R101F 및 L131D에 상응하는 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 하나만을 갖는 대조군 수용체와 비교할 때 아세틸콜린에 대해 더 낮은 효능(예를 들어, 더 높은 EC50에 의해 결정됨)을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 하나만을 갖는 대조군 수용체와 비교할 때 비천연 리간드에 대한 효능을 실질적으로 유지한다(또는 더 높은 효능을 갖는다). 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체에 대한 비천연 리간드는 CNL001, TC-5619, CNL002 또는 TC-6987이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 CNL001이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 TC-5619이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 CNL002이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 TC-6987이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 GlyRα1로부터 유래된 이온 기공 도메인을 포함하는 키메라 LGIC이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 CODA1027(SEQ ID NO: 66)이고, 대조군 수용체는 CODA71, CODA236 또는 CODA339이다.

[0318] 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 α7-nAChR의 LBD에서 Y115E 및 Y210W에 상응하는 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 하나만을 갖는 대조군 수용체와 비교할 때 아세틸콜린에 대해 더 낮은 효능(예를 들어, 더 높은 EC50에 의해 결정됨)을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 하나만을 갖는 대조군 수용체와 비교할 때 비천연 리간드에 대한 효능을 실질적으로 유지한다(또는 더 높은 효능을 갖는다). 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체에 대한 비천연 리간드는 TC-5619, ABT-0126 또는 CNL002이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 TC5619/브라다니클린이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 ABT-0126이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 CNL002이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 GlyRα1로부터 유래된 이온 기공 도메인을 포함하는 키메라 LGIC이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 CODA1039(SEQ ID NO: 67)이고, 대조군 수용체는 CODA71, CODA283 또는 CODA409이다.

[0319] 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 α7-nAChR의 LBD에서 R101W 및 Y210V에 상응하는 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 하나만을 갖는 대조군 수용체와 비교할 때 아세틸콜린에 대해 더 낮은 효능(예를 들어, 더 높은 EC50에 의해 결정됨)을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 >3mM의 아세틸콜린에 대한 EC50을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 하나만을 갖는 대조군 수용체와 비교할 때 비천연 리간드에 대한 효능을 실질적으로 유지한다(또는 더 높은 효능을 갖는다). 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 TC-5619/브라다니클린이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 GlyRα1로부터 유래된 이온 기공 도메인을 포함하는 키메라 LGIC이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 CODA1045(SEQ ID NO: 68)이고, 대조군 수용체는 CODA71, CODA238 또는 CODA405이다.

[0320] 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 α7-nAChR의 LBD에서 R101F 및 Y210V에 상응하는 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 하나만 있는 대조군 수용체(예를 들어, R101F)와 비교할 때 아세틸콜린에 대해 더 낮은 효능(예를 들어, 더 높은 EC50에 의해 결정됨)을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 >3mM의 아세틸콜린에 대한 EC50을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 하나만 있는 대조군 수용체(예를 들어, Y210V)와 비교할 때 비천연 리간드에 대한 효능을 실질적으로 유지한다(또는 더 높은 효능을 갖는다). 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 TC-5619/브라다니클린이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 GlyRα1로부터 유래된 이온 기공 도메인을 포함하는 키메라 LGIC이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 CODA1047(SEQ ID NO: 69)이고, 대조군 수용체는 CODA71, CODA236 또는 CODA405이다.

[0321] 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 α7-nAChR의

LBD에서 R101F 및 Y210F에 상응하는 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 하나만을 갖는 대조군 수용체와 비교할 때 아세틸콜린에 대해 더 낮은 효능(예를 들어, 더 높은 EC50에 의해 결정됨)을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 >1mM의 아세틸콜린에 대한 EC50을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 하나만을 갖는 대조군 수용체와 비교할 때 비천연 리간드에 대한 효능을 실질적으로 유지한다(또는 더 높은 효능을 갖는다). 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 CNL001에 대해 <= 10nM의 EC50 및/또는 TC5619/브라다니클린에 대해 <= 약 30nM의 EC50을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체에 대한 비천연 리간드는 CNL001 또는 TC5619/브라다니클린이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 CNL001이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 TC5619/브라다니클린이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 GlyRα1로부터 유래된 이온 기공 도메인을 포함하는 키메라 LGIC이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 CODA1048(SEQ ID NO: 70)이고, 대조군 수용체는 CODA71, CODA236 또는 CODA407이다.

[0322] 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 α7-nAChR의 LBD에서 R101M 및 L131A에 상응하는 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 하나만을 갖는 대조군 수용체와 비교할 때 아세틸콜린에 대해 더 낮은 효능(예를 들어, 더 높은 EC50에 의해 결정됨)을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 >1mM의 아세틸콜린에 대한 EC50을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 하나만을 갖는 대조군 수용체와 비교할 때 비천연 리간드에 대한 효능을 실질적으로 유지한다(또는 더 높은 효능을 갖는다). 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 CNL001에 대해 약 10 nM 이하의 EC50, TC5619/브라다니클린에 대해 <= 약 3 nM의 EC50 및/또는 바레니클린에 대해 <= 약 3 nM의 EC50을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체에 대한 비천연 리간드는 CNL001, TC5619/브라다니클린 또는 바레니클린이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 CNL001이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 TC5619/브라다니클린이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 바레니클린이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 GlyRα1로부터 유래된 이온 기공 도메인을 포함하는 키메라 LGIC이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 CODA1053(SEQ ID NO: 71)이고, 대조군 수용체는 CODA71, CODA237 또는 CODA326이다.

[0323] 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 α7-nAChR의 LBD에서 R101M 및 L131F에 상응하는 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 하나만을 갖는 대조군 수용체와 비교할 때 아세틸콜린에 대해 더 낮은 효능(예를 들어, 더 높은 EC50에 의해 결정됨)을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 >1 mM 또는 >3 mM의 아세틸콜린에 대한 EC50을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 하나만을 갖는 대조군 수용체와 비교하여 비천연 리간드에 대한 효능을 실질적으로 유지한다(또는 더 높은 효능을 갖는다). 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 CNL001에 대해 <= 약 1nM의 EC50 및/또는 바레니클린에 대해 <= 약 3nM의 EC50을 가진다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 CNL001, TC5619/브라다니클린, 또는 바레니클린이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 CNL001이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 TC5619/브라다니클린이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 바레니클린이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 GlyRα1로부터 유래된 이온 기공 도메인을 포함하는 키메라 LGIC이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 CODA1054(SEQ ID NO: 72)이고, 대조군 수용체는 CODA71, CODA237 또는 CODA330이다.

[0324] 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 α7-nAChR의 LBD에서 R101W, Y115E 및 Y210W에 상응하는 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 단지 1개 또는 2개를 갖는 대조군 수용체와 비교할 때 아세틸콜린에 대해 더 낮은 효능(예를 들어, 더 높은 EC50에 의해 결정됨)을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 >3mM 또는 >10mM의 아세틸콜린에 대한 EC50을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 단지 1개 또는 2개를 갖는 대조군 수용체와 비교하여 비천연 리간드에 대한 효능을 실질적으로 유지한다(또는 더 높은 효능을 갖는다). 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 TC-5619/브라다니클린이다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 TC-5619/브라다니클린에 대해 <= 약 1nM의 EC50을 갖는다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 GlyRα1로부터 유래된 이온 기공 도메인을 포함하는 키메라 LGIC이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 CODA1055(SEQ

ID NO: 73)이고, 대조군 수용체는 CODA71, CODA238, CODA283, 또는 CODA409이다.

[0325] 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 α7-nAChR의 LBD에서 R101F, Y115E 및 Y210W에 상응하는 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 단지 1개 또는 2개를 갖는 대조군 수용체와 비교할 때 아세틸콜린에 대해 더 낮은 효능(예를 들어, 더 높은 EC50에 의해 결정됨)을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 >3mM 또는 >10mM의 아세틸콜린에 대한 EC50을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 단지 1개 또는 2개를 갖는 대조군 수용체와 비교하여 비천연 리간드에 대한 효능을 실질적으로 유지한다(또는 더 높은 효능을 갖는다). 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 TC-5619/브라다니클린이다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 TC-5619/브라다니클린에 대해 <= 약 10nM의 EC50을 갖는다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 GlyRα1로부터 유래된 이온 기공 도메인을 포함하는 키메라 LGIC이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 CODA1056(SEQ ID NO: 74)이고, 대조군 수용체는 CODA71, CODA236, CODA283, 또는 CODA409이다.

[0326] 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 α7-nAChR의 LBD에서 W77F, R101F 및 L131D에 상응하는 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 단지 1개 또는 2개를 갖는 대조군 수용체와 비교할 때 아세틸콜린에 대해 더 낮은 효능(예를 들어, 더 높은 EC50에 의해 결정됨)을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 >1 mM 또는 >3 mM의 아세틸콜린에 대한 EC50을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 단지 1개 또는 2개를 갖는 대조군 수용체와 비교하여 비천연 리간드에 대한 효능을 실질적으로 유지한다(또는 더 높은 효능을 갖는다). 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 CNL002에 대해 <= 약 10nM의 EC50을 갖는다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 CNL001, CNL002, 또는 ABT-126이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 CNL001이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 CNL002이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 ABT-126이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 GlyRα1로부터 유래된 이온 기공 도메인을 포함하는 키메라 LGIC이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 CODA1138(SEQ ID NO: 75)이고, 대조군 수용체는 CODA71, CODA217, CODA236, 또는 CODA339이다.

[0327] 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 α7-nAChR의 LBD에서 R101F, L131N 및 S172D에 상응하는 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 단지 1개 또는 2개를 갖는 대조군 수용체와 비교할 때 아세틸콜린에 대해 더 낮은 효능(예를 들어, 더 높은 EC50에 의해 결정됨)을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 >1 mM 또는 >3 mM의 아세틸콜린에 대한 EC50을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 단지 1개 또는 2개를 갖는 대조군 수용체와 비교하여 비천연 리간드에 대한 효능을 실질적으로 유지한다(또는 더 높은 효능을 갖는다). 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 CNL001에 대해 <= 약 1nM의 EC50, 또는 CNL002에 대해 <= 약 10nM의 EC50을 갖는다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 CNL001 또는 CNL002이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 CNL001이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 CNL002이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 GlyRα1로부터 유래된 이온 기공 도메인을 포함하는 키메라 LGIC이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 CODA1140(SEQ ID NO: 76)이고, 대조군 수용체는 CODA71, CODA236, CODA337, 또는 CODA377이다.

[0328] 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 α7-nAChR의 LBD에서 Q139E 및 S172D에 상응하는 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 하나만 있는 대조군 수용체(예를 들어, S172D)와 비교할 때 아세틸콜린에 대해 더 낮은 효능(예를 들어, 더 높은 EC50에 의해 결정됨)을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 하나만을 갖는 대조군 수용체와 비교할 때 비천연 리간드에 대한 효능을 실질적으로 유지한다(또는 더 높은 효능을 갖는다). 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 CNL001 또는 CNL002이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 CNL001이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 CNL002이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 GlyRα1로부터 유래된 이온 기공 도메인을 포함하는 키메라 LGIC이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 CODA1157(SEQ ID NO: 77)이고, 대조군 수용체는 CODA71, CODA945 또는 CODA377이다.

[0329] 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 α7-nAChR의 LBD에서 S172D 및 Y210W에 상응하는 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이

러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 하나만을 갖는 대조군 수용체와 비교할 때 아세틸콜린에 대해 더 낮은 효능(예를 들어, 더 높은 EC50에 의해 결정됨)을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 >3mM 또는 >10mM의 아세틸콜린에 대한 EC50을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없거나 이러한 치환 중 하나만을 갖는 대조군 수용체와 비교할 때 비천연 리간드에 대한 효능을 실질적으로 유지한다(또는 더 높은 효능을 갖는다). 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 CNL001에 대해 <= 약 10nM의 EC50을 갖는다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체에 대한 비천연 리간드는 CNL001, CNL002 또는 ABT-126이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 CNL001이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 CNL002이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 ABT-126이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 GlyRα1로부터 유래된 이온 기공 도메인을 포함하는 키메라 LGIC이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 CODA1173(SEQ ID NO: 78)이고, 대조군 수용체는 CODA71, CODA377 또는 CODA409이다.

[0330] 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 α7-nAChR의 Y140에 상응하는 아미노산 잔기에서 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 아미노산 치환은 Y140I이다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없는 대조군 수용체와 비교하여 아세틸콜린에 대해 더 낮은 효능(예를 들어, 더 높은 EC50에 의해 결정됨)을 갖는다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 인간 GlyRα1로부터 유래된 이온 기공 도메인(예를 들어, CODA952, SEQ ID NO: 64)을 포함하는 키메라 LGIC이고, 대조군 수용체는 CODA71(SEQ ID NO: 33)이다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없는 대조군 수용체와 비교하여 비천연 리간드에 대한 효능을 실질적으로 유지한다(또는 더 높은 효능을 갖는다). 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체에 대한 비천연 리간드는 CNL001, TC-5619/브라다니클린, CNL002 또는 파시니클린이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 CNL001이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 TC-5619/브라다니클린이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 CNL002이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 파시니클린이다.

[0331] 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유도된 리간드 결합 도메인 및 인간 α7-nAChR의 Y140에 상응하는 아미노산 잔기에서 아미노산 치환을 포함한다. 일부 실시태양에서, 아미노산 치환은 Y140C이다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없는 대조군 수용체와 비교하여 아세틸콜린에 대해 더 낮은 효능(예를 들어, 더 높은 EC50에 의해 결정됨)을 갖는다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유도된 리간드 결합 도메인 및 인간 GlyRα1로부터 유도된 이온 기공 도메인(예를 들어, CODA965, SEQ ID NO: 88)을 포함하는 키메라 LGIC이고, 대조군 수용체는 CODA71(SEQ ID NO: 33)이다. 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체는 이러한 치환이 없는 대조군 수용체와 비교하여 비천연 리간드에 대한 효능을 실질적으로 유지한다(또는 더 높은 효능을 갖는다). 일부 실시태양에서, 이러한 조작된 수용체에 대한 비천연 리간드는 CNL001, TC-5619/브라다니클린, CNL002, ABT-126 또는 TC-6987이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 CNL001이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 TC-5619/브라다니클린이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 CNL002이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 ABT-126이다. 일부 실시태양에서, 비천연 리간드는 TC-6987이다.

[0332] 이들 예시적인 조작된 수용체의 요약은 하기 표 10에 제공된다.

표 10

[0333] 예시적인 조작된 수용체

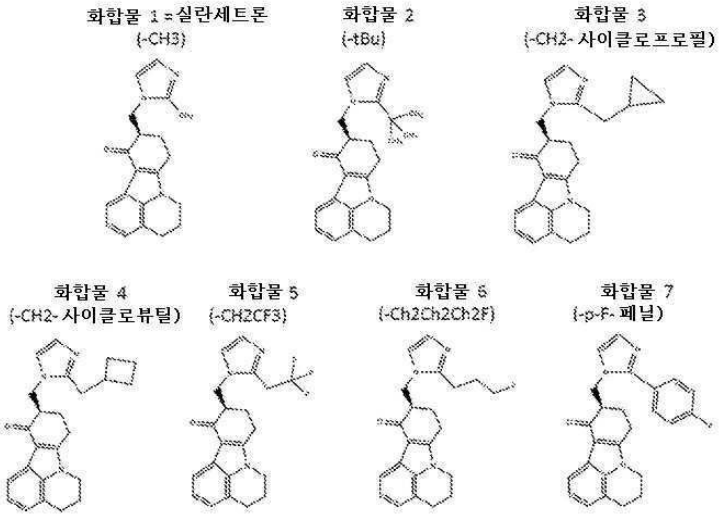
SEQ ID NO:	명칭	서열
SEQ ID NO: 58	CODA536	L131D, S172D in SEQ ID NO: 33
SEQ ID NO: 59	CODA534	L131S, S172D in SEQ ID NO: 33
SEQ ID NO: 60	CODA535	L131T, S172D in SEQ ID NO: 33
SEQ ID NO: 61	CODA807	Y115D, L131E in SEQ ID NO: 33
SEQ ID NO: 62	CODA806	Y115D, L131Q in SEQ ID NO: 33
SEQ ID NO: 63	CODA805	Y115D, S170T in SEQ ID NO: 33
SEQ ID NO: 64	CODA952	Y140I in SEQ ID NO: 33
SEQ ID NO: 65	CODA1025	R101F, L131G in SEQ ID NO: 33
SEQ ID NO: 66	CODA1027	R101F, L131D in SEQ ID NO: 33
SEQ ID NO: 67	CODA1039	Y115E, Y210W in SEQ ID NO: 33
SEQ ID NO: 68	CODA1045	R101W, Y210V in SEQ ID NO: 33
SEQ ID NO: 69	CODA1047	R101F, Y210V in SEQ ID NO: 33

SEQ ID NO: 70	CODA1048	R101F, Y210F in SEQ ID NO: 33
SEQ ID NO: 71	CODA1053	R101M, L131A in SEQ ID NO: 33
SEQ ID NO: 72	CODA1054	R101M, L131F in SEQ ID NO: 33
SEQ ID NO: 73	CODA1055	R101W, Y115E, Y210W in SEQ ID NO: 33
SEQ ID NO: 74	CODA1056	R101F, Y115E, Y210W in SEQ ID NO: 33
SEQ ID NO: 75	CODA1138	W77F, R101F, L131D in SEQ ID NO: 33
SEQ ID NO: 76	CODA1140	R101F, L131N, S172D in SEQ ID NO: 33
SEQ ID NO: 77	CODA1157	Q139E, S172D in SEQ ID NO: 33
SEQ ID NO: 78	CODA1173	S172D, Y210W in SEQ ID NO: 33
SEQ ID NO: 88	CODA965	Y140C in SEQ ID NO: 33

[0334] **D. 리간드**

[0335] 일부 실시태양에서, 본 발명의 리간드는 포유류 세포 상에서 공지된 작용 메커니즘을 갖는 외인성 약물 또는 화합물을 지칭한다(예를 들어, 수용체의 효현제, 길항제 또는 조절제로서 작용하는 것으로 알려짐). 이런 리간드는 "결합제"로서 지칭될 수 있다. 본 발명의 리간드는 단백질, 지질, 핵산 및/또는 소분자를 포함할 수 있다. 일부 실시태양에서, 리간드는 특정 질환(예를 들어, 신경학적 질환)의 치료에서 임상용으로 미국 식품 의약국(US Food and Drug Administration: FDA)에 의해 승인된 약물 또는 화합물을 포함한다. 일부 실시태양에서, 리간드는 임상용으로 FDA에 의해 승인되지 않았지만, 한 가지 이상의 임상 시험에서 시험된 약물 또는 화합물을 포함하고, 현재 한 가지 이상의 임상 시험에 시험 중이고/이거나 한 가지 이상의 임상 시험에 시험될 것으로 예상된다. 일부 실시태양에서, 리간드는 임상용으로 FDA에 의해 승인되지 않았지만, 실험실 연구에서 일상적으로 사용되는 약물 또는 화합물을 포함한다. 일부 실시태양에서, 리간드는 앞서 언급한 리간드 중 하나의 유사체이다. 특정 실시태양에서, 리간드는 아래 표 2 내지 표 9의 리간드 중 어느 하나로부터 선택된다. 일부 실시태양에서, 리간드는 AZD0328, ABT-126, AQW-051, 칸나비다이올, 실란세트론, PH-399733, 파시니클린/RG3487/MEM-3454, TC-6987, CNL002 및 TC-5619/AT-101로 이루어진 그룹으로부터 선택된다. 일부 실시태양에서, 리간드는 ABT-126, AZD-0328, CNL002, RG3487, TC-6987, CNL001, TC-6683, 바레니클린 및 TC-5619로 이루어진 그룹으로부터 선택된다.

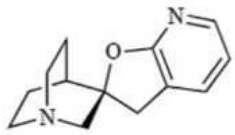
[0336] 특정 실시태양에서, 리간드는 이하의 화학식 2 내지 7 중 하나가 R 또는 S 거울상이성질체로 기재되는 바와 같은, 실란세트론의 유사체이다:



[0337]

[0338] 일부 실시태양에서, 리간드는 효현제로서 작용한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "효현제"는 신호전달 반응을 유도하는 리간드를 지칭한다. 일부 실시태양에서, 리간드는 길항제로서 작용한다. 용어 길항제는 본 명세서에서 신호전달 반응을 저해하는 리간드를 지칭하기 위해 사용된다.

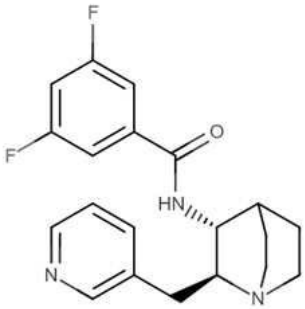
[0339] 일부 실시태양에서, 리간드는 하기 화학식에 따른 AZD-0328이다:



AZD0328

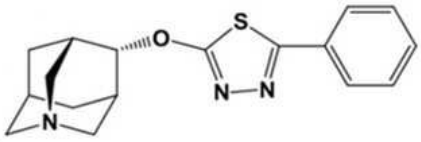
[0340]

[0341] 일부 실시태양에서, 리간드는 하기 화학식에 따른 TC-6987이다:



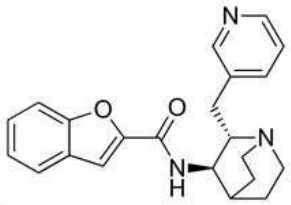
[0342]

[0343] 일부 실시태양에서, 리간드는 하기 화학식에 따른 ABT-126이다:



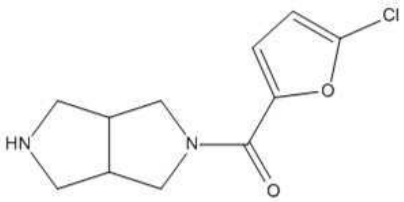
[0344]

[0345] 일부 실시태양에서, 리간드는 하기 화학식에 따른 TC-5619/브라다니클린이다:



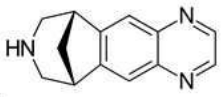
[0346]

[0347] 일부 실시태양에서, 리간드는 하기 화학식에 따른 TC-6683이다:



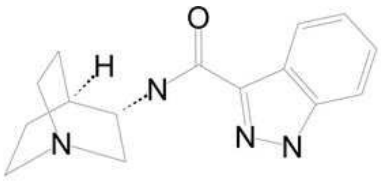
[0348]

[0349] 일부 실시태양에서, 리간드는 하기 화학식에 따른 바레니클린이다:



[0350]

[0351] 일부 실시태양에서, 리간드는 하기 화학식에 따른 파시니클린/RG3487이다:



[0352]

[0353] 일부 실시태양에서, 리간드는 CNL001이다.

[0354] 일부 실시태양에서, 리간드는 CNL002이다.

[0355] 일부 실시태양에서, 리간드는 항불안제, 항경련제, 항우울제, 항정신병제, 항구토제, 누트로픽(nootropic), 항생제, 항진균제, 항바이러스제, 또는 항기생충제이다.

표 2

[0356] **글리신 수용체(GlyR)에 대한 리간드**

효현제		**조절제/결합제**	**길항제**	
빌로발라이드	L-세린	가베스티넬	468816	린단
칸나비다이올	MDL-27531	할로탄	ACEA-2085	MDL-100748
D-알라닌	메톡시플루란		비쿠쿨린	MDL-102288
D-세린	밀라세마이드		브루신	MDL-105519
데스플루란	목시덱틴		카페인	PD-165650
도라멕틴	NRX-1050		가베스티넬	피크로독신
에마멕틴	NRX-1060		징코 빌로바	스트리키닌
에프리노멕틴	P-9939		GV-196771	티오콜치코사이드
에탄올	퀴스쿠알라민		GW 468816	투틴
글리신	라파스티넬		HMR-2371	UK-315716
하이포타우린	S-18841		L-695902	ZD-9379
아이소플루란	사르코신		L-701324	
이베르멕틴	세보플루란			
L-알라닌	타우린			
L-프롤린	β-알라닌			

표 3

[0357] **λ-아미노부티르산 A 수용체(GABA-A)에 대한 리간드**

효현제	**조절제/결합제**			**길항제**
3-아실-4-퀴놀론	(-)에피갈로-카테킨-3-갈레이트	에티폭신	펜토바르비탈	(±)-시스-(3-아미노시클로펜틸) 부틸포스핀산
아캄프로세이트	10-메톡시-양고닌	에티졸람	페트리클로랄	(S)-(4-아미노사이클로펜트-1-에닐)부틸포스핀산
알파돌론	11-하이드록시-양고닌	에토미데이트	PF-4480682	아목사핀
바마루졸	11-메톡시-12-하이드록시-데하이드로카바인	Evt-201	페나제팜	비쿠쿨린
바스미사닐	11-메톡시-양고닌	파시플론	페노바르비탈	CGP-36742 (3-아미노프로필-n-부틸-포스핀산)
브레타제닐	123i-이오마제닐	Fg-8205	피나제팜	플루마제닐
CACA	2-옥소쿠아제팜	플레타제팜	파이프퀼린	가바진
CAMP	3-하이드록시-페나제팜	플루브로마제팜	피복사제팜	징코 빌로바
CP-409092	5-하이드록시카바인	플루브로마졸람	브롬화칼륨	린단
도라멕틴	5,6-데하이드로-메티스티신	플루다이아제팜	프라제팜	메토헥시탈

이마멕틴	5,6-다이하이드로-양고닌	플루마제닐	프레마제팜	피크로톡신
에프리노멕틴	5,6,7,8-테트라하이드로-양고닌	플루니트라제팜	프리미돈	SKF-97541 (3-아미노프로필(메틸)포스핀산)
에스조피클론	7,8-다이하이드로카바인	플루라제팜	프로플라제팜	TPMPA
에탄올	7,8-다이하이드로-메티스티신	플루타졸람	프로파니디드	ZAPA ((Z)-3-[(아미노이미노메틸)티오]프로프-2-에노산)
에토미데이트	7,8-다이하이드로-양고닌	플루트마제팜	프로포폴	
플루니트라제팜	아베카르닐	플루토프라제팜	PWZ-007A	
GABA	아디나졸람	포사제팜	PWZ-009A1	
가브아마미드	알로바르비탈	포스프로포폴	Pwz-029	
GABOB	알로-프레그나놀론	가나쏘론	피라졸람	
가브옥사돌	알파솔론	Gbld-345	PZ-II-028	
감마 하이드록시부티르산	알페날	게도카르닐l	PZ-II-029	
글루테티미	알피뎀	기다제팜	Qh-Ii-66	
이보텐산	알프라조람	지리소팜	콰제팜	
이미다제닐	아멘토플라본	글루테티미드	퀴니딘 바르비튜레이트	
아이소플루란	아모바르비탈	Gyki-52466	레클라제팜	
아이소구바신	아피제닌	Gyki-52895	레미마졸람	
아이소니페코틴산	아프로바비탈	할라제팜	릴마자폰	
이버멕틴	아르펜다잠	할록사졸람	리파제팜	
L-830982	아비자폰	헵타바르비탈	Ro15-4513	
메프로바메이트	AZD7325	헥소바르비탈	Ro48-6791	
메톡시플루란	바이칼레인	이클라제팜	Ro48-8684	
MK-0777/L83098	바이칼린	이미다제닐	Ro4938581	
메티프릴론	바르비탈	인디플론	Rwj-51204	
목시덱틴	바르비투르산 유도체	이라제핀	사리피뎀	
무시몰	벤타제팜	카바인	사르마제닐	
N4-클로로아세틸-시토신 아라비노시드	브랄로바르비탈	케나제핀	Sb-205,384	
파고클론	브레타제닐	케타졸람	스쿠텔라레인	
페니부트	브로마제팜	L-655708	세코바르비탈	
피가밀론	브로티졸람	L-838,417	세보플루란	
피페라진	부탈비탈	란탄	Sh-053-R-Ch3-2'F	
피페리딘-4-술폰산	부테탈	LAU 156	스컬-캡플라본 II	
프로가비드	부토바르비탈	LAU 157	Sl-651,498	
QH-ii-066	카마제팜	LAU 159	아미탈 나트륨	
퀴스쿠알아민	카부라제팜	LAU 161	펜토탈 나트륨	
세보플루란	카리소프로돌	LAU 162	스티리펜톨	
SL 75102	CGS 20625	LAU 163	술라제팜	
SL-651,498	CGS 20625	LAU 176	설폰메테인	
티아밀랄	CGS 8216	LAU 177	수프로클론	
티오무시몰	CGS 9895	LAU 206	수리클론	
톨가비드	CGS 9896	로펜다잠	Sx-3228	
토피라메이트	클로랄 하이드레이트	로피라제팜	탈람파넬	
졸피뎀	클로랄로스	로프라졸람	탈부탈	
α5IA	클로르디아제폭시드	로라제팜	타니플론	
	클로르메자논	로바메이트	테마제팜	
	클로로폼	로레클레졸	테트라제팜	
	시클로티졸람	로레디플론	테트로날	
	시나제팜	로르메타제팜	Thdoc	
	시놀라제팜	메클로나제팜	테아닌	
	C1-218,872	메다제팜	티아밀랄	
	클라조람	메니트라제팜	티에노디아제핀	
	클리마졸람	메포바르비탈	티오펜탈	
	클로바잠	메프로바메이트	토피소팜	

	클로메티아졸	메타클라제팜	톨루파제팜	
	클로나제팜	메타쿠알론	Tp-003	
	클로나졸람	메타르비탈	Tp-13	
	클로라제페이트	메토헥시탈	Tpa-023	
	클로티아제팜	메틸-페노바르비탈	트라이아졸람	
	클록사졸람	메티프릴론	트라이플루바잠	
	Cp-1414s	메티스티신	트라이플루노르다제팜	
	CTP-354	메티졸람	트라이오날	
	사이클로바비탈	멕사졸람	투클라제팜	
	사이프라제팜	미다졸람	울다제팜	
	델로라제팜	모트라제팜	발레렌산	
	데모세팜	N-데스알킬-플루라제팜	발레르산	
	데스클로로에티졸람	네코피뎀	워ㅗ닌	
	데스메톡시-양고닌	네리소팜	XHe-II-006	
	데스메틸-플루니트라제팜	니아신	XHe-II-019	
	다이아제팜	나이아신아마이드	XHe-II-087c	
	다이클라제팜	니폭시팜	XHe-II-094	
	다이에틸 에터	니메타제팜	XHe-II-098b	
	다이하이드로-에르고톡신	니트라제팜	XHe-II-17	
	다이하드로퀴니딘 바르비튜레이트	니트라제페이트	XHe-III-006c	
	다이프로쿠알론	니트라졸람	XHe-III-063	
	다이바플론	노르다제팜	XHe-III-24	
	독세파제팜	노르테트라제팜	XHe/ON-I	
	Elb-139	Ns-2664	Y-23684	
	엘파제팜	Ns-2710	양고닌	
	에스타졸람	오시나플론	잘레플론	
	에스조피클론	오록실린 A	자피졸람	
	에타쿠알론	옥사제팜	아연	
	에타제핀	옥사졸람	Zk-93423	
	에타졸레이트	파고클론	졸라제팜	
	에틸 카플루제페이트	파나디플론	졸피뎀	
	에틸 다이라제페이트	파지나클론	좀바잠	
	에틸 로플라제페이트	PB-XHe	조피클론	

표 4

[0358] **5-하이드록시트립타민 수용체(5-HT3)에 대한 리간드**

효현제	**조절제/결합제**	**길항제**	
2-메틸-5-HT	5-클로로인돌	3-트로파닐 인돌-3-카복실레이트	미안세린
알파-메틸트립타민	트라이미프라민	Adr-851	미리세트론 말레이트
부포테닌		Adr-882	미르타자핀
클로로페닐 바이구아니드		알로세트론	M1-1035
시사프리드		아목사핀	Mm-218
DDP733		안피르톨린	N-3256
에탄올		아리피프라졸	네투피탄트
에탄올		AS-8112	올란자핀
이보가이네		아자세트론	온단세트론
메토클로프라미드		바타노프리드	Org-4419
페닐바이구아니드		Bimu-1	Org-4419-2
퀴파진		클로로프로케인	팔로노세트론
RS-56812		클리안세트론	판코프리드
SR-57227		클로자핀	프로케인

타펜타돌		Cp-81386	퀴디아핀
바레니클린		Cp-93318	R-093777
YM-31636		Cr-3124	R-자코프리드
		DA-9701	라모세트론
		다이작	렌자프리드
		Dat-582	Rg-12915
		Dau-6285	리카세트론
		Ddp-225	로쿠로니움
		돌라세트론	Rs-16566
		E-3620	Rs-33800
		파베세트론	Rs-56532
		파시니클린/RG3487 하이드로클로라이드	Rs-56812
		갈단세트론	S-21007
		가스트로프로키네틱스	Sc-50410
		Gk-128	Sc-52150
		Gr-65630	Sc-52246
		그라니세트론	Sc-52491
		Gyki-46903	Sc-54750
		이타세트론	Sdz-Icm-567
		Kb-6806	Sep-226332
		Kf-18259	Srss-021
		Kf-20170	데다티옥세틴
		Kga-0941	투존
		L-683877	토피라메이트
		라모트리긴	트로피세트론
		레리세트론	투보쿠라린
		린토프리드	Tzb-30878
		리토제틴	Va-21B7
		록사핀	Vi-0134
		루로세트론	보르티옥세틴
		Ly-278584	보르티옥세틴 하이드로브로마이드
		M1, 모사프리드의 주요 활성 대사산물	Way-100289
		Mci-225	Ym-114
		Mci-225	Ym-26103-2
		메만틴	Ym-26308-2
		멘톨	자코프리드
		메타돈	자토세트론
		메토클로프라미드	지프라시돈

표 5

[0359] **니코틴성 아세틸콜린 수용체(nAchR)에 대한 리간드**

효현제	조절제/결합제	길항제
(+)-N-(1-아자바이사이클로[2.2.2]옥트-3-일)벤조[b]푸란-2-카복사마이드	A-867744	(-)-7-메틸-2-엑소-[3'-(6-[18F]플루오로피리딘-2-일)-5'-피리디닐]-7-아자바이사이클로[2.2.1]헵테인
3-브로모사이티신	AQW-051	2-플루오로-3-(4-나이트로-페닐)데스클로로에피바티딘
A-366,833	AVL-3288	Acv-1
A-582941	데스포르밀플루스트라브로민	ACVx
A-82695	에탄올	아모바르비탈
A-84,543	갈란타민	아난다민
ABT-089	이베르멕틴	Anq-9040
ABT-126	네피라세탐	아프로바비탈

Abt-202	NS-1738	ATG-001
ABT-418	NS-9283	ATG003
Abt-418	PNU-120,596	아트라쿠리움 베스틸레이트
Abt-560	테트라에틸암모늄	바르비탈
ABT-894		바르비투르산 유도체
아세틸콜린		바이페리덴
알티니클린		부프로피온
알티니클린		부타바르비탈
아미노에톡시피리딘		부탈비탈
아나바신		부테탈
AR-R17779		클로로프로케인
Asm-024		시사트라쿠리움 베실레이트
AZD-0328		시사트라쿠리움 베사일레이트
부프로피온 하이드로클로라이드		코클라우린
카바촐		데하이드로노르케타민
콜린		중수소화된 부프로피온
Cm-2433		덱사트로메토르판
CP-601927		독사쿠리움 클로라이드
CP-601932		에탄올
Cp-810123		갈라민 트라이에티오디드
사이티신		헵타바르비탈
DBO-83		헥소바르비탈
데카메토니움		하이드록시부프로피온
다아아니클린		하이드록시노르케타민
다아아니클린		이나페리손
엔세니클린		이프타칼림
에피바티딘		아이소플루란
EVP-6124		케타민
Evp-6124		키뉴렌산
갈란타민		레보메타딜 아세테이트
GTS-21		로벨린
Gts-21		메카밀아민
ICH-3		메카밀아민
이스프로니클린		메만틴
레바미솔		메타돈
로벨린		메타르비탈
로벨린 설페이트		메틸리카코니틴
Mem-3454		메틸페노바르비탈
MEM-63908		메토쿠린
Mem-63908		메토쿠린 아이오다이드
N-(3-피리디닐)-브리지드 바이사이클릭 다이아민		미바쿠리움
니코틴		네라멕세인
PH-399733		Nic-002
Ph-399733		나이트로스 옥사이드
PHA-543,613		노르케타민
Pha-543613		Org-9991
PHA-709829		판쿠로니움
PNU-282,987		펜토바르비탈
Pnu-282987		펜톨리니움
포자니클린		페노바르비탈
포자니클린		피페쿠로니움
리바니클린		피페쿠로니움
리바니클린		PNU-120,596
Rjr-1401		프리미돈
Sar-130479		프로케인
사제티딘 A		퀴놀리지딘(-)-1-epi-207I
Sib-1663		RJR-2531

Sib-1765f		로쿠로니움
Sib-3182		RPI-78M
소피니클린		세코바르비탈
SSR-180,711		탈부탈
숙시닐콜린		티오펜탈
Suvn-F90101		트라이메타판
Suvn-F91201		투보쿠라린
타크린-후페르진 A		U-2902
TC-1698		베쿠로니움
TC-1827		α-번가로톡신
Tc-2216		α-코노톡신
Tc-2403		
Tc-2429		
Tc-2559		
Tc-2696		
TC-5619		
테바니클		
트로피세트론		
Ub-165		
바레니클린		
WAY-317,538		
CNL001		
CNL002		

표 6

[0360] **ATP-개폐 P2X 수용체 양이온 채널(P2X)에 대한 리간드**

효현제	**조절제/결합제**	**길항제**	
ATP	이베르멕틴	4-벤조일-1-치환-피페라진-2-온	MK-801
BzATP		5-메틸-6,7-다이하이드로-5H사이클로펜타피라진	MRS2159
α,β-meATP		5-옥소-3-피롤리딘카복사마이드	NF023
		5,6,7,8-테트라하이드로피리도[4,3,d]-피리미딘스	NF279
		A-317491	NF449
		아미트립틸린	노르트립틸린
		아자인돌-3-카복사마이드	옥소아이소퀴놀린 카복사마이드
		AZD-9056	파르옥세틴
		벤즈아마이드 6	피페라진
		벤조푸로-1,4-다이아제핀-2-온	폴리사이클릭 구아닌
		벤조이미다졸	PPADS
		바이아릴 벤즈아마이드	PPNDS
		카복사미드	피라졸로-[1,5,a]-피리딘 카복사마이드
		CE-224535	피리다지논
		데시프라민	피리독살-5-포스페이트
		다이아미노피리딘	피롤리논
		독세핀	피롤로-[2,3,b]-피리딘 카복사마이드
		에실카바제핀 아세테이트	피롤로피리미딘-7-온
		EVT-401	퀴놀린 카복사마이드
		플루옥세틴	RO-3
		히알루론산 유도체	RO-4
		아미프라민	RO-51
		인돌 카복사마이드	스피노르핀
		인돌-3-카복사마이드	수라민

		Ip5I	테트라하이드로-2H-1,2-티아진 1,1-다이옥사이드
		아이소퀴놀린 카복사마이드	TNP-ATP
		아이소티아졸리딘 1,1-다이옥사이드	

표 7

[0361] 내부 정류 칼륨 채널(Kir)에 대한 리간드

효현제	조절제/결합제	길항제
다이아조옥사이드		아세토헥사미드
이프타칼림		카부타마이드
미녹시딜		클로르프로파미드
니코란딜		글리벤클라마이드
포스파티딜이노시톨 4,5-비스포스페이트		글리벤클라마이드
피나시딜		글리보누리드
		글리클라지드
		글리메피리드
		글리피지드
		글리퀴돈
		글리소세피드
		글리부라이드
		글리클로피라미드
		글리사이클라마이드
		메타헥사미드
		톨라자미드
		톨부타마이드
		톨헥사미드

표 8

[0362] 전압 의존 칼륨 채널(KCNQ/Kv7)에 대한 리간드

효현제	조절제/결합제	길항제
다이아족사이드		아지밀리드
플루피르틴		아미오다론
미녹시딜		브레틸륨
니코란딜		클로필리움
피나시딜		달팝프리딘
레티가빈		도페틸리드
		E-4031
		이부틸리드
		니페칼란트
		세마틸리드
		소탈롤
		설포닐우레아
		테디사밀

표 9

[0363] 낭포성 섬유증 막횡단 전도도 조절제(CFTR)에 대한 리간드

효현제	조절제/결합제	길항제
	8-사이클로펜틸-1,3-다이프로필크산틴	부메타니드
	8-메톡시소랄렌	크로펠레머
	아피제닌	글리부라이드

	CTP-656	이부프로펜
	제니스테인	
	IBMX	
	이바카프토르	
	루마카프터	

[0364] **E. 폴리뉴클레오타이드**

[0365] 다양한 예시적 실시태양에서, 본 발명은 부분적으로 폴리뉴클레오타이드, LGIC 및 서브유닛 및 이의 뮤테인을 포함하는 조작된 수용체 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 및 융합 폴리펩타이드, 바이러스 벡터 폴리뉴클레오타이드, 및 이들을 포함하는 조성물이 고려된다.

[0366] 본 명세서에서 사용되는 용어 "폴리뉴클레오타이드", "뉴클레오타이드", "뉴클레오타이드 서열" 또는 "핵산"은 상호 호환적으로 사용된다. 이들은 임의의 길이의 뉴클레오타이드의 폴리머 형태, 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 중 하나, 또는 이들의 유사체를 지칭한다. 폴리뉴클레오타이드는 임의의 3차원 구조를 가질 수 있고, 알려져 있거나 알려져 있지 않은 임의의 기능을 수행할 수 있다. 다음은 폴리뉴클레오타이드의 비제한적 예이다: 유전자 또는 유전자 단편의 암호화 또는 비암호화 영역, 결합 분석으로부터 정해진 유전자좌(유전자좌들), 엑손, 인트론, 전령 RNA(mRNA), 전달 RNA(tRNA), 리보솜 RNA(rRNA), 짧은 간섭 RNA(siRNA), 짧은-헤어핀 RNA(shRNA), 마이크로-RNA(miRNA), 리보자임, cDNA, 재조합 폴리뉴클레오타이드, 분지형 폴리뉴클레오타이드, 플라스미드, 벡터, 임의의 서열의 분리된 DNA, 임의의 서열의 분리된 RNA, 핵산 프로브 및 프라이머. 폴리뉴클레오타이드는 하나 이상의 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대 메틸화된 뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체를 포함할 수 있다. 존재한다면, 뉴클레오타이드 구조에 대한 변형은 폴리머 조립체의 전에 또는 후에 부여될 수 있다. 뉴클레오타이드의 서열은 비뉴클레오타이드 성분에 의해 방해될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 중합 후에, 예컨대 표지 성분과의 접합에 의해 추가로 변형될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 데옥시리보핵산(DNA), 리보핵산(RNA) 또는 DNA/RNA 혼성체일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 단일-가닥 또는 이중-가닥일 수 있다. 폴리뉴클레오타이드는 전-전령 RNA(전-mRNA), 전령 RNA(mRNA), RNA, 짧은 간섭 RNA(siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(shRNA), 마이크로RNA(miRNA), 리보자임, 합성 RNA, 게놈 RNA(gRNA), 플러스 가닥 RNA(RNA(+)), 마이너스 가닥 RNA(RNA(-)), 합성 RNA, 게놈 DNA(gDNA), PCR 증폭 DNA, 상보성 DNA(cDNA), 합성 DNA 또는 재조합 DNA를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 길이가 (이 사이의 모든 범위와 하위 범위 포함하는) 적어도 5, 적어도 10, 적어도 15, 적어도 20, 적어도 25, 적어도 30, 적어도 40, 적어도 50, 적어도 100, 적어도 200, 적어도 300, 적어도 400, 적어도 500, 적어도 1000, 적어도 5000, 적어도 10000 또는 적어도 15000 이상의 뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드의 폴리머 형태, 리보뉴클레오타이드 또는 데옥시뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드 유형 중 하나의 변형된 형태뿐만 아니라 모든 중간 길이를 지칭한다. 이와 관련하여 "중간 길이"는 인용된 값 사이의 임의의 길이, 예컨대, 6, 7, 8, 9 등, 101, 102, 103 등; 151, 152, 153 등; 201, 202, 203 등을 의미한다는 것이 용이하게 이해될 것이다. 특정 실시태양에서, 폴리뉴클레오타이드 또는 변이체는 본 명세서에 기술되거나 당업계에 공지된 기준 서열에 대해 (이 사이의 모든 범위와 하위 범위 포함하는) 적어도 또는 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%,76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%,85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 가지며, 전형적으로 변이체는 달리 언급되지 않는 한, 기준 서열의 적어도 하나의 생물학적 활성을 유지한다.

[0367] 본 명세서에서 사용되는 용어 "유전자"는 인핸서, 프로모터, 인트론, 엑손 등을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭할 수 있다. 특정 실시태양에서, 용어 "유전자"는 폴리뉴클레오타이드 서열이 폴리펩타이드를 암호화하는 게놈 서열과 동일한지 여부와는 상관없이, 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭한다.

[0368] 본 명세서에 사용되는 바와 같이, "시스-작용성 서열, "시스-작용성 조절 서열", 또는 "시스-작용성 뉴클레오타이드 서열" 또는 동의어는 유전자의 발현, 예를 들어, 전사 및/또는 번역과 연관된 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 한 실시태양에서, 시스-작용성 서열은 전사를 억제하거나 감소시키는 폴리펩타이드 또는 전사 억제에 기여하는 전사 인자 결합 부위와 연관된 폴리뉴클레오타이드 서열에 대한 결합 부위이기 때문에 전사를 조절한다. 폴리뉴클레오타이드 서열의 발현을 조절하고, 대상 조작된 수용체의 발현을 조절하는 본 발명의 폴리뉴클레오타이드에 작동가능하게 연결될 수 있는 시스-작용성 서열의 예는 당업계에 잘 공지되어 있으며, 프로모터 서열(예를 들어, CAG, CMV, SYN, CamKII, TRPV1), 코작(Kozak) 서열, 인핸서, 전사후 조절 요소, miRNA 결합 요소 및 폴리아데닐화 서열로서 이러한 요소를 포함한다.

[0369] 하나의 비제한적 예로서, 프로모터 서열은 세포에서 RNA 중합효소에 결합할 수 있고 하류의(3' 방향) 암호화 서열의 전사를 개시할 수 있는 DNA 조절 영역이다. 본 발명을 정하는 목적을 위해, 프로모터 서열은 전사 개시 부위에 의해 이의 3' 말단에 결합되며, 배경 초과의 검출 가능한 수준에서 전사를 개시하는 데 필요한 최소 수의 염기 또는 요소를 포함하도록 상류에서(5' 방향) 연장된다. 프로모터 서열 내에서 전사 개시 부위뿐만 아니라 RNA 중합효소의 결합을 초래하는 단백질 결합 도메인이 발견될 것이다. 진핵생물 프로모터는, 항상은 아니지만, 종종 "TATA" 박스 및 "CAT" 박스를 함유할 것이다. 본 발명의 다양한 벡터를 유도하기 위해 다양한 프로모터가 사용될 수 있다. 예를 들어, 프로모터는 구성적으로 활성인 프로모터, 즉, 외적으로 적용된 리간드의 부재 하에 활성인 프로모터, 예를 들어, CMV IE1 프로모터, SV40 프로모터, GAPDH 프로모터, 액틴 프로모터일 수 있다. 프로모터는 유도성 프로모터, 즉, 이의 활성이 세포에 대한 리간드, 예를 들어, 독시사이클린의 적용 시 조절되는 프로모터, tet-on 및 tet-off 프로모터, 에스트로겐 수용체 프로모터 등일 수 있다. 프로모터는 조직-특이적 프로모터, 즉, 세포의 특정 유형에 대해 활성인 프로모터일 수 있다.

[0370] 일부 실시태양에서, 프로모터는 흥분성 세포에서 활성이다. "흥분성 세포"는 막전위의 변화에 의해 활성화되는 세포, 예를 들어, 뉴런 또는 근세포, 예를 들어, 후근 신경절 뉴런, 운동 뉴런, 흥분성 뉴런, 저해 뉴런 또는 감각 뉴런을 의미한다. 본 폴리뉴클레오타이드 조성물에서의 용도를 발견하는 흥분성 세포에서 활성인 프로모터는 뉴런 프로모터, 예를 들어, 시냅신(SYN), TRPV1, $Na_v1.7$, $Na_v1.8$, $Na_v1.9$, CamKII, NSE, 및 애드빌린(Advillin) 프로모터; 근세포 프로모터, 예를 들어, 데스민(Des), 알파-미오신 중쇄(α-MHC), 미오신 경쇄 2(MLC-2) 및 심장 트로포닌 C(cTnC) 프로모터; 및 편재 작용성 프로모터, 예를 들어, CAG, CBA, E1Fa, Ubc, CMV, 및 SV40 프로모터를 포함한다.

[0371] 본 명세서에서 사용되는 "유도성 발현을 위한 조절 요소"는 발현되도록 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결되고, 이에 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오타이드의 발현을 증가(턴-온) 또는 감소(턴-오프)시키기 위해 요소에 결합하는 분자의 존재 또는 부재에 반응하는 프로모터, 인핸서 또는 이의 기능성 단편인 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 유도성 발현을 위한 예시적인 조절 요소는 테트라사이클린 반응성 프로모터, 엑디손 반응성 프로모터, 큐메이트 반응성 프로모터, 글루코코티코이드 반응성 프로모터, 에스트로겐 반응성 프로모터, RU-486 반응성 프로모터, PPAR-γ 프로모터 및 퍼옥사이드 유도성 프로모터를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0372] "일시적 발현을 위한 조절 요소"는 폴리뉴클레오타이드 뉴클레오타이드 서열을 간략하게 또는 일시적으로 발현시키는 데 사용될 수 있는 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 특정 실시태양에서, 폴리뉴클레오타이드의 지속기간을 제한하기 위해 일시적 발현을 위한 하나 이상의 조절 요소가 사용될 수 있다. 특정 실시태양에서, 폴리뉴클레오타이드 발현의 바람직한 지속기간은 분, 시간 또는 일수의 순서이다. 일시적 발현을 위한 예시적인 조절 요소는 뉴클레아제 표적 부위, 재조합효소 인식 부위, 및 저해 RNA 표적 부위를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 추가로, 일정한 정도로, 특정 실시태양에서, 유도성 발현을 위한 조절 요소는 폴리뉴클레오타이드 발현의 지속기간을 제어하는 데 기여할 수 있다.

[0373] 본 명세서에서 사용되는 용어 "폴리뉴클레오타이드 변이체" 및 "변이체" 등은 본 명세서에서 이후에 정해지는 엄격 조건 하에 기준 서열과 혼성화되는 기준 폴리뉴클레오타이드 서열 또는 폴리뉴클레오타이드와의 실질적인 서열 동일성을 나타내는 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 이들 용어는 또한 적어도 하나의 뉴클레오타이드의 첨가, 결실, 치환 또는 변형에 의해 기준 폴리뉴클레오타이드와 구별되는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 따라서, 용어 "폴리뉴클레오타이드 변이체" 및 "변이체"는 하나 이상의 뉴클레오타이드가 첨가되거나 결실되거나, 변형되거나, 상이한 뉴클레오타이드로 대체되는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다. 이와 관련하여, 돌연변이, 첨가, 결실 및 치환을 포함하는 특정 변형은 기준 폴리뉴클레오타이드로 이루어질 수 있으며, 이에 의해 변경된 폴리뉴클레오타이드는 기준 폴리뉴클레오타이드의 생물학적 기능 또는 활성을 보유한다는 것이 당업계에서 잘 이해된다. 특정 실시태양에서, 폴리뉴클레오타이드 또는 변이체는 본 명세서에 기재되거나 당업계에 공지된 기준 서열에 대해 (이 사이의 모든 범위와 하위 범위 포함하는) 적어도 또는 약 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%,76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%,85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 가지며, 전형적으로 변이체는 달리 언급되지 않는 한 기준 서열의 적어도 하나의 생물학적 활성을 유지한다.

[0374] 한 실시태양에서, 폴리뉴클레오타이드는 엄격 조건하에 표적 핵산 서열에 혼성화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. "엄격한 조건"하에 혼성화하는 것은 서로에 대해 적어도 60% 동일한 뉴클레오타이드 서열이 혼성화된 채로 남아있는 혼성화 프로토콜을 기재한다. 일반적으로, 엄격한 조건은 정해진 이온 강도 및 pH에서 구체적 서열에 대해 열 융점(Tm)보다 약 5℃ 더 낮아지도록 선택된다. Tm은 표적 서열에 상보성인 프로브의 50%가 평형상

태에서 표적 서열에 혼성화하는 (정해진 이온 강도, pH 및 핵산 농도 하의) 온도이다. 표적 서열은 Tm에서 일반적으로 과량으로 존재하기 때문에, 프로브의 50%는 평형상태에서 점유된다.

[0375] "서열 동일성"의 설명 또는, 예를 들어, 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "에 대해 50% 동일한"을 포함하여, 서열이 비교창에 걸쳐 뉴클레오타이드 간의 기초 또는 아미노산 간의 기초에 대해 동일한 정도를 지칭한다. 따라서, "서열 동일성의 백분율"은 비교창에 걸쳐 두 최적으로 정렬된 서열을 비교하고, 동일한 핵산 염기(예를 들어, A, T, C, G, I) 또는 동일한 아미노산 잔기(예를 들어, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys 및 Met)가 서열 둘 다에서 생기는 위치 수를 결정하여 매칭된 위치의 수를 얻고, 매칭된 위치의 수를 비교창에서의 위치의 총 수(즉, 창의 크기)로 나눈 다음에, 결과에 100을 곱하여서 서열 동일성 백분율을 얻음으로써 계산될 수 있다. 2 이상의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 사이의 서열 관계를 기재하기 위해 사용되는 용어는 "기준 서열", "비교창", "서열 동일성", "서열 동일성의 백분율" 및 "실질적인 동일성"을 포함한다. "기준 서열"은 뉴클레오타이드 및 아미노산 잔기를 포함하는 적어도 12개이지만, 빈번하게는 15 내지 18개, 종종은 적어도 25개의 단량체 단위 길이이다. 두 폴리뉴클레오타이드는 각각 (1) 두 폴리뉴클레오타이드 간에 유사한 서열(즉, 완전한 폴리뉴클레오타이드 서열의 일부만), 및 (2) 두 폴리뉴클레오타이드 간에 분기하는 서열을 포함할 수 있기 때문에, 두 (이상) 폴리뉴클레오타이드 사이의 서열 비교는 서열 유사성의 국소 영역을 확인하고 비교하기 위해 "비교창"에 걸쳐 두 폴리뉴클레오타이드의 서열을 비교함으로써 전형적으로 수행된다. "비교창"은 두 서열이 최적으로 정렬된 후에 서열이 동일한 수의 인접한 위치의 기준 서열과 비교되는 적어도 6개, 보통 약 50 내지 약 100, 더 보통으로는 약 100 내지 약 150개의 인접한 위치의 개념적 세그먼트를 지칭한다. 비교창은 두 서열의 최적의 정렬을 위해 기준 서열(첨가 또는 결실을 포함하지 않음)에 비해 약 20% 이하의 첨가 또는 결실(즉, 갭)을 포함할 수 있다. 비교창을 정렬시키기 위한 서열의 최적의 정렬은 알고리즘의 컴퓨터 실행에 의해(미국 위스콘신주 메디슨 사이언스 드라이브 575에 소재한 제네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group)의 위스콘신 제네틱스 소프트웨어 패키지 릴리즈(Wisconsin Genetics Software Package Release) 7.0에서 GAP, BESTFIT, FASTA 및 TFASTA) 또는 선택되는 임의의 다양한 방법에 의해 생성된 검사 및 최적의 정렬(즉, 비교창에 걸쳐 가장 높은 상동성 백분율을 초래함)에 의해 수행될 수 있다. 또한, 예를 들어, Altschul *et al.*, 1997, *Nucl. Acids Res.* 25:3389에 개시된 바와 같은 프로그램의 BLAST 패밀리가 언급될 수 있다. 서열 분석의 상세한 논의는 Unit 19.3 of Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Chapter 15에서 찾을 수 있다.

[0376] 본 명세서에서 사용되는 "분리된 폴리뉴클레오타이드"는 천연-유래 상태에서 플랭킹하는 서열로부터 정제된 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어, 단편에 정상적으로 인접하는 서열로부터 제거된 DNA 단편을 지칭한다. 특정 실시태양에서, "분리된 폴리뉴클레오타이드"는 천연에서 존재하지 않고 인간의 손으로 만들어진 상보성 DNA(cDNA), 재조합 DNA, 또는 다른 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다.

[0377] 폴리뉴클레오타이드의 배향을 기술하는 용어는 5'(정상적으로는 유리 인산염기를 갖는 폴리뉴클레오타이드 말단) 및 3'(정상적으로는 유리 하이드록실(OH) 기를 갖는 폴리뉴클레오타이드의 말단)을 포함한다. 폴리뉴클레오타이드 서열은 5'에서 3' 배향 또는 3'에서 5' 배향으로 주석이 달릴 수 있다. DNA 및 mRNA에 대해, 5'에서 3' 가닥은 "센스", "플러스" 또는 "암호화" 가닥으로 표기되는데, 이의 서열이 전-전령(premRNA)의 서열과 동일하기 때문이다[DNA에서의 티민(T)을 대신하는 RNA에서의 유라실(U)을 제외]. DNA 및 mRNA에 대해, RNA 중합효소에 의해 전사될 가닥인 상보성 3'에서 5' 가닥은 "주형", "안티센스", "마이너스" 또는 "비암호화" 가닥으로서 표기된다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "역배향"은 3'에서 5' 배향으로 기재되는 5'에서 3' 서열 또는 5'에서 3' 배향으로 기재되는 3'에서 5' 서열을 지칭한다.

[0378] 용어 "플랭킹된"은 서열에 대해 상류의 폴리뉴클레오타이드 서열 및/또는 하류의 폴리뉴클레오타이드 서열, 즉, 5' 및/또는 3' 사이에 있는 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 예를 들어, 두 다른 요소(예를 들어, ITR)에 의해 "플랭킹된" 서열은 하나의 요소가 서열에 대해 5' 위치되고, 다른 하나의 요소는 서열에 대해 3' 위치된다는 것을 나타내지만; 그러나, 그 사이의 개재 서열일 수 있다.

[0379] 용어 "상보적" 및 "상보성"은 염기쌍 규칙에 의해 관련된 폴리뉴클레오타이드(즉, 뉴클레오타이드의 서열)를 지칭한다. 예를 들어, DNA 서열 5' A G T C A T G 3'의 상보성 가닥은 3' T C A G T A C 5'이다. 후자의 서열은 좌측에 대해 5' 단부 및 우측에 대해 3' 단부를 갖는 역상보체, 즉, 5' C A T G A C T 3'로서 종종 기재된다. 역상보체와 동일한 서열은 회문식 서열이 언급된다. 상보성은 핵산 염기의 일부만이 염기쌍 규칙에 따라 매칭되는 "부분적"일 수 있다. 또는 핵산 사이에 "완전한" 또는 "전체" 상보성이 있을 수 있다.

[0380] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 용어 "핵산 카세트" 또는 "발현 카세트"는 폴리뉴클레오타이드로부터의 하나

이상의 RNA를 발현시키는 데 충분한 더 큰 폴리뉴클레오타이드 내의 폴리뉴클레오타이드 서열, 예컨대 벡터를 지칭한다. 발현된 RNA는 단백질로 번역되고, 절단 및/또는 분해를 위해 다른 폴리뉴클레오타이드 서열을 표적화하는 가이드 RNA 또는 저해 RNA로서 작용할 수 있다. 한 실시태양에서, 핵산 카세트는 하나 이상의 관심 대항의 폴리뉴클레오타이드(들)를 함유한다. 다른 실시태양에서, 핵산 카세트는 관심 대상의 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드(들)에 작업 가능하게 연결된 하나 이상의 발현 제어 서열을 함유한다. 폴리뉴클레오타이드는 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드(들)를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "관심 대상의 폴리뉴클레오타이드"는 폴리펩타이드 또는 융합 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 본 명세서에 고려된 바와 같은 저해 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어, LGIC, 및 서브유닛 및 이들의 뮤테인의 전사를 위한 주형으로서 작용하는 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 특정 실시태양에서, 관심 대상의 폴리뉴클레오타이드는 한 가지 이상의 효소적 활성, 예컨대 뉴클레아제 활성 및/또는 염색질 리모델링 또는 후성적 변형 활성을 갖는 폴리펩타이드 또는 융합 폴리펩타이드를 암호화한다.

[0381] 벡터는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 이상의 핵산 카세트를 포함할 수 있다. 본 발명의 바람직한 실시태양에서, 핵산 카세트는 조작된 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어, LGIC, 및 서브유닛 및 이들의 뮤테인에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 발현 제어 서열(예를 들어, 뉴런 세포에서 작동 가능한 프로모터 또는 인핸서)을 포함한다. 카세트는 단일 단위로서 다른 폴리뉴클레오타이드 서열, 예를 들어, 플라스미드 또는 바이러스 벡터로부터 제거되거나 삽입될 수 있다.

[0382] 한 실시태양에서, 본 명세서에 고려된 폴리뉴클레오타이드는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9개 이상의 핵산 카세트를 포함하며, 이의 임의의 수 또는 조합은 동일 또는 반대 배향일 수 있다.

[0383] 게다가, 유전자 암호의 축중의 결과로서, 본 명세서에 고려된 바와 같은 폴리펩타이드, 또는 이의 변이체의 단편을 암호화할 수 있는 다수의 뉴클레오타이드 서열이 있다는 것이 당업자에 의해 인식될 것이다. 이들 폴리뉴클레오타이드의 일부는 임의의 천연 유전자의 뉴클레오타이드에 대해 최소 상동성을 보유한다. 그럼에도 불구하고, 코돈 출현 빈도의 차이에 기인하여 변하는 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어, 인간 및/또는 영장류 코돈 선택을 위해 최적화된 폴리뉴클레오타이드는 본 발명에 의해 구체적으로 고려된다. 한 실시태양에서, 특정 대립유전자 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드가 제공된다. 대립유전자는 하나 이상의 돌연변이, 예컨대 뉴클레오타이드의 결실, 첨가 및/또는 치환의 결과로서 변경되는 내인성 폴리뉴클레오타이드 서열이다.

[0384] 일부 실시태양에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 조작된 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 일부 실시태양에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 키메라 조작된 LGIC 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

[0385] 일부 실시태양에서, 본 발명은 SEQ ID NOs: 58-78 및 88 중 하나의 아미노산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 조작된 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 일부 실시태양에서, 본 발명은 SEQ ID NOs: 58-78 및 88 중 하나의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다. 본 발명은 SEQ ID NOs: 58-78 및 88 중 하나의 아미노산 서열로 이루어진 조작된 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 제공한다.

[0386] **F. 벡터**

[0387] 본 발명의 일부 양태에서, 핵산 분자, 즉, 조작된 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드는 대상에게 전달된다. 일부 경우에, 조작된 수용체를 암호화하는 핵산 분자는 벡터에 의해 대상에게 전달된다. 다양한 실시태양에서, 벡터는 본 명세서에 고려된 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 용어 "벡터"는 다른 핵산 분자를 전달하거나 수송할 수 있는 핵산 분자를 지칭하기 위해 본 명세서에서 사용된다. 전달된 폴리뉴클레오타이드는 일반적으로, 벡터 핵산 분자에 연결되고, 예를 들어, 삽입된다. 벡터는 세포에서 자율적 복제를 지시하는 서열을 포함할 수 있거나, 숙주 세포 DNA 내로 통합을 가능하게 하는데 충분한 서열을 포함할 수 있다. 벡터는 유기체, 세포 또는 세포 성분에 표적 폴리뉴클레오타이드를 전달할 수 있다. 일부 경우에, 벡터는 발현 벡터이다. 본 명세서에서 사용되는 "발현 벡터"는 벡터, 예를 들어, 이에 혼입된 폴리뉴클레오타이드의 발현뿐만 아니라 복제를 촉진시킬 수 있는 플라스미드를 지칭한다. 전형적으로, 발현될 핵산 서열은 시스-작용성 조절 서열, 예를 들어, 프로모터 및/또는 인핸서 서열에 작동 가능하게 연결되고, 프로모터 및/또는 인핸서에 의해 전사 조절 제어 처리된다. 특정 경우에, 벡터는 본 발명의 조작된 수용체를 암호화하는 핵산 분자를 대상에게 전달하는 데 사용된다.

[0388] 특정 실시태양에서, 발현 카세트 또는 조작된 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 뉴런 세포 내로 도입

하는 데 적합한 임의의 벡터가 사용될 수 있다. 적합한 벡터의 예시적인 예는 플라스미드(예를 들어, DNA 플라스미드 또는 RNA 플라스미드), 트랜스포존, 코스미드, 박테리아 인공 염색체 및 바이러스 벡터를 포함한다. 일부 경우에, 벡터는, 예를 들어, 플라스미드, BAC, PAC, YAC, 코스미드, 포스미드 등에 대한 원형 핵산이다. 일부 경우에, 원형 핵산 분자는 조작된 수용체를 암호화하는 핵산 분자를 대상에게 전달하기 위해 이용될 수 있다. 예를 들어, 조작된 수용체를 암호화하는 플라스미드 DNA 분자는 대상의 세포 내로 도입될 수 있고, 이에 의해 조작된 수용체를 암호화하는 DNA 서열은 mRNA로 전사되고, mRNA "전령"은 단백질 산물로 번역된다. 원형 핵산 벡터는 일반적으로 표적 단백질의 발현을 조절하는 조절 요소를 포함할 것이다. 예를 들어, 원형 핵산 벡터는 다수의 프로모터, 인핸서, 터미네이터, 스플라이스 신호, 복제기점, 개시 신호 등을 포함할 수 있다.

[0389] 일부 경우에, 벡터는 레플리콘을 포함할 수 있다. 레플리콘은 자기-복제할 수 있는 임의의 핵산 분자일 수 있다. 일부 경우에, 레플리콘은 바이러스로부터 유래된 RNA 레플리콘이다. 알파바이러스, 피코르나바이러스, 플라비바이러스, 코로나바이러스, 페스티바이러스, 루비바이러스, 칼시바이러스 및 헤파시바이러스를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 다양한 적합한 바이러스(예를 들어, RNA 바이러스)가 이용 가능하다.

[0390] 일부 실시태양에서, 벡터는 비-바이러스 벡터이다. "비-바이러스 벡터"는 바이러스 캡시드 또는 외피, 예를 들어, 지질 나노입자(음이온성(음으로 하전), 중성, 또는 양이온성(양으로 하전)), 중금속 나노입자, 폴리머-기반 입자, 플라스미드 DNA, 미니서클 DNA, 미니벡터 DNA, ccDNA, 합성 RNA, 엑소좀 등을 포함하지 않는 임의의 전달 비히클을 의미한다. 비-바이러스 벡터는 당업계에 잘 이해되는 바와 같은 임의의 적합한 방법, 예를 들어, 나노입자 전달, 유전자총법, 전기천공법, 음파처리, 또는 미량주사법에 의해 전달될 수 있다. 예를 들어, Chen et al. Mol. Therapy, Methods and Clinical Development. 2016 Jan; Vol 3, issue 1; 및 Hardy, CE et al. Genes (Basel). 2017 Feb; 8(2): 65 참조.

[0391] 다른 실시태양에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. "바이러스 벡터"는 관심 대상의 RNA 또는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 주변의 바이러스 캡시드 또는 외피를 포함하는 전달 비히클을 의미한다. 일부 경우에, 바이러스 벡터는 복제-결함 바이러스로부터 유래된다. 본 발명의 핵산 분자를 대상에게 전달하기에 적합한 바이러스 벡터의 비제한적 예는 아데노바이러스, 레트로바이러스(예를 들어, 렌티바이러스), 아데노-관련 바이러스(AAV) 및 단순포진-1(HSV-1)로부터 유래된 것을 포함한다. 적합한 바이러스 벡터의 예시적 예는 레트로바이러스 벡터(예를 들어, 렌티바이러스 벡터), 헤르페스 바이러스 기반 벡터 및 파보바이러스 기반 벡터(예를 들어, 아데노-관련 바이러스(AAV) 기반 벡터, AAV-아데노바이러스 키메라 벡터 및 아데노바이러스-기반 벡터)를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0392] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 용어 "파보바이러스"는 자율적으로 복제하는 파보바이러스 및 디펜도바이러스를 포함하는 모든 파보바이러스를 포함한다. 자율적 파보바이러스는 파보바이러스(*Parvovirus*), 에리트로바이러스(*Erythrovirus*), 덴소바이러스(*Densovirus*), 이테라바이러스(*Iteravirus*) 및 콘트라바이러스(*Contravirus*) 속의 구성원을 포함한다. 예시적인 자율적 파보바이러스는 마우스 미니트 바이러스(mouse minute virus), 소 파보바이러스, 개 파보바이러스, 닭 파보바이러스, 고양이 범백혈구감소증 바이러스, 고양이 파보바이러스, 거위 파보바이러스 및 B19 바이러스를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 다른 자율적 파보바이러스는 당업자에게 공지되어 있다. 예를 들어, Fields *et al.*, 1996 *Virology*, volume 2, chapter 69 (3d ed., Lippincott-Raven Publishers) 참조.

[0393] 데펜도바이러스(*Dependovirus*)는 AAV 1형, AAV 2형, AAV 3형, AAV 4형, AAV 5형, AAV 6형, AAV 7형, AAV 8형, AAV 9형, AAV rh10형, 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV 및 양 AAV을 포함하나 이에 제한되지 않는 아데노-관련 바이러스(AAV)를 포함한다.

[0394] 바람직한 실시태양에서, 벡터는 AAV 벡터이다. 특정 경우에, 바이러스 벡터는 AAV5, AAV-6 또는 AAV-9 벡터이다.

[0395] 모든 공지된 AAV 혈청형의 게놈 조직화는 유사하다. AAV의 게놈은 길이가 약 5,000개의 뉴클레오타이드(nt) 미만인 선형, 단일-가닥 DNA 분자이다. 역위 말단 반복체(Inverted terminal repeat: ITR)는 비구조적 복제(Rep) 단백질 및 구조적(VP) 단백질에 대한 독특한 암호화 뉴클레오타이드 서열에 플랭킹한다. VP 단백질(VP1, -2 및 -3)은 캡시드를 형성하며, 바이러스의 향성에 기여한다. 말단의 145nt ITR은 자기-상보성이며, T-형 헤어핀을 형성하는 활동적으로 안정한 분자간 이중가닥이 형성될 수 있도록 조직화된다. 이들 헤어핀 구조는 바이러스 DNA 복제를 위한 기점으로서 작용하여, 세포의 DNA 중합효소 복합체에 대한 프라이머로서 작용한다. 포유류 세포에서 야생형(wt) AAV 감염 후에 Rep 유전자는 발현되고, 바이러스 게놈의 복제에서 작용한다.

[0396] 일부 경우에, 바이러스 벡터의 외부 단백질 "캡시드", 예를 들어, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 또는 AAV10는 천연에서 생긴다. 특정 경우에, 캡시드는 천연에서 존재하지 않는 특정 독특한 특징, 예컨대 향성, 증가된 형질도입 효율 또는 면역 침윤을 갖도록 합성에 의해(예를 들어, 유도된 진화 또는 합리적 설계를 통해) 조작된다. 합리적으로 디자인된 캡시드의 예는 VP3 바이러스 캡시드 단백질 상에서의 하나 이상의 표면-노출 타이로신(Y), 세린(S), 트레오닌(T) 및 라이신(K) 잔기의 돌연변이이다. VP3 캡시드 단백질이 합성에 의해 조작되고 본 명세서에 제공된 조성물 및 방법과 함께 사용될 수 있는 바이러스 벡터의 비제한적 예는 AAV1(Y705+731F+T492V), AAV2(Y444+500+730F+T491V), AAV3(Y705+731F), AAV5(Y436+693+719F), AAV6(Y705+731F+T492V), AAV8(Y733F), AAV9(Y731F) 및 AAV10(Y733F)을 포함한다. 유도된 진화를 통해 조작되고 본 명세서에 제공된 조성물 및 방법과 함께 사용될 수 있는 바이러스 벡터의 비제한적 예는 AAV-7m8 및 AAV-ShH10을 포함한다. 일부 실시태양에서, 바이러스 벡터는 AAV6 캡시드 단백질의 T492, Y705, Y731 또는 이들의 임의의 조합에 상응하는 하나 이상의 위치에서 아미노산 돌연변이를 포함하는 AAV 캡시드 단백질을 포함하고, 여기서 AAV 캡시드 단백질은 혈청형 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, 또는 다른 AAV 혈청형이다. 일부 실시태양에서, 하나 이상의 위치는 2개 이상의 위치, 2개의 위치 또는 3개의 위치이다. 일부 실시태양에서, 바이러스 벡터는 AAV6 캡시드 단백질의 T492V, Y705F 또는 Y731F 또는 이들의 임의의 조합에 상응하는 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하는 AAV 캡시드 단백질을 포함하고, 여기서 AAV 캡시드 단백질은 혈청형 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, 또는 다른 AAV 혈청형이다. 일부 실시태양에서, 하나 이상의 치환은 2개 이상의 치환, 2개의 치환 또는 3개의 치환이다.

[0397] 일부 실시태양에서, 바이러스 벡터는 Y693 및 Y719로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 위치에서 돌연변이를 포함하는 AAV5 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 실시태양에서, 바이러스 벡터는 Y693F 및 Y719F로부터 선택되는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 AAV5 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 실시태양에서, 바이러스 벡터는 아미노산 돌연변이 Y693F+Y719F를 포함하는 AAV5 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 실시태양에서, AAV5 캡시드 단백질은 SEQ ID NO: 79에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다.

[0398] 일부 실시태양에서, 바이러스 벡터는 T492, Y705 및 Y731로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 위치에서 돌연변이를 포함하는 AAV6 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 실시태양에서, 바이러스 벡터는 T492V, Y705F 및 Y731F로부터 선택되는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 AAV6 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 실시태양에서, 바이러스 벡터는 아미노산 돌연변이 T492V+Y705F+Y731F를 포함하는 AAV6 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 실시태양에서, AAV6 캡시드 단백질은 SEQ ID NO: 80에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다.

[0399] 일부 실시태양에서, 바이러스 벡터는 T492, Y705 및 Y731로부터 선택되는 하나 이상의 아미노산 위치에서 돌연변이를 포함하는 AAV9 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 실시태양에서, 바이러스 벡터는 T492V, Y705F 및 Y731F로부터 선택되는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는 AAV9 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 실시태양에서, 바이러스 벡터는 아미노산 돌연변이 T492V+Y705F+Y731F를 포함하는 AAV9 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 실시태양에서, AAV9 캡시드 단백질은 SEQ ID NO: 81에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어진다.

[0400] 일부 실시태양에서, AAV 캡시드 단백질(또는 본 발명의 돌연변이체)을 포함하는 바이러스 벡터는 대상에서 세포 또는 뉴런의 하위 집단에 조작된 수용체의 표적화된 발현에 기여한다. 일부 실시태양에서, 뉴런은 통각수용체이다.

[0401] 본 명세서의 "재조합 파보바이러스 또는 AAV 벡터"(또는 "rAAV 벡터")는 하나 이상의 ITR에 의해 플랭킹되는 본 명세서에 고려된 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 지칭한다. 이러한 폴리뉴클레오타이드는 ITR에 대해 "이종성"인 것으로 언급되는데, 이러한 조합이 천연에서 보통 일어나지 않기 때문이다. 이러한 rAAV 벡터는 AAV rep 및 cap 유전자 산물(즉, AAV Rep 및 Cap 단백질)을 발현시키는 곤충 숙주 세포에 존재할 때, 복제되고 감염성 바이러스 입자에 패키징될 수 있다. rAAV 벡터가 더 거대한 핵산 구조체에(예를 들어, 염색체에 또는 다른 벡터, 예컨대 플라스미드 또는 클로닝 또는 형질감염을 위해 사용되는 바큘로바이러스에서) 혼입될 때, rAAV 벡터는 전형적으로 AAV 패키징 기능 및 필요한 헬퍼 기능의 존재 하에 복제 및 캡슐화에 의해 "구조(rescued)"될 수 있는 "프로-벡터"로서 지칭된다.

[0402] 특정 실시태양에서, 임의의 AAV ITR은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15 및 AAV16으로부터의 ITR을 포함하는 AAV 벡터에서 사용될 수 있다. 하나의 바람직

한 실시태양에서, 본 명세서에 고려된 AAV 벡터는 하나 이상의 AAV2 ITR을 포함한다.

[0403] 두 ITR을 포함하는 rAAV 벡터는 약 4.4kB의 페이로드(payload) 용량을 가진다. 자기-상보성 rAAV 벡터는 제 3의 ITR을 함유하고, 본 명세서에 고려된 폴리뉴클레오타이드에 대해 약 2.1kB만을 남기는 벡터의 재조합 부분의 2개 가닥을 패키징한다. 한 실시태양에서, AAV 벡터는 scAAV 벡터이다.

[0404] rAAV의 패키징 용량(약 9kB)의 대략 2배인 확장된 패키징 용량은 이중 rAAV 벡터 전략을 이용하여 달성되었다. 본 명세서에 고려된 rAAV를 생성하는 데 유용한 이중 벡터 전략은 스플라이싱(트랜스-스플라이싱), 상동성 재조합(중복), 또는 둘의 조합(혼성체)을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 이중 AAV 트랜스-스플라이싱 전략에서, 스플라이스 공여자(SD) 신호는 5'-절반 벡터의 3' 단부에 위치되고, 스플라이스 수용자(SA) 신호는 3'-절반 벡터의 5' 단부에 위치된다. 두 절반의 이중 AAV 벡터 및 역위 말단 반복체(ITR)-매개 헤드-투-테일 콘카타머화(concatemerization)에 의한 동일 세포의 공동 감염 시, 트랜스-스플라이싱은 성숙 mRNA 및 전체 크기 단백질의 생성을 초래한다(Yan *et al.*, 2000). 트랜스-스플라이싱은 근육 및 망막에서 거대 유전자를 발현시키기 위해 성공적으로 사용되었다(Reich *et al.*, 2003; Lai *et al.*, 2005). 대안적으로, 이중 AAV 벡터에 함유된 거대 이식유전자 발현 카세트의 두 절반은 상동성 재조합에 의해 단일 거대 게놈의 재구성을 매개하는 상동성 중복 서열(5'-절반 벡터의 3' 말단에서 그리고 3'-절반 벡터의 5' 말단에서, 이중 AAV 중복)을 함유할 수 있다(Duan *et al.*, 2001). 이 전략은 이식유전자 중복 서열의 재조합 특성에 따른다(Ghosh *et al.*, 2006). 제3의 이중 AAV 전략(혼성체)은 트랜스-스플라이싱 벡터에 외인성 유전자(즉, 알칼리성 포스파타제; Ghosh *et al.*, 2008, Ghosh *et al.*, 2011))로부터의 고도로 재조합성인 영역을 첨가하는 것에 기반한다. 첨가된 영역은 5'-절반 벡터에서 SD 신호 하류에 위치되고, 이중 AAV 사이의 재조합을 증가시키기 위해 3'-절반 벡터에서 SA 신호의 상류에 위치된다.

[0405] "혼성 AAV" 또는 "혼성 rAAV"는 상이한 AAV 혈청형의(바람직하게는, 하나 이상의 AAV ITR과 상이한 혈청형의) 캡시드로 패키징된 rAAV 게놈을 지칭하며, 다르게는 위형 rAAV로서 지칭될 수 있다. 예를 들어, rAAV 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 16형 게놈은 AAV 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 또는 16형 캡시드 또는 이의 변이체 내에서 캡슐화될 수 있으며, 단, AAV 캡시드 및 게놈(바람직하게는, 하나 이상의 AAV ITR)은 상이한 혈청형을 가진다. 특정 실시태양에서, 위형 rAAV 입자는 "x/y" 형인 것으로 지칭될 수 있으며, 여기서 "x"는 ITR의 공급원을 나타내고, "y"는 캡시드의 혈청형을 나타내며, 예를 들어, 2/5 rAAV 입자는 AAV2로부터의 ITR 및 AAV6으로부터의 캡시드를 가진다.

[0406] "숙주 세포"는 본 발명의 재조합 벡터 또는 폴리뉴클레오타이드로 생체내, 생체외 또는 시험관내에서 형질감염되거나, 감염되거나 형질도입된 세포를 포함한다. 숙주 세포는 바이러스 생성 세포 및 바이러스 벡터로 감염된 세포를 포함할 수 있다. 특정 실시태양에서, 생체내 숙주 세포는 본 명세서에 고려된 바이러스 벡터로 감염된다. 특정 실시태양에서, 용어 "표적 세포"는 숙주 세포와 상호 호환적으로 사용되고, 목적하는 세포 유형의 감염 세포를 지칭한다.

[0407] 고역가 AAV 제제는 당업계에 공지된 기법을 이용하여, 예를 들어, 미국 특허 제5,658,776호; 제6,566,118호; 제6,989,264호; 및 제6,995,006호; 미국 특허 제2006/0188484호; WO98/22607; WO2005/072364; 및 WO/1999/011764; 및 Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols, ed. Machida, Humana Press, 2003; Samulski et al., (1989) J. Virology 63, 3822; Xiao et al., (1998) J. Virology 72, 2224; Inoue et al., (1998) J. Virol. 72, 7024에 기술된 바와 같이 당업계에 공지된 기법을 이용하여 생성될 수 있다. 위형 AAV 벡터를 생성하는 방법(예를 들어, WO 00/28004)뿐만 아니라 생체내 투여 시 이들의 면역원성을 감소시키기 위한 AAV 벡터의 다양한 변형 또는 제형화가 또한 보고되었다(예를 들어, WO 01/23001; WO 00/73316; WO 04/112727; WO 05/005610; WO 99/06562).

[0408] **G. 약학적 조성물**

[0409] 일부 실시태양에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 조작된 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 조성물 또는 본 명세서에 기술된 조작된 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 제공한다. 일부 실시태양에서, 조성물은 본 명세서에 기술된 리간드를 더 포함한다. 약학적 제제는 조작된 수용체를 암호화하는 주제 폴리뉴클레오타이드(RNA 또는 DNA), 주제 조작된 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드(RNA 또는 DNA)를 운반하는 벡터, 또는 약학적으로 허용 가능한 비히클에 존재하는 리간드를 포함한다. 일부 실시태양에서, 본 발명은 본 명세서에 기술된 조작된 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 본 명세서에 기술된 조작된 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 포함하는 제 1 조성물, 및 본 명세서에 기술된 리간드를 포함하는 제 2 조성물을 제공한다.

[0410] "약학적으로 허용 가능한 비히클"은 미연방 정부의 규제 기관에 의해 승인되거나 미국 약전 또는 인간과 같은 포유류에서 사용하기 위한 다른 일반적으로 인식되는 약전에 열거된 비히클일 수 있다. 용어 "비히클"은 포유류에 대한 투여를 위해 본 발명의 화합물과 함께 제제화되는 희석제, 아쥬반트, 부형제 또는 담체를 지칭한다. 이러한 약학적 비히클은 석유, 동물, 식물 또는 합성 유래의 오일, 예컨대 땅콩유, 대두유, 광유, 참깨유 등을 포함하는 오일 및 물과 같은 액체일 수 있다. 약학적 비히클은 식염수, 아카시아검, 젤라틴, 전분 페이스트, 활석, 케라틴, 콜로이드성 실리카, 유레아 등일 수 있다. 추가로, 보조제, 안정제, 증점제, 윤활제 및 착색제가 사용될 수 있다. 포유류에게 투여될 때, 본 발명의 화합물 및 조성물 및 약학적으로 허용 가능한 비히클, 부형제 또는 희석제는 멸균일 수 있다. 일부 예에서, 본 발명의 화합물이 정맥내로 투여될 때 비히클로서 수성 매질, 예컨대 물, 식염수 용액, 및 수성 덱스트로스 및 글리세롤 용액이 사용된다.

[0411] 약학적 조성물은 캡슐, 정제, 알약, 펠릿, 로젠지, 분말, 과립, 시럽, 엘릭시르, 용액, 현탁액, 에멀션, 좌약 또는 이들의 지속-방출 제형의 형태, 또는 포유류에 대한 투여에 적합한 임의의 다른 형태를 취할 수 있다. 일부 예에서, 약학적 조성물은 인간에 대한 경구 또는 정맥내 투여에 적합한 약학적 조성물로서 일상적인 절차에 따라 투여를 위해 제형화된다. 적합한 약학적 비히클 및 이의 제제화 방법의 예는 본 명세서에 참고로 포함되는 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Alfonso R. Gennaro ed., Mack Publishing Co. Easton, Pa., 19th ed., 1995, Chapters 86, 87, 88, 91 및 92에 기술되어 있다.

[0412] 부형제의 선택은 특정 벡터에 의해서 뿐만 아니라 조성물을 투여하기 위해 사용되는 특정 방법에 의해 부분적으로 결정될 것이다. 따라서, 본 발명의 약학적 조성물의 매우 다양한 적합한 제제가 있다.

[0413] 일부 실시태양에서, 약학적 조성물은 피하 투여용으로 제제화된다. 일부 실시태양에서, 약학적 조성물은 비경구 투여용으로 제제화된다. 일부 실시태양에서, 약학적 조성물은 정맥내 투여용으로 제제화된다. 일부 실시태양에서, 약학적 조성물은 근육내 투여용으로 제제화된다. 일부 실시태양에서, 약학적 조성물은 피내 투여용으로 제제화된다. 일부 실시태양에서, 약학적 조성물은 복강내 투여용으로 제제화된다. 일부 실시태양에서, 약학적 조성물은 경구 투여용으로 제제화된다. 일부 실시태양에서, 약학적 조성물은 주사용으로 제제화된다. 일부 실시태양에서, 약학적 조성물은 두개내 투여용으로 제제화된다. 일부 실시태양에서, 약학적 조성물은 척수강내 투여용으로 제제화된다. 일부 실시태양에서, 약학적 조성물은 비강내 투여용으로 제제화된다. 일부 실시태양에서, 약학적 조성물은 신경절내 투여용으로 제제화된다. 일부 실시태양에서, 약학적 조성물은 척추내 투여용으로 제제화된다. 일부 실시태양에서, 약학적 조성물은 뇌실내 투여용으로 제제화된다. 일부 실시태양에서, 약학적 조성물은 대조 투여용으로 제제화된다. 일부 실시태양에서, 약학적 조성물은 신경내 투여용으로 제제화된다. 일부 실시태양에서, 약학적 조성물은 뉴런 세포로의 전달을 위해 제제화된다.

[0414] 예를 들어, 벡터는 수성 또는 비수성 용매, 예컨대 식물성 또는 다른 유사한 오일, 합성 지방족 산 글리세라이드, 보다 고차의 지방족 산의 에스터 또는 프로필렌 글리콜에서; 필요하다면, 통상적인 첨가제, 예컨대 가용화제, 등장제, 현탁제, 유화제, 안정제 및 보존제와 함께 이들을 용해시키거나, 현탁시키거나, 유화시킴으로써 주사용 제제로 제제화될 수 있다.

[0415] 다른 예로서, 벡터는 (a) 액체 용액, 예컨대 물 또는 식염수와 같은 희석제에 용해된 유효량의 화합물; (b) 고체 또는 과립으로서, 사전결정된 양의 활성 성분을 각각 함유하는 캡슐, 사쉐 또는 정제; (c) 적절한 액체 중의 현탁액; 및 (d) 적합한 에멀션을 포함하는 경구 투여에 적합한 제제로 제제화될 수 있다. 정제 형태는 락토오스, 만니톨, 옥수수 전분, 감자 전분, 미정질 셀룰로스, 아카시아, 젤라틴, 콜로이드성 이산화규소, 크로스카멜로스 나트륨, 활석, 스테아르산마그네슘, 스테아르산 및 다른 부형제, 착색제, 희석제, 완충제, 보습제, 보존제, 향미제 및 약학적으로 적합한 부형제 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 박하 드롭스 제형은 향미제, 일반적으로 수크로오스 및 아카시아 또는 트라가칸트에 활성 성분뿐만 아니라 활성 성분 이외에 본 명세서에 기술된 부형제를 함유하는 젤라틴 및 글리세린, 또는 수크로오스 및 아카시아와 같은 불활성 베이스, 에멀젼, 겔 등을 포함하는 향정을 포함할 수 있다.

[0416] 다른 예로서, 본 발명의 주제 제제는 흡입을 통해 투여되는 에어로졸 제제로 만들어질 수 있다. 이들 에어로졸 제제는 가압 허용성 추진제, 예컨대 다이클로로다이플루오로메탄, 프로판, 질소 등에 위치될 수 있다. 이들은 또한 비가압 제제에 대한, 예컨대 네뷸라이저 또는 애토마이저에서 사용하기 위한 약제로서 제제화될 수 있다.

[0417] 일부 실시태양에서, 비경구 투여에 적합한 제제는 항산화제, 완충제, 정균제 및 의도된 수용인의 혈액과 등장성인 제제를 제공하는 용질을 함유할 수 있는 수성 및 비수성, 등장성 멸균 주사 용액, 및 현탁제, 가용화제, 증점제, 안정제 및 보존제를 포함할 수 있는 수성 및 비수성 멸균 현탁액을 포함한다. 제제는 단일-용량 또는 다회-용량 밀봉 용기, 예컨대 앰플 및 바이알에서 제공될 수 있고, 사용 직전에 멸균 액체 부형제, 예를 들어,

물, 주사용수의 첨가만을 필요로 하는 냉동-건조된(동결건조된) 상태로 저장될 수 있다. 즉시 주사 용액 및 현탁액은 멸균 분말, 과립 및 이전에 기재한 종류의 정제로부터 제조될 수 있다.

[0418] 국소 투여에 적합한 제제는 활성 성분에 추가로 적절하다면 이러한 담체를 함유하는 크림, 겔, 페이스트 또는 폼(foam)으로서 제공될 수 있다. 일부 실시태양에서, 국소 제제는 구조화제, 증점제 또는 겔화제 및 완화제 또는 윤활제로부터 선택되는 하나 이상의 성분을 함유한다. 빈번하게 사용되는 구조화제는 장쇄 알코올, 예컨대 스테아릴 알코올 및 글리세릴 에터 또는 에스터 및 이들의 올리고(에틸렌 옥사이드) 에터 또는 에스터를 포함한다. 증점제 및 겔화제는, 예를 들어, 아크릴산 또는 메타크릴산의 폴리머 및 이의 에스터, 폴리아크릴아마이드, 및 천연 유래 증점제, 예컨대 한천, 카라기난, 젤라틴 및 구아검을 포함한다. 완화제의 예는 트라이글리세라이드 에스터, 지방산 에스터 및 아마이드, 왁스, 예컨대 밀랍, 경랍, 또는 카나우바 왁스, 인지질, 예컨대 레시틴, 및 스테롤 및 이들의 지방산 에스터를 포함한다. 국조 제제는 다른 성분, 예를 들어, 수렴제, 향수, 색소, 피부 침투 향상제, 선스크린(즉, 자외선 차단제) 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0419] 본 발명의 화합물은 국소 투여용으로 제제화될 수 있다. 국소 투여를 위한 비히클은 다양한 형태, 예를 들어, 로션, 크림, 겔, 연고, 스틱, 스프레이 또는 페이스트 중 하나일 수 있다. 이들은 용액, 에어로졸, 에멀션, 겔 및 리포좀을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는 다양한 유형의 담체를 함유할 수 있다. 담체는, 예를 들어, 수중유 또는 유중수 베이스를 갖는 에멀션으로서 제형화될 수 있다. 에멀션에서 사용되는 적합한 소수성(유성) 성분은, 예를 들어, 식물성 오일, 동물 지방 및 오일, 합성 탄화수소, 및 폴리에스터를 포함하는 이들의 에스터 및 알코올뿐만 아니라 유기폴리실록산 오일을 포함한다. 이러한 에멀션은 또한 유화제 및/또는 계면활성제, 예를 들어, 연속상 내에서 불연속상을 분산시키고 현탁시키기 위한 비이온성 계면활성제를 포함한다.

[0420] 좌약 제제는 또한 다양한 베이스, 예컨대 유화 베이스 또는 수용성 베이스와 혼합함으로써 제공된다. 질 투여에 적합한 제제는 페서리, 탐폰, 겔, 페이스트, 폼으로서 제공될 수 있다.

[0421] 경구 또는 직장 투여를 위한 단위 제형, 예컨대 시럽, 엘릭시르 및 현탁액이 제공될 수 있으며 여기서 각각의 투여량 단위, 예를 들어, 티스푼 양, 테이블스푼 양, 정제 또는 좌약은 하나 이상의 억제제를 함유하는 사전 결정된 양의 조성물을 함유한다. 유사하게, 주사 또는 정맥내 투여를 위한 단위 제형은 멸균수, 정상 식염수 또는 다른 약학적으로 허용 가능한 담체 중의 용액으로서 조성물에 억제제(들)를 포함할 수 있다.

[0422] 본 명세서에서 사용되는 용어 "단위 제형"은 인간 및 동물 대상에 대한 단위 투여량으로서 적합한 물리적으로 별개의 단위를 지칭하며, 각각의 단위는 약학적으로 허용 가능한 희석제, 담체 또는 비히클과 함께 목적하는 효과를 생성하기에 충분한 양으로 계산된 사전 결정된 양의 본 발명의 화합물을 함유한다. 본 발명의 신규한 단위 제형에 대한 세부사항은 사용되는 특정 화합물 및 달성되는 효과, 및 숙주에서 각각의 화합물과 연관된 약력학에 의존한다.

[0423] 용량 수준은 특정 화합물의 작용, 전달 비히클의 특성 등에 따라 다를 수 있다. 주어진 화합물에 대한 목적하는 투여량은 다양한 수단에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0424] 본 발명과 관련하여 동물, 특히 인간에게 투여되는 용량은, 예를 들어, 이하에 더 상세하게 기재되는 바와 같이 합리적인 시간틀을 거쳐서 동물에서의 예방적 또는 치료적 반응을 달성하는 데 충분하여야 한다. 투여량은 사용되는 특정 화합물의 강도, 동물의 조건 및 동물의 체중뿐만 아니라 질병의 중증도 및 질환의 병기를 포함하는 다양한 인자에 좌우될 것이다. 용량의 크기는 특정 화합물의 투여를 수반하는 임의의 유해한 부작용의 존재, 특성 및 정도에 의해 결정될 것이다.

[0425] 약학적 제형에서, 화합물(들)은 유기 염기, 이들의 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 투여될 수 있거나, 또는 이들은 단독으로 또는 적절한 회합뿐만 아니라 다른 약학적으로 활성인 화합물과 조합하여 사용될 수 있다.

[0426] **H. 임상 적용 및 치료 방법**

[0427] 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법은 신경학적 질환 또는 장애를 치료하기 위해 이용될 수 있다. 본 발명의 일부 양태에서, 대상에서 신경학적 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 조작된 수용체를 뉴런 세포에 도입하는 단계 및 세포 활성을 제어하기에 유효한 양으로 조작된 수용체를 활성화시키는 리간드를 제공하여, 대상에서의 통증을 완화시키는 단계를 포함한다. 일부 양태에서, 본 명세서에 개시된 벡터 또는 조성물은 신경학적 질환 또는 장애를 치료하기 위한 의약의 제조에서 사용된다.

[0428] 일부 경우에, 본 발명의 방법 및 조성물은 간질을 치료하는 데 이용된다. 본 명세서에 기술된 조성물은 간질 발작을 예방하거나 제어하기 위해 사용될 수 있다. 간질 발작은 긴장성-간대성, 긴장성, 간대성, 근간대성, 결신

또는 무긴장성 발작으로서 분류될 수 있다. 일부 경우에, 본 명세서의 조성물 및 방법은 대상에 의해 경험되는 간질 발작의 수를 이 사이의 모든 범위와 하위 범위를 포함하는 약 5%, 약 10%, 약 10%, 약 15%, 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95%, 약 99% 또는 100%만큼 예방하거나 감소시킬 수 있다.

[0429] 일부 경우에, 본 발명의 방법 및 조성물은 식이장애를 치료하는 데 이용된다. 식이장애는 대상의 신체 또는 정신 건강에 부정적으로 영향을 미치는 비정상적 식이 거동에 의해 정해지는 정신 장애일 수 있다. 일부 경우에, 식이장애는 신경성 식욕부진증이다. 다른 경우에, 식이장애는 신경성 폭식증이다. 일부 경우에, 식이장애는 이식증, 반추장애, 회피성/제한적 음식 섭취 장애, 폭식 식이장애(BED), 기타 명시된 급식 및 섭식장애(OSFED), 강박성 과식, 당뇨다식증, 오소렉시아 너보사, 선택적 식이장애, 음주거식증, 임신 중 거식증, 또는 미식가 증후군이다. 일부 경우에, 조성물은 식이장애와 연관된 하나 이상의 분자의 생성을 증가시키거나 감소시키는 G-단백질 결합 수용체를 포함한다. 다른 경우에, 조성물은 식이장애와 연관된 하나 이상의 분자의 생성을 변경시키는 리간드-개폐 이온 통로를 포함한다. 식이장애와 연관된 하나 이상의 분자는 바소프레신, 부신피질자극호르몬 분비호르몬(CRH), 부신피질자극호르몬(ACTH), 코티솔, 에피네프린 또는 노르에피네프린을 포함하는 시상하부-뇌하수체-부신(HPA) 축의 분자뿐만 아니라; 세로토닌, 도파민, 뉴로펩타이드 Y, 렙틴 또는 그렐린을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0430] 일부 경우에, 조성물 및 방법은 외상 후 스트레스 장애(PTSD), 위식도 역류병(GERD), 중독(예를 들어, 알코올, 약물), 불안, 우울증, 기억 상실, 치매, 수면 무호흡증, 뇌졸중, 요실금, 기면증, 수전증, 운동장애, 심방세동, 암(예를 들어, 뇌종양), 파킨슨병, 또는 알츠하이머병을 치료하는 데 이용된다. 본 명세서의 조성물 및 방법에 의해 치료될 수 있는 신경학적 질환 또는 장애의 다른 비제한적 예는 무의지증, 실서증, 알코올 사용 장애, 난독증, 동맥류, 일과성 흑암시, 기억상실증, 근위축성 측색 경화증(ALS), 엔젤만 증후군, 실어증, 실행증, 거미막염, 아놀드키아리 기형, 아스퍼거 증후군, 운동실조, 운동실조-모세혈관확장증, 주의력 결핍 과잉행동장애, 청각 정보 처리 장애, 자폐 스펙트럼, 조울증, 벨마비, 상완신경총손상, 뇌손상, 뇌 상해, 뇌 종양, 카나반병, 카크라스 망상, 수근관 증후군, 작열통, 중추 통증 증후군, 중심뇌교수초용해, 중심핵근육병증, 뇌장애, 뇌 l 동맥류, 뇌동맥 경화증, 뇌 위축증, 피질하 경색과 백질뇌증을 동반하는 상염색체 우성 뇌동맥질환(CADASIL), 대뇌성 거인증, 뇌성마비, 대뇌의 혈관염, 경추관 협착증, 샤르코마리투스병, 키아리 기형, 무도병, 만성 피로 증후군, 만성 염증성 탈수초성 다발성 신경병증(CIDP), 만성 통증, 코핀-루우리 증후군, 혼수, 복합부위 통증 증후군, 압박 신경병증, 선천성 안면마비, 피질기저퇴화, 측두동맥염, 두개골유합증, 크로이츠펠트-야콥병, 누적 외상성 질환, 쿠싱 증후군, 순환성 장애, 거세포봉입체증(CIBD), 사이토메갈로바이러스 감염, 댄디-워커 증후군, 도슨병, 드 모르시에르 증후군(De Morsier's 증후군), 데저린-클룸프케 마비, 데제린-소타스병, 수면위상지연 증후군, 치매, 피부근육염, 발달성 운동조절장애, 당뇨병성 신경병증, 광범위경화증, 복시, 다운 증후군, 드라베 증후군, 뒤쉔 근육 영양장애, 마비성 말장애, 자율신경 실조증, 난산증, 난필증, 이상운동증, 난독증, 근긴장이상, 빈안장 증후군, 뇌염, 뇌류, 뇌삼차신경 혈관종증, 유분증, 야뇨증, 간질, 여성에서의 간질-지적장애, 에르브 마비, 피부홍통증, 폭발성 머리 증후군, 파브리병, 파르 증후군, 실신발작, 가족성 경련성 마비, 열성 발작, 피셔 증후군, 프레드릭 운동실조, 섬유근육통, 포비유 증후군, 태아 알코올 증후군, 취약 X 증후군, 취약 X-연관 떨림/운동실조 증후군(FXTAS), 고셰병, 열성 경련 플러스를 동반한 전신 간질, 게르스트만 증후군, 거대세포성 동맥염, 거대세포 봉입체병, 글로보이드 세포 로이코디스트로피, 회백질 이소성, 길랑-바레 증후군, 전신 불안 장애, HTLV-1 연관 척수병, 할러포르덴-스파츠병, 두부외상, 두통, 얼굴떨림, 유전성 강직성 하반신 마비, 유전성 혈관운동 신경성 유종, 귀 대상포진, 대상포진, 히라야마 증후군, 히르슈슈프룽병, 홀메스-아디 증후군, 전전뇌증, 헌팅턴병, 수두무뇌증, 수두증, 고코티솔증, 저산소증, 면역-매개 뇌척수염, 봉입체 근염, 색소실조증, 영아 레프섬병, 소아경련, 염증성 근육병증, 두개내 낭종, 두개내압 항진, 쌍중심절 15, 쥬베르 증후군, 카락 증후군, 컨스-세이어 증후군, 킨스본 증후군, 클라인-레빈 증후군, 클리펠 파일 증후군, 크라베병, 라포라병, 람베르트-이튼 근무력 증후군, 랜도-클레프너 증후군, 측두외측(발렌베르크) 증후군, 학습장애, 라이병, 레녹스-가스토 증후군, 레쉬-니한 증후군, 백색질형성장애, 백질퇴행성백질뇌증, 루이소체 치매, 뇌회결손, 락트-인 증후군, 허리원반질환, 요추관협착증, 라임병 - 신경성 후유증, 마카도-조셉병(척수소뇌 운동실조 3형), 큰뇌증, 대시증, 상륙증후군, 피질 낭종을 동반한 거대뇌성 백질뇌병증, 대뇌증, 육아종성 구순염 증후군, 메니에르병, 뇌수막염, 멩케증후군, 이염소체 백색질형성장애, 소두증, 소시증, 편두통, 밀러 피셔 증후군, 미니-뇌졸중(일과성 허혈성 발작), 청각과민증, 사립체성 근육병증, 뫼비우스 증후군, 단지 근위축증, 운동 기술 장애, 모야모야병, 뮤코다당증, 다발-경색성 치매, 다초점성 운동 신경병증, 다발성 경화증, 다계통 위축, 근이영양증, 근육통성 뇌척수염, 중증근무력증, 수초탈락성 광범위경화증, 영아의 근간대성 뇌병증, 근육간대경련, 근육병, 근세관성 근육병, 선천성 근강직증, 기면증, 뉴로-베체트병, 신경섬유종증, 신경이완제 악성 증후군,

AIDS의 신경학적 증상, 루푸스의 신경성 후유증, 신경근육긴장증, 신경지방갈색소증, 신경세포이동장애, 신경병증, 신경증, 니만-픽병, 비-24시간 수면각성장애, 비언어적 학습장애, 오셜리반-맥러드 증후군, 후두신경통, 척추 잠재 유합부전 연쇄, 오타하라 증후군, 척수소뇌 변성증, 안구운동 근육간대경련 증후군, 시신경염, 기립성 저혈압, 귀경화증, 과용 증후군, 반복시, 지각이상증, 파킨슨병, 선천성 이상근긴장증, 방종양성 질환, 발작성 공격, 페리-롬버그 증후군, PANDAS, 펠리제우스-메르츠바하병, 주기성 마비, 말초 신경병증, 전반적 발달장애, 빛 재채기 반사, 피탄산축적병, 픽병, 신경압박, 뇌하수체 종양, PMG, 다발신경병증, 소아마비, 다왜소뇌회증, 다발근염, 공뇌증, 소아마비후 증후군, 대상포진 후 신경통(PHN), 기립성 저혈압, 프래더-윌리 증후군, 원발성 측삭 경화증, 프리온병, 진행성 반얼굴 위축, 진행성 다초점 백질뇌병증, 진행성 핵상성 마비, 안면실인증, 가뇌종양, 사분맹, 사지마비, 광견병, 신경근병증, 램지 헌트 증후군 I형, 램지 헌트 증후군 II형, 램지 헌트 증후군 III형, 라스무센 뇌염, 반사성 신경혈관 위축증, 레프섬병, 렘수면행동장애, 반복성 긴장 손상, 하지 불안 증후군, 레트로바이러스-연관 척수병, 레트 증후군, 레이 증후군, 규칙적 행동 장애, 롬베르그 증후군, 무도병, 샌드호프병, 쉴더병, 분열뇌증, 감각처리장애, 중격-시신경형성이상, 흔들린 아이 증후군, 대상 포진, 샤이-드래거 증후군, 쇼그렌 증후군, 수면무호흡증, 수면병, 배부름 재채기(Snatiation), 소토스 증후군, 경직, 이분척추, 척수손상, 척추종양, 척수성 근위축, 척추와 숨뇌근육 위축, 척수소뇌 운동실조, 분할, 스틸-리처드슨-올스제브스키 증후군, 전신근강직 증후군, 뇌졸증, 스터지-웨버 증후군, 말더듬, 아급성 경화성 범뇌염, 피질하 동맥경화 뇌병증, 표재성 철색소침착증, 시데남 무도병, 실신, 공감각, 척수공동증, 족근관 증후군, 만발성 이상운동증, 만발성 정신이상, 탈로프씨 낭종, 테이삭스병, 측두동맥염, 측두엽 간질, 파상풍, 척수 결박 증후군, 톰슨병, 흉곽출구 증후군, 삼차신경통, 토트마비, 투렛 증후군, 독성 뇌병증, 일과성 허혈성 발작, 해면체성 뇌병증, 횡단척수염, 외상성 뇌 상해, 떨림, 발모광, 삼차 신경병증, 열대성경성대마비, 트리파노소마증, 결절성 경화증, 운베리히트 룬드보그 라프병, 폰힙펠 린도우병(VHL), 빌리우이스크 뇌척수염(Viliuisk Encephalomyelitis: VE), 발렌베르크 증후군, 웨스트 증후군, 위플래쉬, 윌리엄 증후군, 윌슨병 또는 젤위거 증후군을 포함한다.

[0431] 일부 경우에, 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법은 뇌암 또는 뇌종양을 치료하기 위해 사용될 수 있다. 본 명세서에 기술된 벡터 및 조성물로 치료될 수 있는 뇌암 또는 종양의 비제한적 예는 악성 뇌교종(등급 III 신경교종), 성상세포종(등급 II 신경교종), 뇌줄기 신경교종, 뇌실막세포종, 신경절교종, 신경절신경종, 교모세포종(등급 IV 신경교종), 신경교종, 청소년형 모양세포 성상세포종(JPA), 저등급 성상세포종(LGA), 수모세포종, 혼합 신경교종, 핍지교종, 시신경 신경교종, 모양세포 성상세포종(등급 I 신경교종), 및 원시신경외배엽(PNET)을 포함하는 신경교종; 속귀신경집종(청신경초종), 말단비대증, 샘종, 연골육종, 척삭종, 두개인두종, 표피모양 종양, 경정맥사구종, 천막하 수막종, 수막종, 뇌하수체 샘종, 뇌하수체 종양, 라스케 낭종을 포함하는 두개골 기반 종양; 뇌전이, 전이성 뇌 종양을 포함하는 전이암; 뇌 낭종, 맥락총 유두종, CNS 림프종, 갑상선결절, 낭충병, 유피 종양, 배아세포종, 림프종, 비강 종양, 비인두 종양, 송과체종양, 솔방울샘모세포종, 솔방울샘종, 천막상 수막종, 및 혈관종양을 포함하는 다른 뇌종양; 성상세포종, 뇌실막세포종, 수막종, 및 신경초종을 포함하는 척수 종양을 포함한다.

[0432] 본 발명은 대상에서 통증을 제어하거나, 관리하거나, 예방하거나, 치료하기 위한 조성물 및 방법을 부분적으로 고려한다. "통증"은 대상 신체에서의 불편한 느낌 및/또는 불쾌한 감각을 지칭한다. 통증의 느낌은 경증으로부터, 때때로 중증이며 변함없는 범위일 수 있다. 통증은 급성 통증 또는 만성 통증으로서 분류될 수 있다. 통증은 통각 수용 통증(즉, 조직 손상에 의해 야기되는 통증), 신경병성 통증 또는 심인성 통증일 수 있다. 일부 경우에, 통증은 질환(예를 들어, 암, 관절염, 당뇨병)에 의해 야기되거나 연관된다. 다른 경우에, 통증은 손상(예를 들어, 스포츠 상해, 외상)에 의해 야기된다. 본 명세서의 조성물 및 방법으로 치료될 수 있는 통증의 비제한적 예는 말초 신경병증, 당뇨병성 신경병증, 대상포진 후 신경통, 삼차 신경병증, 요통, 암과 연관된 신경병증, HIV/AIDS와 연관된 신경병증, 환각지 통증, 수근관 증후군, 뇌졸중 후 중추성 통증, 만성 알코올 사용 장애와 연관된 통증, 갑상선기능저하증, 요독증, 다발성 경화증과 연관된 통증, 척수손상과 연관된 통증, 파킨슨병과 연관된 통증, 간질, 골관절염 통증, 류머티즘성 관절염 통증, 내장 통증, 및 비타민 결핍증과 연관된 통증을 포함하는 신경병성 통증; 및 중추 신경계 외상과 연관된 통증을 포함하는 통각 수용 통증, 좌상/염좌, 및 화상; 심근경색증, 급성 췌장염, 수술 후 통증, 외상 후 통증, 신산통, 암과 연관된 통증, 섬유근육통과 연관된 통증, 수근관 증후군과 연관된 통증 및 요통을 포함한다.

[0433] 본 명세서의 조성물 및 방법은 대상에서의 통증 수준을 개선시키는 데 이용될 수 있다. 일부 경우에, 대상에서의 통증 수준은 이 사이의 모든 범위와 하위 범위를 포함하는 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 15%, 적어도 약 20%, 적어도 약 25%, 적어도 약 30%, 적어도 약 35%, 적어도 약 40%, 적어도 약 45%, 적어도 약 50%, 적어도 약 55%, 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약

85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 99% 또는 약 100%만큼 개선된다. 대상에서의 통증 수준은 다양한 방법에 의해 평가될 수 있다. 일부 경우에, 통증 수준은 자기 보고에 의해 평가된다(즉, 인간 대상는 그/그녀가 경험 중인 통증 수준의 언어적 보고를 표현한다). 일부 경우에, 통증 수준은, 예를 들어, 얼굴 표정, 사지 운동증, 발성, 안절부절 및 가딩(guarding)의 통증 거동 지표에 의해 평가된다. 이런 유형의 평가는, 예를 들어, 대상가 자기 보고를 할 수 없을 때(예를 들어, 영어, 무의식 대상, 비인간 대상), 유용할 수 있다. 통증 수준은 본 발명의 조성물로 치료 후의 통증 수준을 본 발명의 조성물로 치료 전에 대상가 경험한 통증 수준에 비교하여 평가될 수 있다.

[0434] 다양한 실시태양에서, 대상에서의 통증을 제어하거나, 관리하거나, 예방하거나, 치료하기 위한 방법은 대상에게 유효량의 본 명세서에 고려된 조작된 수용체를 투여하는 단계를 포함한다. 임의의 특정 이론에 의해 구속되는 것을 원하는 일 없이, 본 발명은 대상에서 통증을 완화시키는 뉴런 활성을 조절하기 위해 본 명세서에 개시된 벡터를 이용하는 것을 고려한다.

[0435] 다양한 실시태양에서, 뉴런 세포를 활성화시키거나 탈분극화시키는 조작된 수용체를 암호화하는 벡터는 통증감각을 감소시키는 하나 이상의 뉴런 세포, 예를 들어, 저해 개재뉴런에 투여된다(또는 이에 도입된다). 리간드의 존재하에서, 조작된 수용체를 발현시키는 뉴런 세포는 활성화되고, 이들 뉴런 세포를 자극하는 진통 효과를 강화시키는 통증에 대한 민감도를 감소시킨다.

[0436] 다양한 실시태양에서, 뉴런 세포를 비활성화시키거나 과분극화시키는 조작된 수용체를 암호화시키는 벡터는 통증감각 또는 통증에 대한 민감도, 예를 들어, 통증수용체, 말초 감각 뉴런, C-섬유, Aδ 섬유, Aβ 섬유, DRG 뉴런, TGG 뉴런 등을 증가시키는 하나 이상의 뉴런 세포에 투여된다(또는 도입된다). 리간드의 존재하에서, 조작된 수용체를 발현시키는 뉴런 세포는 비활성화되고 통증에 대한 민감도를 감소시키며, 진통 효과를 강력하게 한다.

[0437] 통증수용체의 하위 집단에 대한 조작된 수용체 발현의 표적화는 다음 중 하나 이상에 의해 달성될 수 있다: 벡터의 선택(예를 들어, AAV1, AAV1(Y705+731F+T492V), AAV2(Y444+500+730F+T491V), AAV3(Y705+731F), AAV5, AAV5(Y436+693+719F), AAV6, AAV6(VP3 변이체 Y705F/Y731F/T492V), AAV-7m8, AAV8, AAV8(Y733F), AAV9, AAV9(VP3 변이체 Y731F), AAV10(Y733F), 및 AAV-ShH10); 프로모터의 선택; 및 전달 수단.

[0438] 특정 실시태양에서, 본 명세서에 고려된 조성물 및 방법은 통증 감소에 효과적이다. 본 명세서에 고려된 벡터, 조성물 및 방법으로 치료될 수 있는 통증의 예시적인 예는 급성 통증, 만성 통증, 신경병성 통증, 통각 수용 통증, 이질통, 염증성 통증, 염증성 통각과민, 신경병증, 신경통, 당뇨병성 신경병증, 인간 면역결핍 바이러스-관련 신경병증, 신경손상, 류머티즘성 관절염 통증, 골관절염 통증, 화상, 요통, 눈 통증, 내장 통증, 암 통증(예를 들어, 골암 통증), 치통, 두통, 편두통, 수근관 증후군, 섬유근육통, 신경통, 좌골신경통, 골반 과민성, 골반 통증, 대상포진 후 신경통, 수술 후 통증, 뇌졸중 후 통증 및 월경통을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0439] 통증은 급성 또는 만성으로서 분류될 수 있다. "급성 통증"은 갑자기 시작되며 보통 성질이 급격한 통증을 지칭한다. 급성 통증은 경증이고 잠시 동안 지속될 수 있거나, 중증이고 몇 주 또는 몇 개월 동안 지속될 수 있다. 대부분의 경우에, 급성 통증은 3개월 이상 지속되지 않으며, 통증의 기저 원인이 치료되거나 치유될 때 사라진다. 그러나, 변함없이 계속되는 급성 통증은 만성 통증을 야기할 수 있다. "만성 통증"은 급성 질병 또는 손상의 보통의 과정을 지나서 지속되거나 또는 3개월 초과 내지 6개월 동안 지속되고, 개인의 웰빙에 유해하게 영향을 미치는, 진행성 또는 재발성 통증을 지칭한다. 특정 실시태양에서, 용어 "만성 통증"은 통증이 지속되어서는 안 될 때 지속되는 통증을 지칭한다. 만성 통증은 통각 수용 통증 또는 신경병성 통증일 수 있다.

[0440] 일부 실시태양에서, 통증은 손상, 감염 또는 의학적 개입과 관련하여 또는 그 결과로서 발생할 것으로 예상되거나 예측된다. 일부 실시태양에서, 감염은 신경 손상을 야기한다. 일부 실시태양에서, 의학적 개입은 신체의 중앙 코어에 대한 수술과 같은 수술이다. 일부 실시태양에서, 의학적 개입은 신체의 하나 이상의 조직, 종양 또는 기관의 일부 또는 전체를 제거하기 위한 수술이다. 일부 실시태양에서, 의학적 개입은 절단이다. 특정 실시태양에서, 본 명세서에 고려된 조성물 및 방법은 급성 통증을 감소시키는 데 효과적이다. 특정 실시태양에서, 본 명세서에 고려된 조성물 및 방법은 만성 통증을 감소시키는 데 효과적이다.

[0441] 임상 통증은 환자의 증상 중에 불편함 및 비정상적 민감도를 특징으로 할 때 존재한다. 개체는 다양한 통증 증상이 존재할 수 있다. 이러한 증상은 1) 둔탁함, 작열감 또는 찌름통일 수 있는 자발적 통증; 2) 유해 자극(통각과민)에 반응한 지나친 통증; 및 3) 정상적으로는 무해한 자극에 의해 생성된 통증을 포함한다(allodynia-Meyer et al., 1994, Textbook of Pain, 13-44). 다양한 형태의 급성 및 만성 통증을 앓고 있는 통증이 유사한

증상을 가질 수 있지만, 기저 메커니즘은 상이할 수 있고, 따라서, 상이한 치료 전략이 필요할 수 있다. 따라서 통증은 또한 통각 수용 통증, 염증성 통증, 및 신경병성 통증을 비롯한 상이한 병리 생리학에 따른 다수의 상이한 하위유형으로 나누어질 수 있다.

[0442] 특정 실시태양에서, 본 명세서에 고려된 조성물 및 방법은 통각 수용을 감소시키는 데 효과적이다. 특정 실시태양에서, 본 명세서에 고려된 조성물 및 방법은 염증성 통증을 감소시키는 데 효과적이다. 특정 실시태양에서, 본 명세서에 고려된 조성물 및 방법은 신경병성 통증을 감소시키는 데 효과적이다.

[0443] 유해수용성 통증은 조직 손상에 의해 또는 손상을 야기할 가능성이 있는 강한 자극에 의해 유도된다. 중등증 내지 중증의 급성 통각 수용 통증은 중추 신경계 외상, 좌상/염좌, 화상, 심근경색증 및 급성 췌장염으로부터의 통증, 수술 후 통증(임의의 유형의 수술적 절차 후의 통증), 외상 후 통증, 신산통, 암 통증 및 요통의 두드러진 특징이다. 암 통증은 만성 통증, 예컨대 종양 관련 통증(예를 들어, 뼈 통증, 두통, 안면통 또는 내장 통증) 또는 암요법과 연관된 통증(예를 들어, 화학요법 후 증후군, 만성 수술 후 통증 증후군 또는 방사선 치료 후 증후군)일 수 있다. 암 통증은 또한 화학요법, 면역요법, 호르몬 요법 또는 방사선요법에 반응하여 생길 수 있다. 요통은 헤르니아 또는 파열된 추간판 탈출증 또는 허리뼈면관절의 이상, 천장 관절, 척추주위근 또는 후종인대에 기인할 수 있다. 요통은 자연적으로 해결될 수도 있지만, 일부 환자에서, 12주 이상 지속되는 경우, 특히 쇠약하게 될 수 있는 만성 병태가 될 수 있다.

[0444] 신경병성 통증은 신경계에서 원발진 또는 기능장애에 의해 개시되거나 야기되는 통증으로서 정의될 수 있다. 신경병성 통증의 병인은, 예를 들어, 말초 신경병증, 당뇨병성 신경병증, 대상포진 후 신경통, 삼차 신경병증, 요통, 암 신경병증, HIV 신경병증, 환각지 통증, 수근관 증후군, 뇌졸중 후 중추성 통증 및 만성 알코올 사용 장애와 연관된 통증, 갑상선기능저하증, 요독증, 다발성 경화증, 척수손상, 파킨슨병, 간질 및 비타민 결핍증을 포함한다.

[0445] 신경병성 통증은 통증 장애, 질환에 관한 용어, 통증과 연관되거나 통증에 의해 야기되는 장애 또는 병태와 관련될 수 있다. 통증 장애의 예시적인 예는 관절염, 이질통, 전형적인 삼차 신경병증, 삼차 신경병증, 신체형 장애, 감각저항, 통각과민, 신경통, 신경통, 신경원성 통증, 무통증, 유통성 지각마비, 작열통, 궁둥신경 통증 장애, 퇴행성 관절 장애, 섬유근육통, 내장 질환, 만성 통증 장애, 편두통/두통 통증, 만성 피로 증후군, 복합부위 통증 증후군, 신경영양장애, 족저 근막염 또는 암과 연관된 통증을 포함한다.

[0446] 염증 과정은 조직손상 또는 종창 및 통증을 초래하는 외래 물질의 존재에 반응하여 활성화된 복잡한 일련의 생화학적 및 세포의 사건이다. 관절 통증은 통상적인 염증성 통증이다.

[0447] 본 명세서에 고려된 벡터, 조성물 및 방법으로 치료될 수 있는 다른 유형의 통증은 근육통, 섬유근육통, 척추염, 혈청-음성(비-류머티즘성) 관절병증, 관절주위 류머티즘, 근이영양증, 글리코겐 분해, 다발근염 및 화농성근염을 포함하는 근골격 장애; 협심증, 심근경색증, 승모판막 협착증, 심낭염, 레이노 현상, 경화부종 및 골격근 허혈에 의해 야기된 통증을 포함하는 심장 및 혈관 통증; 두통, 예컨대 편두통(전구증을 동반한 편두통 및 전구증이 없는 편두통을 포함), 군발성 두통, 긴장성 두통 혼합 두통 및 혈관 장애와 연관된 두통; 및 치통, 귀 통증, 구강 작열감 증후군, 및 턱관절 근막통증을 비롯한, 구강안면 통증으로부터 초래된 통증을 포함하지만, 이들로 제한되지 않급성 췌장.

[0448] 인간 대상에 의해 경험된 통증의 양을 감소시키기 위한 본 명세서에 고려된 조성물 및 방법의 유효량은 다양한 통증 척도를 이용하여 결정될 수 있다. 환자 자신의 보고는 통증이 감소되는지의 여부를 평가하기 위해 사용될 수 있다; 예를 들어, Katz and Melzack (1999) Surg. Clin. North Am. 79:231 참조. 대안적으로, 관찰 통증 척도가 사용될 수 있다. LANSS 통증 척도는 통증이 감소되는지의 여부를 평가하기 위해 사용될 수 있다; 예를 들어, Bennett (2001) Pain 92:147 참조. 시각 아날로그 통증 척도가 사용될 수 있다; 예를 들어, Schmader (2002) Clin. J. Pain 18:350 참조. 리커트(Likert) 통증 척도가 사용될 수 있으며; 예를 들어, 0은 통증 없음이며, 5는 중등증의 통증이고, 10은 가능한 최악의 통증이다. 아동에 대한 자기-보고 통증 척도는, 예를 들어, 안면 통증 척도; 왕-베이커(Wong-Baker) 안면 통증 평정 척도; 및 색 아날로그 척도(Colored Analog Scale)를 포함한다. 성인에 대한 자기-보고 통증 척도는, 예를 들어, 시각 아날로그 척도; 언어 수치 평정척도; 언어 기술자 척도; 및 통증 평가 설문지를 포함한다. 통증 측정 척도는, 예를 들어, 앨더 헤이 환자분류 통증 스코어(Alder Hey Triage Pain Score)(Stewart et al. (2004) Arch. Dis. Child. 89:625); 행동 통증 척도(Payen et al. (2001) Critical Care Medicine 29:2258); 통증 평가 설문지(Cleeland and Ryan (1994) Ann. Acad. Med. Singapore 23: 129); 비언어적 통증 지표의 체크리스트(Feldt (2000) Pain Manag. Nurs. 1 : 13); 집중 치료시 통증 관찰 점수(Critical-Care Pain Observation Tool)(Gelinas et al. (2006) Am. J. Crit. Care

15:420); COMFORT 척도(Ambuel et al. (1992) J. Pediatric Psychol. 17:95); 댈러스 통증 설문지(Dallas Pain Questionnaire)(Ozguler et al. (2002) Spine 27:1783); 통각계 통증 지표(Hardy et al. (1952) Pain Sensations and Reactions Baltimore: The Williams & Wilkins Co.); 안면 통증 척도 - 수정(Hicks et al. (2001) Pain 93:173); 얼굴 다리 활동 울음 마음 안정도 척도(Face Legs Activity Cry Consolability Scale); McGill Pain Questionnaire (Melzack (1975) Pain 1 :277); 기술자 차별 척도(Descriptor Differential Scale)(Gracely and Kwilosz (1988) Pain 35:279); 수치적 1 1점 박스(Jensen et al. (1989) Clin. J. Pain 5: 153); 수치적 평정 척도(Hartrick et al. (2003) Pain Pract. 3:310); 왕-베이커 얼굴 통증 평정 척도; 및 시각 아날로그 척도(Huskisson (1982) J. Rheumatol. 9:768)를 포함한다.

[0449] 특정 실시태양에서, 대상에서의 통증을 완화시키는 방법이 제공되며, 상기 방법은 조작된 수용체를 뉴런 세포 내로 도입하는 단계 및 조작된 수용체를 활성화시키는 유효량의 리간드를 결합함으로써 세포 활성을 제어하여, 대상에서의 통증을 완화시키는 단계를 포함한다. 상기 방법은 비표적(off-target) 효과, 예컨대 일반적 중추 신경계 우울증이 없는 통증에 대한 상당한 무통증을 제공한다. 특정 실시태양에서, 상기 방법은 비치료 대상에 비해 대상에서의 신경병성 통증의 이 사이의 모든 범위와 하위 범위 포함하는 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상의 감소를 제공한다. 일부 실시태양에서, 상기 방법은 리간드의 투여 전에 및 후에 대상에서의 통증을 측정하는 단계를 포함하되, 대상에서의 통증은 모든 범위와 그 사이의 하위 범위 포함하는 1%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 감소된다. 이러한 예에서, 측정하는 단계는 리간드 투여 4시간 이상 후에, 예를 들어, 리간드 투여 8시간, 12시간, 16시간, 24시간, 36시간, 48시간, 3일 또는 4일 이상 후에 일어날 수 있다.

[0450] 특정 실시태양에서, 본 명세서에 고려된 벡터는 하나 이상의 뉴런 세포에 투여되거나 도입된다. 뉴런 세포는 동일한 유형의 뉴런 세포이거나, 상이한 유형의 뉴런 세포의 혼합된 집단일 수 있다. 한 실시태양에서, 뉴런 세포는 통증수용체 또는 말초 감각 뉴런이다. 감각 뉴런의 예시적 예는 후근 신경절(DRG) 뉴런 및 삼차 신경절(TGG) 뉴런을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 한 실시태양에서, 뉴런 세포는 뉴런 통증 순환에 연루된 저해 개재뉴런이다.

[0451] 일부 경우에, 조작된 수용체를 암호화하는 벡터는 이러한 벡터의 투여가 필요한 대상에게 투여된다. 투여 방법의 비제한적 예는 피하 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 진피내 투여, 복강내 투여, 경구 투여, 주입, 두개내 투여, 초내 투여, 비강내 투여, 신경절내 투여, 척수내 투여, 대조 투여 및 신경내 투여를 포함한다. 일부 경우에, 투여는 벡터의 액체 제제 주사를 수반할 수 있다. 다른 경우에, 투여는 벡터의 고체 제제의 경구 전달을 수반할 수 있다. 일부 경우에, 경구 제제는 식품과 함께 투여될 수 있다. 특정 실시태양에서, 벡터는 벡터를 하나 이상의 뉴런 세포에 도입하기 위해 대상에게 비경구로, 정맥내로, 근육내, 복강내, 초내로, 신경내로, 신경절내로, 척수내로 또는 뇌실내로 투여된다. 다양한 실시태양에서, 벡터는 rAAV이다.

[0452] 한 실시태양에서, AAV는 초내(IT) 또는 신경절내(IG) 투여에 의해 감각 뉴런 또는 통증수용체, 예를 들어, DRG 뉴런, TGG 뉴런 등에 투여된다. IT 경로는 AAV를 뇌척수액(CSF)에 전달한다. 이런 투여 경로는, 예를 들어, 만성 통증 또는 다른 말초 신경계(PNS) 또는 중추 신경계(CNS) 적응증의 치료에 적합할 수 있다. 동물에서, IT 투여는 대조를 통해 IT 카테터를 삽입함으로써 그리고 이를 요추 수준까지 꼬리쪽으로 전진시킴으로써 달성되었다. 인간에서, IT 전달은 우수한 안전성 프로파일을 갖는 일상적인 침상옆 처치인 요추 천자(LP)에 의해 용이하게 수행될 수 있다.

[0453] 특정 경우에, 벡터는 신경절내 투여에 의해 대상에게 투여될 수 있다. 신경절내 투여는 하나 이상의 신경절에의 직접 주사를 수반할 수 있다. IG 경로는 DRG 또는 TGG 실질 내로 직접적으로 AAV를 전달할 수 있다. 동물에서, DRG에 대한 IG 투여는 복잡하고 비침습적인 절차를 필요로 하기 때문에 인간에서 바람직하지 않은 개방적 신경수술적 절차에 의해 수행된다. 인간에서, DRG를 안전하게 표적화하는 최소 침습적, CT 영상-유도 기법이 사용될 수 있다. 전도 촉진 투여(convection enhanced delivery: CED)를 위한 맞춤형 바늘 조립기는 AAV를 DRG 실질 내로 전달하는 데 사용될 수 있다. 비제한적 예에서, 본 발명의 벡터는 만성 통증의 치료를 위한 하나 이상의 배근 신경절 및/또는 삼차 신경절에 전달될 수 있다. 다른 비제한적 예에서, 본 발명의 벡터는 간질을 치료하기 위해 결절신경절(미주신경)에 전달될 수 있다.

[0454] 또 다른 특정 경우에, 벡터는 두개내 투여에 의해(즉, 뇌 내로 직접적으로) 대상에게 투여될 수 있다. 두개내 투여의 비제한적 예에서, 본 발명의 벡터는, 예를 들어, 간질 발작 병소를 치료하기 위해 뇌의 피질 내로, 예를 들어, 포만 장애를 치료하기 위해 뇌 시상 하부 내로, 또는 예를 들어, 포만 장애를 치료하기 위해 편도체 중심

핵 내로 전달될 수 있다. 다른 특정 경우에, 벡터는 신경내 주사에 의해 (즉, 신경 내로 직접적으로) 대상에게 투여될 수 있다. 신경은 치료될 적응증, 예를 들어, 만성 통증을 치료하기 위해 궁둥신경 내로 주사 또는 간질 또는 포만 장애를 치료하기 위해 미주신경 내로 주사에 기반하여 선택될 수 있다. 또 다른 특정 경우에, 벡터는 피하 주사에 의해, 예를 들어, 만성 통증을 치료하기 위해 감각 신경 말단에 투여될 수 있다.

[0455] 벡터 용량은 대상에게 전달되는 벡터 게놈 단위의 수로서 표현될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은 "벡터 게놈 단위"는 용량 중의 투여되는 개개 벡터 게놈의 수를 지칭한다. 개개 벡터 게놈의 크기는 일반적으로 사용되는 바이러스 벡터의 유형에 따를 것이다. 본 발명의 벡터 게놈은 약 1.0 킬로베이스, 1.5 킬로베이스, 2.0 킬로베이스, 2.5 킬로베이스, 3.0 킬로베이스, 3.5 킬로베이스, 4.0 킬로베이스, 4.5 킬로베이스, 5.0 킬로베이스, 5.5 킬로베이스, 6.0 킬로베이스, 6.5 킬로베이스, 7.0 킬로베이스, 7.5 킬로베이스, 8.0 킬로베이스, 8.5 킬로베이스, 9.0 킬로베이스, 9.5 킬로베이스, 10.0 킬로베이스 내지 10.0 초과의 킬로베이스일 수 있다. 따라서, 단일 벡터 게놈은 뉴클레오타이드의 최대 10,000개 또는 초과의 염기쌍을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 벡터 용량은 약 1×10^{6}, 2×10^{6}, 3×10^{6}, 4×10^{6}, 5×10^{6}, 6×10^{6}, 7×10^{6}, 8×10^{6}, 9×10^{6}, 1×10^{7}, 2×10^{7}, 3×10^{7}, 4×10^{7}, 5×10^{7}, 6×10^{7}, 7×10^{7}, 8×10^{7}, 9×10^{7}, 1×10^{8}, 2×10^{8}, 3×10^{8}, 4×10^{8}, 5×10^{8}, 6×10^{8}, 7×10^{8}, 8×10^{8}, 9×10^{8}, 1×10^{9}, 2×10^{9}, 3×10^{9}, 4×10^{9}, 5×10^{9}, 6×10^{9}, 7×10^{9}, 8×10^{9}, 9×10^{9}, 1×10^{10}, 2×10^{10}, 3×10^{10}, 4×10^{10}, 5×10^{10}, 6×10^{10}, 7×10^{10}, 8×10^{10}, 9×10^{10}, 1×10^{11}, 2×10^{11}, 3×10^{11}, 4×10^{11}, 5×10^{11}, 6×10^{11}, 7×10^{11}, 8×10^{11}, 9×10^{11}, 1×10^{12}, 2×10^{12}, 3×10^{12}, 4×10^{12}, 5×10^{12}, 6×10^{12}, 7×10^{12}, 8×10^{12}, 9×10^{12}, 1×10^{13}, 2×10^{13}, 3×10^{13}, 4×10^{13}, 5×10^{13}, 6×10^{13}, 7×10^{13}, 8×10^{13}, 9×10^{13}, 1×10^{14}, 2×10^{14}, 3×10^{14}, 4×10^{14}, 5×10^{14}, 6×10^{14}, 7×10^{14}, 8×10^{14}, 9×10^{14}, 1×10^{15}, 2×10^{15}, 3×10^{15}, 4×10^{15}, 5×10^{15}, 6×10^{15}, 7×10^{15}, 8×10^{15}, 9×10^{15}, 1×10^{16}, 2×10^{16}, 3×10^{16}, 4×10^{16}, 5×10^{16}, 6×10^{16}, 7×10^{16}, 8×10^{16}, 9×10^{16}, 1×10^{17}, 2×10^{17}, 3×10^{17}, 4×10^{17}, 5×10^{17}, 6×10^{17}, 7×10^{17}, 8×10^{17}, 9×10^{17}, 1×10^{18}, 2×10^{18}, 3×10^{18}, 4×10^{18}, 5×10^{18}, 6×10^{18}, 7×10^{18}, 8×10^{18}, 9×10^{18}, 1×10^{19}, 2×10^{19}, 3×10^{19}, 4×10^{19}, 5×10^{19}, 6×10^{19}, 7×10^{19}, 8×10^{19}, 9×10^{19}, 1×10^{20}, 2×10^{20}, 3×10^{20}, 4×10^{20}, 5×10^{20}, 6×10^{20}, 7×10^{20}, 8×10^{20}, 9×10^{20}개 이상의 벡터 게놈 단위일 수 있다.

[0456] 특정 실시태양에서, 본 명세서에 고려된 벡터는 적어도 약 1×10^{9}개의 게놈 입자/㎖, 적어도 약 1×10^{10}개의 게놈 입자/㎖, 적어도 약 5×10^{10}개의 게놈 입자/㎖, 적어도 약 1×10^{11}개의 게놈 입자/㎖, 적어도 약 5×10^{11}개의 게놈 입자/㎖, 적어도 약 1×10^{12}개의 게놈 입자/㎖, 적어도 약 5×10^{12}개의 게놈 입자/㎖, 적어도 약 6×10^{12}개의 게놈 입자/㎖, 적어도 약 7×10^{12}개의 게놈 입자/㎖, 적어도 약 8×10^{12}개의 게놈 입자/㎖, 적어도 약 9×10^{12}개의 게놈 입자/㎖, 적어도 약 10×10^{12}개의 게놈 입자/㎖, 적어도 약 15×10^{12}개의 게놈 입자/㎖, 적어도 약 20×10^{12}개의 게놈 입자/㎖, 적어도 약 25×10^{12}개의 게놈 입자/㎖, 적어도 약 50×10^{12}개의 게놈 입자/㎖, 또는 적어도 약 100×10^{12}개의 게놈 입자/㎖의 역가로 대상에게 투여된다. 바이러스 역가에 대한 언급에서 사용되는 용어 "게놈 입자(genome particle: gp)" 또는 "게놈 등가물" 또는 "게놈 복제물"(genome copy: gc)은 감염성 또는 작용성과 상관없이, 재조합 AAV DNA 게놈을 함유하는 비리온의 수를 지칭한다. 특정 벡터 제제에서 게놈 입자의 수는 당업계에서 잘 이해되는 방법, 예를 들어, 게놈 DNA의 정량적 PCR, 또는 예를 들어, Clark et al. (1999) Hum. Gene Ther., 10:1031-1039; Veldwijk et al. (2002) Mol. Ther., 6:272-278의 방법에 의해 측정될 수 있다.

[0457] 본 발명의 벡터는 유체 용적으로 투여될 수 있다. 일부 경우에, 벡터는 약 0.1㎖, 0.2㎖, 0.3㎖, 0.4㎖, 0.5㎖, 0.6㎖, 0.7㎖, 0.8㎖, 0.9㎖, 1.0㎖, 2.0㎖, 3.0㎖, 4.0㎖, 5.0㎖, 6.0㎖, 7.0㎖, 8.0㎖, 9.0㎖, 10.0㎖, 11.0㎖, 12.0㎖, 13.0㎖, 14.0㎖, 15.0㎖, 16.0㎖, 17.0㎖, 18.0㎖, 19.0㎖, 20.0㎖ 또는 20.0㎖ 초과의 용적으로 투여될 수 있다. 일부 경우에, 벡터 용량은 대상에게 투여되는 벡터의 농도 또는 역가로서 표현될 수 있다. 이 경우에, 벡터 용량은 용적 당 벡터 게놈 단위의 수(즉, 게놈 단위/용적)로서 표현될 수 있다.

[0458] 특정 실시태양에서, 본 명세서에 고려된 벡터는 적어도 약 5×10^{9}개의 감염성 단위/㎖, 적어도 약 6×10^{9}개의 감

염성 단위/㎖, 적어도 약 7×10^{9}개의 감염성 단위/㎖, 적어도 약 8×10^{9}개의 감염성 단위/㎖, 적어도 약 9×10^{9}개의 감염성 단위/㎖, 적어도 약 1×10^{10}개의 감염성 단위/㎖, 적어도 약 1.5×10^{10}개의 감염성 단위/㎖, 적어도 약 2×10^{10}개의 감염성 단위/㎖, 적어도 약 2.5×10^{10}개의 감염성 단위/㎖, 적어도 약 5×10^{10}개의 감염성 단위/㎖, 적어도 약 1×10^{11}개의 감염성 단위/㎖, 적어도 약 2.5×10^{11}개의 감염성 단위/㎖, 적어도 약 5×10^{11}개의 감염성 단위/㎖, 적어도 약 1×10^{12}개의 감염성 단위/㎖, 적어도 약 2.5×10^{12}개의 감염성 단위/㎖, 적어도 약 5×10^{12}개의 감염성 단위/㎖, 적어도 약 1×10^{13}개의 감염성 단위/㎖, 적어도 약 5×10^{13}개의 감염성 단위/㎖, 적어도 약 1×10^{14}개의 감염성 단위/㎖의 역가로 대상에게 투여된다. 바이러스에 대한 언급에서 사용되는 용어 "감염 단위(infection unit: iu)," "감염성 입자" 또는 "복제 단위"는, 예를 들어, McLaughlin et al. (1988) J. Virol., 62:1963-1973에 기술된 바와 같은 복제 중심 분석으로서도 알려진 감염성 중심 분석에 의해 측정되는 바와 같은 감염성 및 복제-적격 재조합 AAV 벡터 입자의 수를 지칭한다.

[0459] 특정 실시태양에서, 본 명세서에 고려된 벡터는 적어도 약 5×10^{10}개의 형질도입 단위/㎖, 적어도 약 1×10^{11}개의 형질도입 단위/㎖, 적어도 약 2.5×10^{11}개의 형질도입 단위/㎖, 적어도 약 5×10^{11}개의 형질도입 단위/㎖, 적어도 약 1×10^{12}개의 형질도입 단위/㎖, 적어도 약 2.5×10^{12}개의 형질도입 단위/㎖, 적어도 약 5×10^{12}개의 형질도입 단위/㎖, 적어도 약 1×10^{13}개의 형질도입 단위/㎖, 적어도 약 5×10^{13}개의 형질도입 단위/㎖, 적어도 약 1×10^{14}개의 형질도입 단위/㎖의 역가로 대상에게 투여된다. 바이러스 역가에 대한 언급에서 사용되는 용어 "형질도입 단위"(transducing unit: tu)"는, 예를 들어, Xiao et al. (1997) Exp. Neurobiol., 144:113-124; 또는 Fisher et al. (1996) J. Virol., 70:520-532 (LFU assay)에 기술된 바와 같은 기능성 분석에서 측정되는 기능성 이식유전자 산물의 생성을 초래하는 감염성 재조합 AAV 벡터 입자의 수를 지칭한다.

[0460] 벡터 용량은 일반적으로 투여 경로에 따라 결정될 것이다. 특정 예에서, 신경절내 주사는 약 0.1㎖ 내지 약 1.0㎖의 용적으로 약 1×10^{9} 내지 약 1×10^{13}개의 벡터 게놈을 포함할 수 있다. 다른 특정 경우에, 초내 주사는 약 1.0㎖ 내지 약 12.0㎖의 용적으로 약 1×10^{10} 내지 약 1×10^{15}개의 벡터 게놈을 포함할 수 있다. 또 다른 특정 경우에, 두개내 주사는 약 0.1㎖ 내지 약 1.0㎖의 용적으로 약 1×10^{9} 내지 약 1×10^{13}개의 벡터 게놈을 포함할 수 있다. 다른 특정 경우에, 신경내 주사는 약 0.1㎖ 내지 약 1.0㎖의 용적으로 약 1×10^{9} 내지 약 1×10^{13}개의 벡터 게놈을 포함할 수 있다. 다른 특정 예에서, 척수내 주사는 약 0.1㎖ 내지 약 1.0㎖의 용적으로 약 1×10^{9} 내지 약 1×10^{13}개의 벡터 게놈을 포함할 수 있다. 또 다른 특정 경우에, 대조 주입은 약 0.5㎖ 내지 약 5.0㎖의 용적으로 약 5×10^{9} 내지 약 5×10^{13}개의 벡터 게놈을 포함할 수 있다. 또 다른 특정 경우에, 피하 주사는 약 0.1㎖ 내지 약 1.0㎖의 용적으로 약 1×10^{9} 내지 약 1×10^{13}개의 벡터 게놈을 포함할 수 있다.

[0461] 일부 경우에, 벡터는 주입에 의해 대상에게 전달된다. 주입에 의해 대상에게 전달되는 벡터 용량은 벡터 주입 속도로서 측정될 수 있다. 벡터 주입 속도의 비제한적 예는 신경절내, 척수내, 두개내 또는 신경내 투여에 대해 1 내지 10㎖/분; 및 초내 또는 대조 투여에 대해 10 내지 1000㎖/분을 포함한다. 일부 경우에, 벡터는 MRI-유도 전도 촉진 투여(CED)에 의해 대상에게 전달된다. 이 기법은 거대 용적의 뇌 전체적으로 분포된 증가된 바이러스 확산 및 도입을 가능하게 할 뿐만 아니라 바늘 경로를 따라서 벡터의 역류를 감소시킨다.

[0462] 다양한 실시태양에서, 뉴런 세포를 비활성화시키거나 과분극화시키는 조작된 수용체를 암호화시키는 벡터를 통증감각 또는 통증에 대한 민감도를 증가시키는 하나 이상의 뉴런 세포에 투여하는 단계, 및 조작된 수용체를 발현시키는 뉴런 세포에 특이적으로 결합하는 리간드를 대상에게 투여하는 단계를 포함하여, 세포를 비활성화시키고, 통증에 대한 민감도를 감소시키며, 진통 효과를 강력하게 하는 방법이 제공된다.

[0463] 다양한 실시태양에서, 뉴런 세포를 활성화시키거나 분극화시키는 조작된 수용체를 암호화하는 벡터를 통증감각 또는 통증에 대한 민감도를 감소시키는 하나 이상의 뉴런 세포에 투여하는 단계, 및 조작된 수용체를 발현시키는 뉴런 세포를 대상에 특이적으로 결합시키는 리간드를 투여하는 단계를 포함하여, 세포를 활성화시키고, 통증에 대한 민감도를 감소시키며, 진통 효과를 강력하게 하는 방법이 제공된다.

[0464] 리간드의 제제는 다양한 경로에 의해 대상에게 투여될 수 있다. 투여 방법의 비제한적 예는 피하 투여, 정맥내

투여, 근육내 투여, 경피 투여, 진피내 투여, 복강내 투여, 경구 투여, 주입, 두개내 투여, 초내 투여, 비강내 투여, 신경절내 투여, 및 신경내 투여를 포함한다. 일부 경우에, 투여는 리간드의 액체 제제 주사를 수반할 수 있다. 다른 경우에, 투여는 리간드의 고체 제제의 경구 전달을 수반할 수 있다. 특정 경우에, 리간드는 경구 투여(예를 들어, 알약, 정제, 캡슐 등)에 의해 투여된다. 일부 경우에, 경구 조성물은 식품과 함께 투여될 수 있다. 다른 특정 경우에, 리간드는 대상의 뇌척수액(CSF)에 대한 전달을 위해 초내 주사(즉, 척수의 지주막하공간 내로)에 의해 투여된다. 다른 특정 경우에, 리간드는 국소로(예를 들어, 진피 패치, 크림, 로션, 연고 등) 투여된다.

[0465] 대상에게 투여되는 리간드의 투여량은 절대적 한계로 처리되지 않지만, 조성물 및 이의 활성 성분의 특성 및 이의 원치않는 부작용(예를 들어, 항체에 대한 면역 반응), 치료 중인 대상 및 치료 중인 병태의 유형 및 투여 방식에 좌우될 것이다. 일반적으로, 용량은 치료적 유효량, 예컨대 목적하는 생물학적 효과를 달성하는 데 충분한 양, 예를 들어, 대상에 의해 경험되는 통증 수준을 감소시키거나 약화시키는 데 효과적인 양일 것이다. 특정 실시태양에서, 용량은 예방적 양 또는 유효량일 수 있다. 리간드의 치료적 유효량은 투여 경로, 치료 중인 적응증 및/또는 사용을 위해 선택된 리간드에 좌우될 것이다.

[0466] 한 실시태양에서, 리간드는 벡터의 투여 전에 대상에게 처음 투여된다. 리간드의 치료적 유효량은 벡터의 전달 후 일정 시간에 대상에게 투여될 수 있다. 일반적으로, 벡터의 전달 후에, 벡터에 의해 암호화된 단백질(즉, 조작된 수용체)를 생성하기 위해 대상의 하나 이상의 세포에 일정 기간이 필요할 것이다. 이 일정 기간 동안에, 대상에 대한 리간드의 투여는 대상에게 유리하지 않을 수도 있다. 이 상황에서, 조작된 수용체의 양이 대상의 하나 이상의 세포에 의해 생성된 후에 리간드를 투여하는 데 적합할 수 있다.

[0467] 한 실시태양에서, 벡터가 대상에게 투여되는 것과 거의 동시에 리간드가 대상에게 처음 투여된다.

[0468] 한 실시태양에서, 대상에 대한 벡터의 투여 후 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11 또는 12시간, 며칠, 몇 주, 몇 개월 또는 몇 년에 리간드가 처음 투여된다. 일부 경우에, 치료적 유효량의 리간드는 벡터의 전달 후 적어도 1일, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 14일, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 21일, 22일, 23일, 24일, 25일, 26일, 27일, 28일, 29일, 30일 또는 30일 초과에 상기 대상에게 투여될 수 있다. 특정 예에서, 치료적 유효량의 리간드는 벡터의 전달 후 적어도 1주에 대상에게 투여된다. 추가 예에서, 치료적 유효량의 리간드는 적어도 연속 3일 동안 매일 대상에게 투여된다.

[0469] 치료적 유효량 또는 용량의 본 발명의 리간드는 mg 또는 mg의 리간드/kg의 대상 체중으로서 표현될 수 있다. 일부 예에서, 치료적 유효량의 리간드는 약 0.001mg/kg, 약 0.005mg/kg, 약 0.01mg/kg, 약 0.05mg/kg, 약 0.1mg/kg, 약 0.5mg/kg, 약 1mg/kg, 약 2mg/kg, 약 3mg/kg, 약 4mg/kg, 약 5mg/kg, 약 6mg/kg, 약 7mg/kg, 약 8mg/kg, 약 9mg/kg, 약 10mg/kg, 약 20mg/kg, 약 30mg/kg, 약 40mg/kg, 약 50mg/kg, 약 60mg/kg, 약 70mg/kg, 약 80mg/kg, 약 90mg/kg, 약 100mg/kg, 약 120mg/kg, 약 140mg/kg, 약 160mg/kg, 약 180mg/kg, 약 200mg/kg, 약 220mg/kg, 약 240mg/kg, 약 260mg/kg, 약 280mg/kg, 약 300mg/kg, 약 320mg/kg, 약 340mg/kg, 약 360mg/kg, 약 380mg/kg, 약 400mg/kg, 약 420mg/kg, 약 440mg/kg, 약 460mg/kg, 약 480mg/kg, 약 500mg/kg, 약 520mg/kg, 약 540mg/kg, 약 560mg/kg, 약 580mg/kg, 약 600mg/kg, 약 620mg/kg, 약 640mg/kg, 약 660mg/kg, 약 680mg/kg, 약 700mg/kg, 약 720mg/kg, 약 740mg/kg, 약 760mg/kg, 약 780mg/kg, 약 800mg/kg, 약 820mg/kg, 약 840mg/kg, 약 860mg/kg, 약 880mg/kg, 약 900mg/kg, 약 920mg/kg, 약 940mg/kg, 약 960mg/kg, 약 980mg/kg, 약 1mg/kg, 약 2mg/kg, 약 3mg/kg, 약 4mg/kg, 약 5mg/kg, 약 6mg/kg, 약 7mg/kg, 약 8mg/kg, 약 9mg/kg, 약 10mg/kg, 또는 10mg/kg 초과일 수 있다.

[0470] 특정 실시태양에서, 대상에게 투여되는 리간드의 용량은 적어도 약 0.001 마이크로그램/킬로그램(μg/kg), 적어도 약 0.005μg/kg, 적어도 약 0.01μg/kg, 적어도 약 0.05μg/kg, 적어도 약 0.1μg/kg, 적어도 약 0.5μg/kg, 0.001 밀리그램/킬로그램(mg/kg), 적어도 약 0.005mg/kg, 적어도 약 0.01mg/kg, 적어도 약 0.05mg/kg, 적어도 약 0.1mg/kg, 적어도 약 0.5mg/kg , 적어도 약 1mg/kg, 적어도 약 2mg/kg, 적어도 약 3mg/kg, 적어도 약 4mg/kg, 적어도 약 5mg/kg, 적어도 약 5mg/kg, 적어도 약 6mg/kg, 적어도 약 7mg/kg, 적어도 약 8mg/kg, 적어도 약 8mg/kg, 적어도 약 9mg/kg, 또는 적어도 약 10mg/kg 이상이다.

[0471] 특정 실시태양에서, 대상에게 투여되는 리간드의 용량은 적어도 약 0.001μg/kg 내지 적어도 약 10mg/kg, 적어도 약 0.01μg/kg 내지 적어도 약 10mg/kg, 적어도 약 0.1μg/kg 내지 적어도 약 10mg/kg, 적어도 약 1μg/kg 내지 적어도 약 10mg/kg, 적어도 약 0.01mg/kg 내지 적어도 약 10mg/kg, 적어도 약 0.1mg/kg 내지 적어도 약 10mg/kg, 또는 적어도 약 1mg/kg 내지 적어도 약 10mg/kg, 또는 이들의 임의의 개재 범위이다.

[0472] 일부 양태에서, 치료적 유효량의 리간드는 몰농도(즉, M 또는 mol/L)로서 표현될 수 있다. 일부 경우에, 치료적 유효량의 리간드는 약 1nM, 2nM, 3nM, 4nM, 5nM, 6nM, 7nM, 8nM, 9nM, 10nM, 20nM, 30nM, 40nM, 50nM, 60nM, 70nM, 80nM, 90nM, 100nM, 200nM, 300nM, 400nM, 500nM, 600nM, 700nM, 800nM, 900nM, 1mM, 2mM, 3mM, 4mM, 5mM, 6mM, 7mM, 8mM, 9mM, 10mM, 20mM, 30mM, 40mM, 50mM, 60mM, 70mM, 80mM, 90mM, 100mM, 200mM, 300mM, 400mM, 500mM, 600mM, 700mM, 800mM, 900mM, 1000mM 이상일 수 있다.

[0473] 치료적 유효량의 리간드는 매일 1회 또는 1회 초과로 투여될 수 있다. 일부 경우에, 치료적 유효량의 리간드는 필요한 대로(예를 들어, 통증 경감이 필요할 때) 투여된다. 리간드는 연속으로 (예를 들어, 치료 요법의 지속기간 동안 중단 없이 매일) 투여될 수 있다. 일부 경우에, 치료 요법은 1주 미만, 1주, 2주, 3주, 1개월 또는 1개월 초과일 수 있다. 일부 경우에, 치료적 유효량의 리간드는 1일, 적어도 2 연속일, 적어도 3 연속일, 적어도 4 연속일, 적어도 5 연속일, 적어도 6 연속일, 적어도 7 연속일, 적어도 8 연속일, 적어도 9 연속일, 적어도 10 연속일, 또는 적어도 10 연속일 초과 동안 투여된다. 특정 경우에, 치료적 유효량의 리간드는 3 연속일 동안 투여된다. 일부 경우에, 치료적 유효량의 리간드는 1주당 1회, 1주당 2회, 1주당 3회, 1주당 4회, 1주당 5회, 1주당 6회, 1주당 7회, 1주당 8회, 1주당 9회, 1주당 10회, 1주당 11회, 1주당 12회, 1주당 13회, 1주당 14회, 1주당 15회, 1주당 16회, 1주당 17회, 1주당 18회, 1주당 19회, 1주당 20회, 1주당 25회, 1주당 30회, 1주당 35회, 1주당 40회 또는 1주당 40회 초과로 투여될 수 있다. 일부 경우에, 치료적 유효량의 리간드는 1일당 1회, 1일당 2회, 1일당 3회, 1일당 4회, 1일당 5회, 1일당 6회, 1일당 7회, 1일당 8회, 1일당 9회, 1일당 10회 또는 1일당 10회 초과로 투여될 수 있다. 일부 경우에, 치료적 유효량의 리간드는 적어도 1시간마다, 적어도 2시간마다, 적어도 3시간마다, 적어도 4시간마다, 적어도 5시간마다, 적어도 6시간마다, 적어도 7시간마다, 적어도 8시간마다, 적어도 9시간마다, 적어도 10시간마다, 적어도 11시간마다, 적어도 12시간마다, 적어도 13시간마다, 적어도 14시간마다, 적어도 15시간마다, 적어도 16시간마다, 적어도 17시간마다, 적어도 18시간마다, 적어도 19시간마다, 적어도 20시간마다, 적어도 21시간마다, 적어도 22시간마다, 적어도 23시간, 또는 적어도 1일마다 투여된다. 리간드의 용량은 대상에게 지속적으로, 또는 1일당 1, 2, 3, 4 또는 5회; 1주당 1, 2, 3, 4, 5, 6 또는 7회, 1개월당 1, 2, 3 또는 4회, 2, 3, 4, 5 또는 6개월마다 1회, 또는 1년 1회, 또는 훨씬 더 긴 간격으로 대상에게 투여될 수 있다. 치료의 지속기간은 1일, 1, 2 또는 3주, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 또는 11개월, 1, 2, 3, 4, 5년 이상, 또는 더 길게 지속될 수 있다.

[0474] 본 명세서에 개시된 방법 및 조성물에 의해 치료되는 대상는 인간일 수 있거나, 비-인간 동물일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "치료하다" 및 이의 문법적 동의어는 일반적으로 질환의 증상을 감소시키거나, 제거하거나, 예방하기 위한 조성물 또는 방법의 사용을 지칭하며, 치료적 이점 및/또는 예방적 이점을 달성하는 것을 포함한다. 치료적 이점은 치료 중인 장애 또는 병태의 진행을 늦추거나, 진행을 멈추거나, 진행을 반전시키거나, 증상의 근절 또는 개선을 의미한다. 치료의 예방적 이점은 병태 위험을 감소시키거나, 병태 진행을 늦추거나, 병태 발생 가능성을 감소시키는 것을 포함한다.

[0475] 비인간 동물의 비제한적 예는 비인간 영장류, 가축 동물, 집안 반려동물 및 실험실 동물을 포함한다. 예를 들어, 비인간 동물은 유인원(예를 들어, 침팬지, 개코원숭이, 고릴라 또는 오랑우탄), 구대륙 원숭이(예를 들어, 레서스 원숭이), 신대륙 원숭이, 개, 고양이, 들소, 낙타, 소, 사슴, 돼지, 당나귀, 말, 노새, 라마, 양, 염소, 버팔로, 순록, 야크, 마우스, 래트, 토끼, 또는 임의의 다른 비인간 동물일 수 있다. 본 명세서에서 기술된 바와 같은 조성물 및 방법은 수의학적 동물을 치료할 수 있다. 수의학적 동물은 개, 고양이, 말, 소, 양, 마우스, 래트, 기니픽, 햄스터, 토끼, 뱀, 거북이 및 도마뱀을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 일부 양태에서, 조직 또는 세포 집단을 조성물과 접촉시키는 것은 조성물을 세포 집단 또는 대상에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시태양에서, 투여는 시험관내에서, 예를 들어, 조성물을 세포 배양 시스템에 첨가함으로써 일어난다. 일부 양태에서, 투여는 생체내에서, 예를 들어, 특정 경로를 통한 투여에 의해 일어난다. 1종 초과의 조성물이 투여되는 경우에, 조성물은 동시에(예를 들어, 동일한 날에) 동일한 경로를 통해, 또는 상이한 시간에 동일한 경로를 통해 투여될 수 있다. 대안적으로, 조성물은 동시에(예를 들어, 동일한 날에) 상이한 경로를 통해 또는 상이한 시간에 상이한 경로를 통해 투여될 수 있다.

[0476] 조성물이 필요한 대상에게 투여되는 횟수는 의학 전문가의 재량, 장애, 장애의 중증도 및 제형에 대한 대상의 반응에 의존한다. 일부 양태에서, 조성물의 투여는 적어도 1회 일어난다. 추가 양상에서, 투여는 주어진 기간에 1회 초과, 예를 들어 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10회 초과로 일어난다. 각각의 투여의 투여량 및/또는 투여 빈도는 환자의 병태 및 생리학적 반응에 기반하여 필요하다면 조절될 수 있다.

[0477] 일부 실시태양에서, 조성물은 대상의 병태에서 목적하는 생리학적 효과 또는 개선을 달성하기 위한 충분한 시간의 양으로 투여될 수 있다. 대상의 병태가 개선되지 않는 경우에, 의사의 재량으로 조성물은 대상의 질환 또는

병태 증상을 개선시키거나 달리 제어하거나 제한하기 위해, 만성적으로, 즉, 대상 수명의 지속기간 내내를 포함하여 장기간의 시간 동안 투여될 수 있다. 대상의 병태가 개선되는 경우에, 의사의 재량으로, 조성물은 지속적으로 투여될 수 있고; 대안적으로, 투여 중인 약물의 용량은 일시적으로 감소되거나 특정 시간 길이 동안 일시적으로 연기될 수 있다(즉, "약물 휴지기(drug holiday)"). 약물 휴지기의 길이는 2일 내지 1년, 단지 예로서, 2일, 3일, 4일, 5일, 6일, 7일, 10일, 12일, 15일, 20일, 28일, 35일, 50일, 70일, 100일, 120일, 150일, 180일, 200일, 250일, 280일, 300일, 320일, 350일 및 365일로 다르다. 약물 휴지기 동안의 용량 감소는 10% 내지 100%, 단지 예로서 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 및 100%일 수 있다.

[0478] 조성물이 1회 초과로 투여될 때, 각각의 투여는 동일한 행위자에 의해 그리고/또는 동일한 지리학적 위치에서 수행될 수 있다. 대안적으로, 각각의 투여는 상이한 행위자에 의해 그리고/또는 상이한 지리학적 위치에서 수행될 수 있다.

[0479] 인간 및 수의학적 치료와 관련하여, 투여되는 특정 리간드(들)의 양은 치료 중인 장애 및 장애의 중증도; 사용되는 특정 리간드(들)의 활성; 환자의 연령, 체중, 일반적 건강상태, 성별 및 식이요법; 투여 시간, 투여 경로 및 사용되는 특정 리간드(들)의 배설률; 치료 지속시간; 사용되는 특정 리간드(들)와 조합되거나 동시에 사용되는 약물; 처방하는 의사 또는 수의사의 판단; 및 의학 및 수의학 분야에 공지된 유사한 인자를 포함하는 다양한 인자에 의존할 수 있다. 유사하게, 주어진 조성물의 유효 농도는 환자 또는 대상의 연령, 성별, 체중, 일반적 상태 및 전반적 건강상태를 포함하는 다양한 인자에 좌우될 수 있다.

[0480] **키트**

[0481] 한 양태에서, 본 발명은 본 발명의 조작된 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터를 포함하는 키트를 제공한다. 한 양태에서, 본 발명은 본 발명의 조작된 수용체를 포함하는 키트를 제공한다.

[0482] 일부 실시태양에서, 키트는 (a) 본 발명의 조작된 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터; 및 (b) 본 발명의 비천연 리간드를 포함한다. 일부 실시태양에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 실시태양에서, 벡터는 AAV 벡터이다. 일부 실시태양에서, 키트는 벡터를 투여하기 위한 지침서를 포함한다. 일부 실시태양에서, 키트는 벡터의 투여에 적합한 장치를 포함한다.

[0483] 일부 실시태양에서, 키트는 (a) 본 발명의 조작된 수용체; 및 (b) 본 발명의 비천연 리간드를 포함한다.

[0484] 본 명세서에 기술된 조작된 수용체 및 본 발명의 키트를 포함할 수 있는 비천연 리간드의 예시적인 조합이 하기 표 29에 제공된다. 표 29의 조작된 수용체 각각은 단백질, 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드, 또는 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터로 존재할 수 있다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 α7-nAChR로부터 유도된 리간드 결합 도메인을 포함한다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 인간 글리신 수용체로부터 유래된 이온 기공 도메인을 포함한다. 일부 실시태양에서, 인간 글리신 수용체는 인간 글리신 수용체 α1이다. 일부 실시태양에서, 조작된 수용체는 표 29에 표시된 돌연변이를 제외하고 SEQ ID NO: 33과 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 적어도 99.5%, 또는 100% 동일하다.

표 29

[0485] **예시적 키트**

SEQ ID NO: 4에서 표시된 위치(들)에 해당하는 아미노산 치환(들)을 갖는 조작된 수용체	비천연 리간드	조작된 수용체의 비제한적 예
L131S_S172D	CNL001	CODA534
L131T_S172D	CNL001	CODA535
L131D_S172D	CNL002	CODA536
L131D_S172D	AZD-0328	CODA536
L131D_S172D	파시니클린	CODA536
Y115D_S170T	파시니클린	CODA805

Y115D_S170T	TC-6987	CODA805
Y115D_L131Q	AZD-0328	CODA806
Y115D_L131Q	파시니클린	CODA806
Y115D_L131Q	TC-6987	CODA806
Y115D_L131E	TC-5619	CODA807
Y115D_L131E	AZD-0328	CODA807
Y115D_L131E	파시니클린	CODA807
Y115D_L131E	TC-6987	CODA807
Y140I	CNL001	CODA952
Y140I	TC-5619	CODA952
Y140I	CNL002	CODA952
Y140I	파시니클린	CODA952
Y140C	CNL001	CODA965
Y140C	TC-5619	CODA965
Y140C	CNL002	CODA965
Y140C	ABT-126	CODA965
Y140C	TC-6987	CODA965
R101F_L131G	CNL001	CODA1025
R101F_L131G	TC-5619	CODA1025
R101F_L131G	CNL002	CODA1025
R101F_L131G	AZD-0328	CODA1025
R101F_L131G	TC-6987	CODA1025
R101F_L131G	바레니클린	CODA1025
R101F_L131D	CNL001	CODA1027
R101F_L131D	TC-5619	CODA1027
R101F_L131D	CNL002	CODA1027
R101F_L131D	TC-6987	CODA1027
Y115E_Y210W	TC-5619	CODA1039

Y115E_Y210W	CNL002	CODA1039
Y115E_Y210W	ABT-126	CODA1039
R101W_Y210V	TC-5619	CODA1045
R101F_Y210V	TC-5619	CODA1047
R101F_Y210F	CNL001	CODA1048
R101F_Y210F	TC-5619	CODA1048
R101M_L131A	CNL001	CODA1053
R101M_L131A	TC-5619	CODA1053
R101M_L131A	바레니클린	CODA1053
R101M_L131F	CNL001	CODA1054
R101M_L131F	TC-5619	CODA1054
R101M_L131F	바레니클린	CODA1054
R101W_Y115E_Y210W	TC-5619	CODA1055
R101F_Y115E_Y210W	TC-5619	CODA1056
W77F_R101F_L131D	CNL001	CODA1138
W77F_R101F_L131D	CNL002	CODA1138
W77F_R101F_L131D	ABT-126	CODA1138
R101F_L131N_S172D	CNL001	CODA1140
R101F_L131N_S172D	CNL002	CODA1140
Q139E_S172D	CNL001	CODA1157
Q139E_S172D	CNL002	CODA1157
S172D_Y210W	CNL001	CODA1173
S172D_Y210W	CNL002	CODA1173
S172D_Y210W	ABT-126	CODA1173
L131S_S172D	CNL001	CODA534
L131T_S172D	CNL001	CODA535
L131D_S172D	CNL002	CODA536

[0486] 일부 실시태양에서, 키트는 포장 재료 및 그 안의 하나 이상의 구성요소를 추가로 포함한다. 키트는 구성요소에 대한 설명 또는 내부 구성요소의 시험관내, 생체내 또는 생체외 사용 지침을 포함하는 표지 또는 포장 삽입물을 포함할 수 있다.

[0487] 표지 또는 삽입물은 그 안의 하나 이상의 성분, 투여량, 작용 기전을 포함하는 활성 성분(들)의 임상 약리학, 약동학 및 약력학의 식별 정보를 포함할 수 있다. 표지 또는 삽입물은 제조업체, 로트 번호, 제조업체 위치 및 날짜, 만료 날짜를 식별하는 정보를 포함할 수 있다. 표지 또는 삽입물은 제조업체 정보, 로트 번호, 제조업체 위치 및 날짜를 식별하는 정보를 포함할 수 있다. 표지 또는 삽입물은 키트 구성요소가 사용될 수 있는 질환에 대한 정보를 포함할 수 있다. 포지 또는 삽입물은 방법, 사용 또는 치료 프로토콜 또는 치료 요법에서 하나 이상의 키트 구성요소를 사용하기 위해 임상의 또는 대상을 위한 지침을 포함할 수 있다. 지침은 본 명세서에 기술된 임의의 방법, 용도, 치료 프로토콜 또는 예방적 또는 치료적 섭생을 실시하기 위한 투여량, 빈도 또는 기간 및 지침을 포함할 수 있다.

[0488] 표지 또는 삽입물은 예방적 또는 치료적 이점과 같이 구성요소가 제공할 수 있는 모든 이점에 대한 정보를 포함할 수 있다. 표지 또는 삽입물은 특정 조성물을 사용하는 것이 적절하지 않은 상황에 대해 대상 또는 임상의에게 경고하는 것과 같은 잠재적 부작용, 합병증 또는 반응에 대한 정보를 포함할 수 있다. 부작용 또는 합병증은 또한 대상이 조성물과 부적합할 수 있는 하나 이상의 다른 약물을 가지고 있거나 현재 복용 중이거나 현재 복용 중일 때, 또는 대상이 또 다른 부적합한 치료 프로토콜 또는 치료 요법을 받았거나 받을 예정이거나 현재 진행 중일 때 발생할 수 있다. 따라서 지침은 그러한 비호환성에 관한 정보를 포함할 수 있다.

[0489] 본 명세서에 인용된 모든 논문, 간행물 및 특허는 마치 각각의 개별 논문, 간행물 또는 특허가 구체적이고 개별적으로 참고로 포함되는 것처럼 참고로 본 명세서에 포함되며 인용된 공개공보와 함께 방법 및/또는 재료를 개시하고 기술하기 위해 참고로 본 명세서에 포함된다. 그러나, 본 명세서에 인용된 모든 참조, 기사, 간행물, 특허, 특허 간행물 및 특허 출원에 대한 언급은 이들이 유효한 선행 기술을 구성하거나 세계 어느 나라의 공통적인 일반 지식의 일부를 구성한다는 것을 인정하거나 어떤 형태의 제안으로 간주되어서는 안 된다.

[0490] 문맥상 달리 나타내지 않는 한, 본 명세서에 기술된 다양한 특징이 임의의 조합으로 사용될 수 있음을 구체적으로 의도한다.

[0491] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 기술자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다.

[0492] 상기 설명 및 하기 실시예는 본 발명의 범위를 예시하기 위한 것이지 제한하기 위한 것이 아님을 이해해야 한다. 본 발명의 범위 내의 다른 양태, 장점 및 수정은 본 발명이 속하는 기술 분야의 숙련자에게 명백할 것이다.

[0493] **실시예**

[0494] **실시예 1. 리간드 결합 도메인에서 돌연변이를 포함하는 조작된 수용체의 발견**

[0495] 인간 α7-nAChR의 비천연 소분자 효현제에 노출된 후 음이온 전류를 전도하는 LGIC를 생성하기 위해, 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR) 및 인간 GlyR1α에서 유래된 염화물 전도성 이온 기공 도메인은 유전적으로 조작되었다. SEQ ID NO: 33(CODA71)의 아미노산 서열을 가진 조작된 수용체가 확인되었으며, 이는 대략 야생형 α7-nAChR만큼 아세틸콜린, ABT-126 및 TC-6987에 민감하며, TC-6987은 야생형과 유시한 SEQ ID NO: 33에 대한 부분 효현제 활성을 나타낸다. SEQ ID NO: 33은 야생형보다 각각 니코틴에 약 2배 덜 민감하고 AZD-0328 및 파시니클린/RG3487에 대해 약 3배 및 10배 더 민감하다. CODA71은 WO2019104307 및 WO2021035179에 자세히 기술되어 있으며, 이들은 본 명세서에 그 전문이 포함되어 있다.

[0496] 아미노산 치환은 SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열로 조작된 수용체의 리간드 결합 도메인에 도입되었다. α7-nAChR의 각 리간드에 대한 결합 포켓이 모델링되었으며, 바인딩 포켓을 형성하는 아미노산 잔기가 매핑되었다. 이어서, 단일, 이중 및 삼중 돌연변이 키메라 LGIC의 라이브러리를 생성하였고, 각각의 돌연변이 키메라 LGIC는 SEQ ID NO: 33의 리간드 결합 포켓의 하나 이상의 아미노산에 치환을 포함하였다. 모 키메라 수용체(SEQ ID NO: 33) 표준 분자 생물학 기술에 의해 BamHI 및 EcoRI 사이트를 사용하여 pcDNA3.1(+)(Invitrogen)에 복제되었다. 부위 지정 돌연변이 유발에 의해 아미노산 치환을 도입하였다. 생성된 돌연변이의 목록은 상기 표 20에 제공되어 있다.

[0497] 생성된 모든 조작된 수용체는 천연 리간드, 아세틸콜린(Ach), 및 AZD-

0328(adisinsight.springer.com/drugs/800018503), TC-6987(drugbank.ca/drugs/DB14854), ABT-126(medchemexpress.com/Nelonicline.html), TC-5619(en.wikipedia.org/wiki/Bradanicline), TC-6683(pubchem.ncbi.nlm.nih. gov/compound/TC-6683_-Azd1446), 바레니클린(en.wikipedia.org/wiki/Varenicline), 파시니클린/RG3487(researchgate.net/figure/Molecular-structure-of-RG3487_fig1_47499934), CNL001 및 CNL002와 같은 비천연 리간드에 대한 효능에 대해 분석되었다.

[0498] **실시예 2: 고 처리량 형광 기반 플레이트 스크리닝을 사용한 조작된 수용체의 특징화**

[0499] 리간드에 대한 새로운 반응 프로파일을 갖는 것에 대해 이러한 돌연변이 LGIC를 스크리닝하기 위해, 고 처리량 형식으로 LGIC의 기능을 평가하기 위해 음이온 리포터 분석법을 개발하였다. 이 분석법에서, 형광이 음이온의 존재하에서 소광되는 YFP 리포터를 발현하는 세포를 관심 채널을 암호화하는 DNA로 형질감염시킨다. 리간드에 노출되면, 활성화된 채널이 음이온을 유출하여, 플레이트 판독기에서 감지할 수 있는 YFP의 용량 의존적 소광을 발생시킨다. 소광 신호가 클수록(즉, 값이 더 양수일수록) 수용체에 대한 리간드 활성이 더 높다.

[0500] Lenti-X 293T 세포(LX293T, Clontech)를 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(Invitrogen)을 함유하는 DMEM에서 유지시켰다. 플레이트 판독기 분석을 위해, LX293T 세포를 분석 2일 전에 음이온에 대해 향상된 민감도를 나타내는 돌연변이체 YFP(H148Q/I152L) 수용체를 안정하게 발현시키는 세포를 생성하는 렌티바이러스로 감염시키고, 폴리-d 라이신(써모 사이언티필(Thermo Scientific))으로 코팅한 96-웰 조직 배양 플레이트에서 20,000개의 세포/웰의 밀도로 세포를 분할하였다. 다음날, 세포를 표준 퓨겐(Fugene) 프로토콜(프로메가(Promega))을 이용하여 웰당 0.1㎍의 DNA로 일시적으로 형질감염시켰다. 분석 일에, 세포를 1X 세포외 용액(1X ECS: 140mM NaCl, 5mM KCl, 1mM MgCl2, 2mM CaCl2, 10mM HEPES, 10mM 글루코스, pH 7.2, mOsm 300)에서 2회 세척하였다. 마지막 세척 후에, 100㎕의 1X ECS를 웰에 첨가하였고, 플레이트를 37℃에서 30분 동안 인큐베이션시켰다. 플레이트를 인큐베이션시키는 동안, 약물을 1X ECS-NaI(140mM NaCl을 140mM NaI로 대체한 것을 제외하고 1X ECS와 동일한 성분)에서 2X 농도로 희석시켰다. 이어서, 플레이트를 플렉스스테이션3(Flexstation3)(몰레큘러 디바이시즈(Molecular Devices)) 상에서 판독하였다. 한 번에 8개의 웰로 플레이트의 각각의 웰을 2분 동안 플렉스스테이션3(몰레큘러 디바이시즈)를 이용하여 다음과 같이 판독한다: 1) 기준 YFP 형광을 17초 동안 판독하고, 2) 100㎕의 리간드를 첨가하고 나서, 3) 이어서, YFP 형광의 변화를 1분 내지 43초 동안 1.3초마다 측정한다.

[0501] **도 1a-1j**는 도면에 표시된 바와 같이 다양한 투여량의 아세틸콜린 또는 비-천연 리간드에 의한 자극 후 YFP 형광의 소광 백분율의 열 지도를 제공한다. CODA71(SEQ ID NO: 33)을 대조군으로 사용하였고, CODA75(SEQ ID NO: 29, 무반응 키메라 조작된 수용체)를 음성 대조군으로 사용하였다. 파란색 음영 세포로 표시된 형광 신호의 소광은 해당 농도에서 비천연 리간드에 의한 조작된 수용체 활성화 수준을 나타낸다. 결과는 조작된 수용체가 아세틸콜린 및 테스트된 비천연 리간드에 대해 다양한 효능을 갖는다는 것을 나타낸다(또한 상기 내용의 섹션 C1 "아미노산 돌연변이" 참조).

[0502] 이러한 열 지도의 수치 값은 아래 표 11-20에서 찾을 수 있다.

표 11

[0503] **아세틸콜린을 사용하는 YFP 형광 소광**

명칭	SEQ ID NO: 33에서 아미노산 돌연변이(들)	10 uM ach	30 uM ach	50 uM ach	100 uM ach	300 uM ach	500 uM ach	1 mM ach	3 mM ach	5 mM ach	10 mM ach
CODA71	-	15.61	63.31	73.16	74.94	65.94	62.78	74.24	76.27	77.15	77.96
CODA75	SEQ ID NO: 29	-12.88	-18.67	-0.29	-14.46	-16.31	-17.41	-16.46	-12.38	-20.88	-8.69
CODA217	W77F	-5.86			70.06			68.71	73.45		
CODA109	S170T	82.91	82.53	82.11	83.68			69.89	78.12		
CODA236	R101F	-18.24			60			66.07	71.38		

CODA237	R101M	-16.79			-18.63			46.28	69.31		
CODA238	R101W	-16.58			75.18			78.99	75.74		
CODA282	Y115D	6.81			1.19			-14.05	2.37		
CODA283	Y115E_N379K	-6.16			-11.12			-2.74	53.61		
CODA325	L131G	5.66			74.07			62.65	69.49		
CODA326	L131A	7.43			73.57			71.8	74.49		
CODA330	L131F	11.07			43.34			77.52	74.89		
CODA333	L131S	-10.11			-10.05			32.11	57.37		
CODA334	L131Q	-2.63	30.06		71.27			79.66	74.9		
CODA335	L131T	-9.13			-9.29			0.57	35.37		
CODA339	L131D	4.56			10.19			77.34	77.79		
CODA340	L131E	15.29	66.56		81.31			80.77	77.31		
CODA342	L131R	-2.57			-3.18			78.98	75.75		
CODA337	L131N	28.32			81.8			71.22	73.7		
CODA945	Q139E	-1.25			71.21			71.79	76.04		
CODA377	S172D	-3.19			0.07			71.7	76.95		
CODA405	Y210V	-6.31			-14.48			-2.82	1.06		
CODA407	Y210F	-3.75			-1.6			71.65	79.09		
CODA409	Y210W	-5.43			17.14			78.84	78.55		
CODA534	L131S_S172D	-11.3			-27.53			2.84	14.65		
CODA535	L131T_S172D	-12.24			-26.23			-1.16	2.97		
CODA536	L131D_S172D	-12.91			-20.88			79.85	79.98		

CODA805	Y115D_S170T	-0.46			-4.93			-11.18	-3.53		
CODA806	Y115D_L131Q	9.47			6.12			-1.56	17.57		
CODA807	Y115D_L131E	15.45			13.77			27.42	53.62		
CODA952	Y140I	-1.97			2.79			58.81	66.9		
CODA965	Y140C	-21.71			3.49			63.34	51.92		
CODA1025	R101F_L131G	12.57		-3.46	12.65	-6.96	-6.77	19.42	65.06		
CODA1027	R101F_L131D	-1.62		-1.6	-2.62	-6.12	-7.71	-5.73	33.69		
CODA1039	Y115E_Y210W	-2.97		-3.94	0.35	-4.13	-5.18	1.21	26.69		
CODA1045	R101W_Y210V	-2.52			-11.98	-16.71	-12.87	-14.41	-7.4		-1.5
CODA1047	R101F_Y210V	-4.26			-13.05	-11.73	-10.75	-8.81	-6.77		-1.03
CODA1048	R101F_Y210F				-17.31	-13.7	-10.1	5.53	68.61		78.22
CODA1053	R101M_L131A	-3.98			-11	-7.92	7.36	57.28	60.54		79.46
CODA1054	R101M_L131F	-3.98			-10.34	-10.25	-11.46	1.77	36.81		74.02
CODA1055	R101W_Y115E_Y210W				-15.63	-12.05	-12.87	-11.55	12.68		37.58
CODA1056	R101F_Y115E_Y210W				-20.55	-19.32	-19.75	-14.08	14.07		25.7
CODA1138	W77F_R101F_L131D	-12.92	-15.36		-19.35	-14.79		37.5	61.73		
CODA1140	R101F_L131N_S172D	-20.07	-16.92		-25.8	-11.21		9.02	45		
CODA1157	Q139E_S172D	-36.89	-37.78		-25.67	-18.94		16.38	45.71		
CODA1173	S172D_Y210W							-6.12	11.31		

표 12

[0504] CNL001을 사용하는 YFP 형광 소광

명칭	SEQ ID NO: 33에서 아미노산 돌연변이(들)	1nM CNL001	1nM CNL001	10nM CNL001	10nM CNL001	50nM CNL001	50nM CNL001	100nM CNL001	100nM CNL001	1uM CNL001	1uM CNL001
CODA71	-	3.727	20.231	81.096	82.368	83.62	84.482	84.297	85.368	85.647	86.358
CODA75	SEQ ID NO: 29	-8.496	-2.266	1.816	-4.649	-5.922	-5.597	-8.159	-5.058	-4.272	-1.281
CODA217	W77F	-22.273	-19.415	-9.563	6.398	61.938	66.837	79.791	80.908	83.444	83.905
CODA109	S170T	19.755	65.484	79.024	81.563	81.926	83.092	83	83.811	81.834	83.858
CODA236	R101F	9.048	26.601	71.533	72.948	75.895	74.238	76	75.861	76.367	76.162
CODA237	R101M	-2.114	-5.079	15.096	50.554	66.585	74.462	78	77.411	79.06	79.162
CODA238	R101W	32.42	54.768	75.149	75.339	75.881	77.844	78	78.575	81.126	79.482
CODA282	Y115D	-15.837	-6.519	-4.862	-8.244	-3.807	-2.871	-7.924	2.11	11.047	8.04
CODA283	Y115E_N379K	-0.713	-0.621	7.739	15.277	19.489	33.703	56.886	60.171	69.836	73.855
CODA325	L131G	74.429	78.715	79.033	79.322	79.966	80.091	81	79.701	79.289	80.581
CODA326	L131A	76.424	80.567	80.284	81.232	81.575	82.544	81	81.718	82.334	81.539
CODA330	L131F	76.289	78.896	79.339	80.245	80.831	80.605	81	80.663	81.293	81.428
CODA333	L131S	76.165	78.463	79.349	78.238	80.221	81.789	81.855	80.766	81.707	82.665
CODA334	L131Q	76.165	78.463	79.349	78.238	80.221	81.789	82	80.766	81.707	82.665
CODA335	L131T	-9.942	-0.475	17.889	38.46	61.741	69.159	73.635	76.092	80.633	79.637

CODA339	L131D	73.711	76.44	77.049	77.76	77.882	78.708	79.567	79.273	79.992	79.927
CODA340	L131E	76.413	77.144	78.258	78.763	79.757	79.327	79.011	79.948	79.855	80.618
CODA342	L131R	23.532	26.054	43.69	54.016	59.955	56.091	64.536	58.987	65.987	64.312
CODA337	L131N	76.917	79.554	79.479	79.506	81.465	81.297	82.619	81.722	81.96	81.773
CODA945	Q139E	6.65	13.512	78.678	82.723	84.91	84.849	85.046	84.642	85.493	86.071
CODA377	S172D	67.544	74.209	74.346	75.816	77.068	76.99	79.352	77.865	80.272	79.432
CODA405	Y210V	-16.246	-4.217	-6.142	-10.003	-11.054	-10.06	-3.832	-3.784	1.129	7.1
CODA407	Y210F	-10.845	-2.629	4.66	12.246	29.307	41.78	50.654	62.054	81.742	81.304
CODA409	Y210W	-8.914	-14.319	-1.444	4.393	11.897	11.434	12.719	16.053	14.077	15.495
CODA534	L131S_S172D	23.438	28.59	56.882	56.777	65.044	67.373	68.666	70.357	73.019	73.527
CODA535	L131T_S172D	8.736	24.572	60.552	63.09	73.242	73.889	76.147	76.21	78.988	78.818
CODA536	L131D_S172D										
CODA805	Y115D_S170T	-10.729	-15.278	-20.403	-14.905	-14.303	-15.741	-12.637	-10.606	-13.535	-11.335
CODA806	Y115D_L131Q	6.587	-5.179	-2.366	-1.272	2.763	1.995	3.091	1.45	7.331	9.103
CODA807	Y115D_L131E	0.885	-1.707	-0.567	0.043	5.141	9.409	9.796	11.009	27.914	29.109
CODA952	Y140I	0.368	-1.976	-3.923	4.348	74.107	75.866	80.323	81.996	83.489	82.208

CODA965	Y140C	-12.765	-12.608	68.134	71.394	80.298	82.159	82.404	82.14	82.34	80.649
CODA1025	R101F_L131G	-18.527	-21.577	14.063	49.818	77.765	79.23	80.544	80.695	81.191	82.385
CODA1027	R101F_L131D	24.049	36.755	52.927	61.449	67.308	68.77	69.049	71.613	71.811	69.907
CODA1039	Y115E_Y210W	-1.12	-3.941	6.275	11.943	12.949	18.635	17.576	18.319	19.329	20.672
CODA1045	R101W_Y210V	0.804	11.275	15.843	16.619	15.205	18.771	9.332	18.218	35.294	36.542
CODA1047	R101F_Y210V	-7.82	-8.382	-5.381	-1.431	-0.999	3.909	-0.823	-5.885	1.638	3.483
CODA1048	R101F_Y210F	9.114	0.845	28.944	53.629	68.581	74.379	80.541	80.774	83.143	81.751
CODA1053	R101M_L131A	-8.554	-13.711	39.631	66.809	82.122	82.031	83.312	83.986	84.363	83.877
CODA1054	R101M_L131F	21.932	39.689	54.192	64.111	71.409	70.989	74.148	71.722	71.378	71.411
CODA1055	R101W_Y115E_Y210W	-12.889	-13.295	-10.401	-7.981	-1.972	-1.661	0.277	4.325	2.88	3.259
CODA1056	R101F_Y115E_Y210W	-8.104	-12.153	-10.462	-4.735	-8.617	-1.606	-1.243	1.838	-0.567	4.663
CODA1138	W77F_R101F_L131D	-6.175	5.89	-2.032	7.601	9.263	4.423	24	30.448	73.823	73.271
CODA1140	R101F_L131N_S172D	52.592	61.248	71.678	71.881	73.807	75.649	76	76.329	76.168	74.076
CODA1157	Q139E_S172D	68.362	69.495	75.078	74.193	77.481	77.205	77	77.042	78.2	76.244
CODA1173	S172D_Y210W	16.321	30.264	61.978	65.343	73.006	74.903	76	76.759	76.928	76.619

표 13

[0505] TC-6683을 사용하는 YFP 형광 소광

명칭	SEQ ID NO: 33에서 아미노산 돌연변이(들)	30nM TC-6683	300nM TC-6683	3uM TC-6683	30uM TC-6683	100uM TC-6683
CODA71	-	-14.43	-13.08	-13.71	-14.02	-8.77
CODA282	Y115D	0.365	-6.865	-4.927	-11.259	-11.894
CODA325	L131G	-21.27	-18.33	-7.03	56.84	64.51
CODA326	L131A	-16.28	-11.73	-2.38	-9.77	0.97
CODA330	L131F	-22.26	-18.89	-9.45	-9.23	-10.75
CODA333	L131S	-23.88	-21.46	-21.07	-16.15	-18.96
CODA334	L131Q	-17.99	-23.26	-18.84	-16.92	-15.59
CODA335	L131T	-13.84	-20.66	-17.86	-18.91	-16.88
CODA339	L131D	-18.32	-17.25	-10	-8.51	-9.77
CODA340	L131E	30.14	33.02	41.68	35.75	24.32
CODA342	L131R	-16.26	-22.45	-13.48	-12.68	-10.33
CODA337	L131N	-11.51	-13.17	-5.46	8.53	14.41
CODA945	Q139E	-26.47	-18.62	-13.39	-16.6	-12.89
CODA377	S172D	-20.23	-13.94	-14.17	1.86	43.61
CODA534	L131S_S172D	-22.464	-23.976	-24.897	-20.474	-22.253
CODA535	L131T_S172D	-29.362	-28.954	-23.708	-23.431	-18.324
CODA536	L131D_S172D	-22.285	-23.926	-20.514	-3.078	7.37
CODA807	Y115D_L131E	-26.801	-25.363	-23.651	-26.235	-24.182
CODA952	Y140I	-27.7	-26.87	-31.2	-33.12	-24.67
CODA965	Y140C	-8.21	-16.37	-19.48	-24.32	-24.99
CODA1025	R101F_L131G	-1.645	3.043	0.082	2.449	10.437
CODA1027	R101F_L131D	1.189	0.939	1.327	-0.845	-3.136
CODA1039	Y115E_Y210W	-1.608	-3.491	-6.153	-9.263	-9.19
CODA1045	R101W_Y210V	1.735	0.642	2.403	6.006	-4.277
CODA1047	R101F_Y210V	-24.195	-24.234	-21.291	-16.363	-24.9
CODA1048	R101F_Y210F	-29.055	-33.935	-24.613	-21.752	-22.815
CODA1054	R101M_L131F	-22.996	-27.055	-18.611	-13.879	-21.521
CODA1055	R101W_Y115E_Y210W	-30.056	-30.801	-25.558	-18.295	-17.554
CODA1056	R101F_Y115E_Y210W	-19.889	-22.443	-12.623	-10.728	-10.959

표 14

[0506] TC-5619/브라다니클린을 사용하는 YFP 형광 소광

명칭	SEQ ID NO: 33에서 아미노산 돌연변이(들)	1 nM brd	3 nM brd	10 nM brd	30 nM brd	100 nM brd	300 nM brd	1 uM brd
CODA71	-	9.41	44.38	76.61	70.23	78.62	75.51	
CODA75	SEQ ID NO: 29	-13.39	-15.78	-13.47	-16.41		-17.56	
CODA217	W77F		-12.1		-14.72		-6.3	
CODA109	S170T		70.58		80.71		80.66	
CODA236	R101F		49.33		77.38		77.51	
CODA237	R101M		-14.87		69.93		76.57	
CODA238	R101W		74.7		76.78		77.01	
CODA282	Y115D	-0.54	-7.22	-2.82	-16.67	-0.02	-12.37	31.23
CODA283	Y115E_N379K	0.59	-6.41	-1.58	-14.24	33.36	43.81	75.39
CODA325	L131G		68.45		76.95		77.1	
CODA326	L131A		72.24		77.4		78.02	
CODA330	L131F	-12.4	25.12	72.19	76.35	78.94	77.06	78.61
CODA333	L131S	-0.85	-2.05	-2.8	-2.07	30.34	50.56	72.42
CODA334	L131Q		41.92		63.65		64.85	
CODA335	L131T	-2.39	-4.08	-3.3	-9.69	-1.05	10.53	34.72
CODA339	L131D	4.12	19.15	68.98	77.29	81.41	75.79	82.26
CODA340	L131E		68.57		76.85		78.49	
CODA342	L131R	-7.83	-12.89	-10.47	59.48	70.19	75.11	77.42

CODA337	L131N		71.02		78.43		77.12	
CODA945	Q139E		14.15		78.18		76.8	
CODA377	S172D	0.77	-4.59	0.06	-10.48	0.25	-10.61	3.82
CODA405	Y210V		9.92		4.37		59	
CODA407	Y210F		-0.53		8.71		76.26	
CODA409	Y210W	-13.45	-0.64	37.3	76.36	72.72	75.47	78.73
CODA534	L131S_S172D	-1.13	-3.83	-3.78		-2.03		1.68
CODA536	L131D_S172D	-1.24	0.25	-2.57	0.78	4.51	30.97	44.41
CODA805	Y115D_S170T	-9.78	-12.06	-9.02	-16.3	-7.44	-10.93	-4.55
CODA806	Y115D_L131Q	0.92	-4.65	0.38	-8.96	12.18	-0.3	45.47
CODA807	Y115D_L131E	-1.52	-5.35	-3.49	-2.16	4.18	70.2	43.11
CODA952	Y140I		-2.45		66.97		78.48	
CODA965	Y140C		-18.49		22.66		38.02	
CODA1025	R101F_L131G	-10.61	2.63	17.71	68.48		75.12	
CODA1027	R101F_L131D	-10.07	-0.8	1.74	53.95		76.74	
CODA1039	Y115E_Y210W	-5.55	6.78	-2.7	34.43		70.05	
CODA1045	R101W_Y210V	-1.431	-14.993	-5.52	15.49	72.105	71.411	
CODA1047	R101F_Y210V	-5.548	-9.432	-3.068	2.368	47.529	74.413	
CODA1048	R101F_Y210F	-2.084	-9.098	-2.587	55.818	76.957	74.268	
CODA1053	R101M_L131A	0.008	43.21	77.672	76.277	76.856	75.32	
CODA1054	R101M_L131F	6.609	-7.635	4.459	69.782	77.633	72.933	
CODA1055	R101W_Y115E_Y210W	-8.113	-11.136	38.755	39.111	61.378	52.398	
CODA1056	R101F_Y115E_Y210W	-7.894	-11.812	36.211	40.624	65.869	59.661	

표 15

[0507] CNL002를 사용하는 YFP 형광 소광

명칭	SEQ ID NO: 33에서 아미노산 돌연변이(들)	1nM CNL002	10nM CNL002	50nM CNL002	100 nM CNL002	1 uM CNL002	30 uM CNL002
CODA71	-				49.61	74.15	75.21
CODA75	SEQ ID NO: 29				-7.94	-9.81	-15.27
CODA217	W77F				67.81	69.42	73.64
CODA109	S170T				73.48	70.03	
CODA236	R101F				-9.56	56.9	70.28
CODA237	R101M				-8.68	-2.24	66.99
CODA238	R101W				2.95	67.93	73.02
CODA282	Y115D				-9.7	-8.37	3.4
CODA283	Y115E_N379K				-5.81	9.69	-12.85
CODA325	L131G				45.62	74.72	77.4
CODA326	L131A				27.88	73.79	75.89
CODA330	L131F				-3.76	68.51	77.77
CODA333	L131S				-15.44	15.21	
CODA334	L131Q				49.9	80.72	80.97
CODA335	L131T				-14.53	6.45	57.43
CODA339	L131D				12.83	77.73	80.58
CODA340	L131E				49.97	67.8	64.58
CODA342	L131R				-17.2	8.12	57.24
CODA337	L131N				76.37	80.18	80.93
CODA945	Q139E				60.5	75.41	77.46
CODA377	S172D				59.35	79.26	79.96
CODA405	Y210V				-14.3	-7.56	-2.02
CODA407	Y210F				-12.47	-3.93	80.97
CODA409	Y210W				-14.92	-0.85	29.62
CODA534	L131S_S172D				14.26	45.55	64.93
CODA535	L131T_S172D				1.23	35.77	68.29
CODA536	L131D_S172D				71.72	77.26	77.5
CODA805	Y115D_S170T				-18.17	-15.2	-14

CODA806	Y115D_L131Q				-10.03	-3.33	6.96
CODA807	Y115D_L131E				-5.71	13.03	25.2
CODA952	Y140I				32.58	69.08	73.28
CODA965	Y140C				43.24	42.72	51.43
CODA1025	R101F_L131G				12.48	46.04	39.82
CODA1027	R101F_L131D				7.75	61.97	65.77
CODA1039	Y115E_Y210W				21.85	47.37	59.97
CODA1138	W77F_R101F_L131D	-2.209	43.044	73.418	81.66	81.69	
CODA1140	R101F_L131N_S172D	0.337	59.894	76.501	79.03	82.85	
CODA1157	Q139E_S172D				80.62	81.32	
CODA1173	S172D_Y210W				70.15	77.33	

표 16

[0508] ABT-126을 사용하는 YFP 형광 소광

명칭	SEQ ID NO: 33에서 아미노산 돌연변이(들)	50 nM abt	100 nM abt	300 nM abt	500 nM abt	1 uM abt	3 uM abt	10 uM abt	30 uM abt	50 uM abt
CODA71	-	-1.98	24.27	56.8	76.28	73.16	70.98	72.62	77.49	77.96
CODA75	SEQ ID NO: 29	-17.07	-16.76	-16.76	-14.68	-16	-14.11	-13.98	-21.05	-21.35
CODA217	W77F	37.81	57.31	12.61		66.05				
CODA109	S170T	55.83	68.89	72.52		70.96				
CODA236	R101F	-18.69	-23.01	-20.92		4.99				
CODA237	R101M	-24.34	-20.22	-20.57		-19.55				
CODA238	R101W	-14.97	-14.66	-16.35		50.02				
CODA282	Y115D	-21.22	-19.7	-15.55		-14.31				
CODA283	Y115E_N379K	-22.65	-20.55	-12.93		1.71				
CODA325	L131G	-17.39	6.89	38.65		45.82				
CODA326	L131A	-21.91	-0.5	34.86		56.66				

CODA330	L131F	-16.22	-11.89	39.23		66.5				
CODA333	L131S	-20.99	-16.21	-13.34		4.96				
CODA334	L131Q	23.65	61.83	76.44		77.68				
CODA335	L131T	-18	-16.39	-15.05		-5.56				
CODA339	L131D	-16.65	-12.3	18.5		59.09				
CODA340	L131E	2.2	25.39	36.48		50.76				
CODA342	L131R	-18.14	-18.14	-0.81	23.29	45.76	53.03	64.08	71.98	73.98
CODA337	L131N	-11.64	34.79	60.08		65.99				
CODA945	Q139E	-8.27	4.76	30.88		60.66				
CODA377	S172D	-1.53	18.18	59.15		72.28				
CODA405	Y210V	-2.9	-2.06	-0.19		-3.64				
CODA407	Y210F	-13.07	0.1	5.97		50.23				
CODA409	Y210W	8.23	55.53	74.82	77.39	77.77	69.33	74.79	75.61	75.72
CODA534	L131S_S172D	-11.96	-10.72	11.65		-3.06				
CODA535	L131T_S172D	-11.09	-10.37	-4		4.05				
CODA536	L131D_S172D	-3.19	7.58	-1.65		31.29				

CODA805	Y115D_S170T	-11.83	-11.5	-8.01		-9.34				
CODA806	Y115D_L131Q	-1.81	-2.61	-3.78		-2.6				
CODA807	Y115D_L131E	-1.68	-2.25	-2.37		3.68				
CODA952	Y140I	-12.34	-11.57	-5.21		3.93				
CODA965	Y140C	-10.75	-4.11	18.93		52.64				
CODA1025	R101F_L131G	-11.53	-7.61	6.55		25.08				
CODA1027	R101F_L131D	-11.89	-16.07	-11.21		-9.38				
CODA1039	Y115E_Y210W	-17.32	-13.93	9.9	36.97	48.37	50.5	58.13	64.1	66.67
CODA1045	R101W_Y210V	-24.16	-24.7	-16.09		-11.61				
CODA1047	R101F_Y210V	-14.1	-11.72	-12.98		-15.09				
CODA1048	R101F_Y210F	-23.28	-21.78	-19.35		-16.33				
CODA1053	R101M_L131A	-27.01	-18.76	-17.8		-6.55				
CODA1054	R101M_L131F	-19.54	-18.28	-16.87		-11.77				
CODA1055	R101W_Y115E_Y210W	-21.36	-22.28	-14.63		-7.34				
CODA1056	R101F_Y115E_Y210W	-20.96	-21.95	-10.96		10.79				
CODA1138	W77F_R101F_L131D	-11.71	-5.13	15.09		56.63		75.93		

CODA1140	R101F_L131N_S172D	-7.87	-5.35	-3.67		3.64		5.91		
CODA1157	Q139E_S172D	-26.77	-24.64	-10.64		19.57		55.64		
CODA1173	S172D_Y210W	5.15	25.08	66.86		66.94		78.67		

표 17

[0509] AZD-0328을 사용하는 YFP 형광 소광

명칭	SEQ ID NO: 33에서 아미노산 돌연변이(들)	100 nM azd0328	300 nM azd0328	1 uM azd0328	10 uM azd0328	30 uM azd0328
CODA71	-	73.59	78.09			79.05
CODA75	SEQ ID NO: 29	-8.83	-11.15			-11.92
CODA217	W77F	-7.57	7.08			81.59
CODA109	S170T	84.01	87.08			87.27
CODA236	R101F	-9.78	49.64			81.14
CODA237	R101M	-17.84	-11.98			81.2
CODA238	R101W	22.94	75.38			81.8
CODA282	Y115D	3.19	4.79			76.78
CODA283	Y115E_N379K	-2.1	38.2			79.44
CODA325	L131G	79.75	80.62			80.19
CODA326	L131A	80.39	82.07			82.23
CODA330	L131F	27.56	73.35			77.14
CODA333	L131S	38.49	67.13			80.61
CODA334	L131Q	80.55	83.15			82.53
CODA335	L131T	11.33	44.15			80.96
CODA339	L131D	62.87	77.03			78.63
CODA340	L131E	82.48	82.04			81.8
CODA342	L131R	1.79	66.58			80.55
CODA337	L131N	82.1	82.52			82.32
CODA945	Q139E	-5.79	58.47			66.57
CODA377	S172D	65.04	81.73			82.3
CODA405	Y210V	-8.13	-3.35			-2.86
CODA407	Y210F	0.85	1.25			82.08
CODA409	Y210W	-6.57	-4.84			81.64
CODA534	L131S_S172D	-9.32	4.94			60.61
CODA535	L131T_S172D	-7.02	-0.48			70.16
CODA536	L131D_S172D	51.44	77.12			79.26
CODA805	Y115D_S170T	-0.71	-1.73			47.39
CODA806	Y115D_L131Q	12.15	30.92			68.65
CODA807	Y115D_L131E	24.49	45.34			71.21
CODA952	Y140I	-12.96	-13.21			68.5
CODA965	Y140C	-16.69	1.3			21.78
CODA1025	R101F_L131G	6.26	37.98			79.31
CODA1027	R101F_L131D	-4.76	-7.52			74.9
CODA1039	Y115E_Y210W	-10.45	-13			30.76

표 18

[0510] 파시니클린을 사용하는 YFP 형광 소광

명칭	SEQ ID NO: 33에서 아미노산 돌연변이(들)	30 nM fac	50 nM fac	100 nM fac	300 nM fac	1 uM fac	10 uM fac	30 uM fac
CODA71	-	53.42		83.6	77.44			79.62
CODA75	SEQ ID NO: 29	-11.68		4.35	-10.55			-5.25
CODA217	W77F	-10.14			68.29			87.35
CODA109	S170T	76.45		82.45	71.09			69.41
CODA236	R101F	-28.54			72.98			87.6
CODA237	R101M	-24.14			-14.38			88.78
CODA238	R101W	-19.61			76.54			87.94
CODA282	Y115D	10.17		24.77	51.04		79.76	81.7
CODA283	Y115E_N379K	6.39			78.36		81.93	78.63
CODA325	L131G	75.75			78.01			76.61
CODA326	L131A	69.94			80.07			78.32
CODA330	L131F	2.9			74.96		81.97	78.31
CODA333	L131S	6.27			69.8		80.07	81.35
CODA334	L131Q	83.07		85.36	84.19			82.75
CODA335	L131T	1.24			46.92		79.06	81.06
CODA339	L131D	12.67			80.4		82.18	82.14
CODA340	L131E	82.51		83.6	82.92			82.68
CODA342	L131R	-6.2			76.75		82.16	81.71
CODA337	L131N	82.25			83.59			82.82
CODA945	Q139E	-7.16			71.17			72.14
CODA377	S172D	4.93			84.13		66.96	85.29
CODA405	Y210V	-26.25			-23.52			0.83
CODA407	Y210F	-21.94			-22.46			82.63
CODA409	Y210W	-10.93			-5.82		60.97	57.77
CODA534	L131S_S172D	-23.44			2.75		69.71	61.44
CODA535	L131T_S172D	-21.36			4.17			65.94
CODA536	L131D_S172D	24.15			80.17		81.34	79.9
CODA805	Y115D_S170T	38.08		-14.37	19.41		67.33	79.67
CODA806	Y115D_L131Q	41.32		59.51	74.86		78.53	84.45
CODA807	Y115D_L131E	45.76		63.92	79.43		80.1	84.91
CODA952	Y140I	-8.83			51.6			71.01
CODA965	Y140C	-12.29			20.11			37.62
CODA1025	R101F_L131G	-8.99			10.21			78.24
CODA1027	R101F_L131D	-10.05			-12.54			70.96
CODA1039	Y115E_Y210W	-13.46			5.43			49.06

표 19

[0511] TC-6987을 사용하는 YFP 형광 소광

명칭	SEQ ID NO: 33에서 아미노산 돌연변이(들)	1 uM tc6987	3 uM tc6987	5 uM tc6987	10 uM tc6987	30 uM tc6987	50 uM tc6987	100 uM tc6987	300 uM tc6987	500 uM tc6987
CODA71	-	31.56	31.82	30.75	56.68	51.46	61.26	43.21	7.79	51.58
CODA75	SEQ ID NO: 29	-11.79			-14.31					-19.65
CODA217	W77F	-10.35			-13.93					-7.54
CODA109	S170T	71.45			71.04					66.2
CODA236	R101F	45.34			70.04					75.86
CODA237	R101M	-21.62			21.52					60.33
CODA238	R101W	72.47			72.04					76.56
CODA282	Y115D	13.01			14.73					14.29
CODA283	Y115E_N379K	-9.54			-7.06					-15.15

CODA325	L131G	64.59			76.28					70.95
CODA326	L131A	73.37			78.18					75.42
CODA330	L131F	53.37			74.23					72.25
CODA333	L131S	-3.87	-20.2	-15.25	4.92	14.75	21.33	29.7	20.79	44.37
CODA334	L131Q	74.1			81.7					80.18
CODA335	L131T	-0.14	-8.32	-2.13	0.13	-6.86	-9.5	-10.98	-12.16	-2.41
CODA339	L131D	50	80.39	79.93	80.99	83.11	83.18	82.16	64.58	76.77
CODA340	L131E	80.13			81.29					79.6
CODA342	L131R	2.51			46.22					68.33
CODA337	L131N	79.06			82.36					80.19
CODA945	Q139E	-0.97			21.53					7.39
CODA377	S172D	-9.74	-14.04	-0.95	-7.41	-16.12	-12.79	-11.77	-19.68	-17.02
CODA405	Y210V	-22.63			-23.03					-40.88
CODA407	Y210F	-15.22			-19.89					-33.32
CODA409	Y210W	62.82			78.66					70.35
CODA534	L131S_S172D	-20.99			-27.62					-24.22
CODA535	L131T_S172D	-21.8			-27.08					-21.56
CODA536	L131D_S172D	-18.24			-23.06					-19.3
CODA805	Y115D_S170T	31.9			25.54					21.13
CODA806	Y115D_L131Q	38.83			31.59					29.83
CODA807	Y115D_L131E	36.07			31.35					28.18
CODA952	Y140I	6.03			2.25					-0.24
CODA965	Y140C	2.73			30.37					33.07
CODA1025	R101F_L131G	-13.32			43.71					53.98
CODA1027	R101F_L131D	0.88			56.27					71.3
CODA1039	Y115E_Y210W	7.26			11					7.97

표 20

[0512] **바레니클린을 사용하는 YFP 형광 소광**

명칭	SEQ ID NO: 33에서 아미노산 돌연변이(들)	3nM var	3nM var	30nM var	30nM var	300nM var	300nM var	500nM var	500nM var	1uM var	1uM var
CODA71	-	-2.36	-3.522	-4.255	-3.636	46.195	45.522	69.253	71.705	79.254	79.244
CODA75	SEQ ID NO: 29	4.161	-6.216	-5.173	-6.593	-5.733	-7.312	-10.35	-7.586	-5.637	-3.757
CODA217	W77F	5.662	7.57	13.968	19.079	16.183	18.025	23.366	19.206	34.69	30.504
CODA109	S170T	-20.96	-19.953	-16.094	-21.502	64.373	71.198	71.892	73.53	75.461	78.578
CODA236	R101F	19.949	22.334	15.764	16.213	23.135	22.987	35.048	34.188	71.031	71.005
CODA237	R101M	18.429	16.83	23.07	15.868	18.819	19.155	19.117	22.593	24.525	23.383
CODA238	R101W	17.896	12.564	16.263	22.117	77.492	79.056	80.186	80.065	81.263	80.702
CODA282	Y115D	2.111	-12.265	-4.433	-6.153	-0.861	-1.308	0.733	-4.633	-4.512	0.02
CODA283	Y115E_N379K										
CODA325	L131G	-12.241	-9.415	75.334	72.278	78.305	77.83	75.936	76.788	77.805	77.352
CODA326	L131A	-5.939	-2.294	68.663	70.718	79.88	79.742	79.311	80.029	80.952	79.329
CODA330	L131F	-3.016	-1.452	-0.193	-1.853	6.915	6.513	27.593	29.863	67.499	65.57
CODA333	L131S	-4.782	1.048	2.084	5.022	12.162	12.979	29.238	25.614	43.863	39.346
CODA334	L131Q	-5.192	-4.327	-0.688	0.672	75.189	74.923	79.048	80.337	79.766	76.836
CODA335	L131T	0.398	3.947	5.31	7.666	4.327	3.275	1.835	4.863	9.471	7.505
CODA339	L131D	-0.902	-7.62	-6.009	-3.447	49.328	47.685	66.7	64.798	70.85	69.038
CODA340	L131E	-4.061	-0.568	62.964	63.631	74.912	75.084	76.346	75.876	75.805	74.856
CODA342	L131R	0.271	-3.613	-4.935	-4.363	0.282	2.32	23.777	18.376	66.17	66.088

CODA337	L131N	3.093	12.327	77.097	77.653	79.446	79.998	80.691	80.309	80.258	79.509
CODA945	Q139E	8.207	7.835	9.509	10.204	9.818	12.539	16.762	15.21	48.292	54.096
CODA377	S172D	-3.433	-5.737	-5.319	-6.175	-4.135	-8.614	-6.062	-6.125	-14.134	-15.373
CODA405	Y210V	7.317	7.643	9.457	9.134	15.503	11.954	13.427	10.784	9.032	11.591
CODA407	Y210F	2.441	7.326	1.275	12.96	13.119	2.355	11.539	6.571	8.397	7.309
CODA409	Y210W	7.776	-2.964	-5.568	3.024	2.815	3.06	1.766	2.819	1.844	-4.059
CODA952	Y140I	-22.522	-18.173	-15.306	-12.832	-14.671	-17.016	-16.713	-18.893	-15.847	-16.236
CODA965	Y140C	-17.716	-23.019	-14.993	-12.182	-11.731	-10.13	-12.518	-15.043	-13.385	-17.022
CODA1025	R101F_L131G	48.074	60.978	70.023	69.433	78.989	79.21	79.212	79.771	79.538	80.577
CODA1027	R101F_L131D	-3.367	-0.431	-0.761	2.989	2.966	10.211	15.278	20.84	37.104	42.439
CODA1039	Y115E_Y210W	-10.926	-7.395	-5.661	-1.244	-4.555	1.081	9.172	12.561	7.139	12.664
CODA1045	R101W_Y210V	6.745	8.397	14.1	19.095	16.83	21.507	21.586	23.131	31.591	26.479
CODA1047	R101F_Y210V	-3.035	-0.786	-5.181	0.669	-2.748	-6.708	-9.123	-9.869	-6.702	-7.26
CODA1048	R101F_Y210F	-17.119	-13.234	-7.747	4.193	4.149	1.512	-1.572	3.71	8.414	4.091
CODA1053	R101M_L131A	74.835	76.119	77.608	79.015	80.71	79.002	78.709	78.884	79.688	80
CODA1054	R101M_L131F	34.923	28.944	42.214	43.015	47.059	52.768	59.542	62.641	71.449	69.145
CODA1055	R101W_Y115E_Y210W	0.468	-10.015	-15.532	-14.462	-17.027	-15.59	-13.343	-10.702	-6.604	-7.612
CODA1056	R101F_Y115E_Y210W										
CODA1138	W77F_R101F_L131D	3.893	1.107	0.972	0.872	2.282	-0.288	3.637	-1.804	-1.84	6.36
CODA1140	R101F_L131N_S172D	-6.169	-10.445	-9.679	-10.878	-9.572	-8.873	-14.656	-11.304	-13.996	-16.128
CODA1157	Q139E_S172D	-0.225	-1.954	1.269	5.972	6.84	5.943	8.717	6.41	5.635	7.068
CODA1173	S172D_Y210W	9.211	7.193	7.821	9.078	6.933	8.36	5.501	7.04	7.174	5.185

[0513] 하기 **표 21**은 표시된 돌연변이체에 대한 한 세트의 실험으로부터의 EC50 값을 열거하고, 여기서 아래 실시예 3에 기술된 바와 같이 YFP 형광 플레이트 판독기 실험으로부터 결정된 Ach 및 TC-5619에 대한 EC50 값은 전기생리학 연구로부터의 EC50 값과 비교된다. 표 21의 결과는 YFP 형광 플레이트 판독기 실험으로부터 유도된 EC50 값이 아래 실시예 3에 기술된 바와 같은 고처리량 전기생리학(ephys) 연구로부터 유도된 것과 매우 일치함을 입증한다.

표 21

[0514] **아세틸콜린 또는 TC-5619에 대한 조작된 수용체의 EC50 값**

	아세틸콜린		TC-5619	
명칭	EC50 (플레이트 리더)	EC50 (ephys)	EC50 (플레이트 리더)	EC50 (ephys)
CODA536	359 μM		757 nM	
CODA534	>3mM		>1 μM	
CODA535	>3mM			
CODA1027	>3mM	3.88 mM	23.5 nM	25 nM
CODA1025	1.28 mM	993 uM	14 nM	17 nM
COAD1056	>3mM	4.18 mM	25.1 nM	42.1 nM

CODA1048	1.39 mM	4.78 mM	21.5 nM	41.2 nM
CODA1047	>3mM	14.4 mM	77 nM	159 nM
CODA1053	650 uM	1.74 mM	2.62 nM	3.58 nM
CODA1054	2.88 mM	4.74 mM	18.3 nM	21.8 nM
COAD1055	>3mM	3.86 mM	23.5 nM	10.6 nM
CODA1045	>3mM	11.8 mM	60.5 nM	70.4 nM
CODA807	1.74 mM		149 nM	
CODA806	4.61 mM		968 nM	
CODA805	>3mM		>1 μM	
CODA1039	>3mM	4.82 mM	30.1 nM	99.3 nM
CODA952	575 μM	1.74 mM	19.3 nM	

[0515] **실시예 3: 고 처리량 전기생리학을 사용한 조작된 수용체의 특징화**

[0516] 플레이트 판독기에 의해 결정된 EC50을 확인하고 최대 전류 흐름에 대한 더 나은 이해를 개발하기 위해, 조작된 수용체를 하기 기술된 바와 같이 고 처리량 전기생리학 시스템에 적용시켰다. HEK293T 연구를 위해, 이온 통로를 암호화하는 cDNA를 표준 재조합 기법을 이용하여 pcDNA3.1 내로 복제시켰다. 클론테크(Clontech)(Lenti-X™ 293T 세포주)로부터의 HEK293T 세포를 표준 세포 배양 프로토콜을 이용하여 10% FBS 및 1% 페니실린/스트렙토마이신으로 보충한 DMEM에서 40 내지 50% 합류까지 배양시키고 나서, 퓨겐 6을 이용하여 15㎝ 접시당 18㎍의 농도로 이온 통로 플라스미드로 감염시키고, 추가 24시간 동안 성장시켰다. 그런 다음, 전체 세포 구성을 확립하기 위해 용량-반응 관계를 미세유체학 기반 플랫폼을 통해 평가할 수 있는 전기생리학적 시스템(IonFluxHT 및/또는 머큐리(Mercury), 플럭시온 바이오사이언시즈) 상에서 세포를 분석하였다. 리나그(Lynagh) 및 린치(Lynch)로부터 적합하게 된 바와 같은 세포외 완충제(140mM NaCl, 5mM KCl, 2mM $CaCl_2$, 1mM $MgCl_2$, 10mM HEPES, 및 10mM 글루코스, NaOH를 이용하여pH 7.2, mOsm 310), 세포내 완충제(145mM CsCl, 2mM CaCl2, 2mM MgCl2, 10mM HEPES, 및 10mM EGTA, CsOH를 이용하여 pH 7.2, mOsm 305), 및 세포외 완충제로 희석시킨 시험 화합물(새로 제조한 저장액)로 앙상블 플레이트를 프라이밍시켰다. 그런 다음, 세포를 아큐타제(Accutase)를 이용하여 플레이트로부터 방출시키고 나서, 원심분리시키고, 세포외 완충제에서 재현탁시키고 나서, 앙상블 플레이트에 부하하였다. 그런 다음, 세포에 전체 세포 구성을 프라이밍, 트래핑, 파괴 및 확립하기 위한 표준 프로토콜을 실시하였고, 세포를 기록 내내 -60mV에서 보유하였다. 기준을 기록한 후에, 용량 반응 관계를 평가하기 위해 이온플럭스(IonFlux) 소프트웨어를 이용하여 시험 화합물의 점진적 용량을 적용하였다. 그런 다음, 데이터를 .csv 형식으로 전환시키기 위해 맞춤 파이썬(Python) 스크립트를 이용하여 데이터를 오프라인 분석하였고, 흔적을 재플롯팅하고 나서, QC 측정을 적용하여 불안정한 기록을 거부하였다(즉, 기준에서의 접근 저항 및/또는 표준 편차에 기반한 문턱값뿐만 아니라 인공물 기각). 이어서, 피크 전류를 계산하고, 힐 식에 의해 기재된 바와 같이 4-모수 로지스틱 식을 이용하여 집단 데이터를 적합화하였다. 전류는 약물의 1초 첨가 후 자동 패치 클램프 시스템(Fluxion Biosciences)에서 측정하였고 계산된 EC50 값은 하기 **표 22** 및 위 **표 21**(실시예 2에서)에 표로 작성되었다.

표 22

[0517] **고 처리량 전기생리학의 EC50**

		고 처리량 Ephys EC50 (uM)					
		HEK293 Cell Line					
명칭	**SEQ ID NO: 33에서 아미노산 돌연변이(들)**	**아세틸콜린**	**TC-5619**	**CNL002**	**파시니클린**	***TC-6987***	***AZD-0328***
Wild type nAchRa7	n/a	47.9			2.2	3.5	1.2
CODA71	-	74.1	0.04	0.132	0.24		
CODA282	Y115D	26887			0.7		
CODA283	Y115E	2295			0.1		
CODA333	L131S	1759			0.73	26.5	0.45
CODA335	L131T	6015			1.76		2.92
CODA339	L131D	532			0.41	5.42	0.33
CODA377	S172D	1037			0.39		0.3
CODA536	L131D, S172D	345			0.132		

CODA534	L131S, S172D	1410	__	__	0.193		3.89
CODA535	L131T, S172D	3850	__	__	2.65		5.5
CODA805	Y115D, S170T	30000			2.47		
CODA806	Y115D, L131Q	28000			0.145		
CODA807	Y115D, L131E	1790			0.095		
CODA952	Y140I	1740	0.311				
CODA1025	R101F, L131G	993 μ0.017					
CODA1027	R101F, L131D	3880	0.025				
CODA1039	Y115E, Y210W	4820	0.099				
CODA1045	R101W, Y210V	11800	0.0704				
CODA1047	R101F, Y210V	14400	0.159				
CODA1048	R101F, Y210F	4780	0.041				
CODA1053	R101M, L131A	1740	0.0036				
CODA1054	R101M, L131F	4740	0.0218				
COAD1055	R101W,Y115E, Y210W	3860	0.0106				
COAD1056	R101F,Y115E, Y210W	4180	0.042				
CODA1138	W77F,R101F, L131D	1900		0.041			
CODA1140	R101F,L131N, S172D	3640		0.019			
CODA1157	Q139E,S172D	7000		0.011			
CODA1173	S172D,Y210W	14000		0.027			

[0518] 이러한 결과는 모든 돌연변이 조작된 수용체가 야생형 nAchRa7 또는 SEQ ID NO: 33 대조군과 비교하여 아세틸콜린에 대한 감소된 효능을 가짐을 보여준다. 예를 들어, 조작된 수용체 중 일부는 야생형 nAchRa7의 EC50보다 몇 배 더 높은 EC50 값을 가진다. 게다가, 그 결과는 조작된 수용체 중 일부가 야생형 수용체에 비해 특정 비천연 리간드에 대해 증가된 효능을 가짐을 보여준다. 예를 들어, SEQ ID NO: 33에서 L131D, S172D의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 수용체는 야생형 대조군 수용체와 비교하여 AZD-0328 및 RG-3487에 대해 적어도 10배 증가된 효능을 나타낸다. 이러한 결과는 조작된 수용체가 아세틸콜린에 대한 효능을 감소시키는 동시에 인간에서 안전하고 잘 견디는 것으로 인식된 합성 소분자 nACh α7 수용체 효현제에 대한 효능을 유지하거나 증가시키는 데 사용될 수 있음을 입증한다.

[0519] 전기생리학적 방법으로부터의 이러한 결과는 플레이트 판독기로부터의 EC50 값의 확인을 제공하고, 본 명세서에 개시된 조작된 수용체의 비천연 리간드 반응 및 아세틸콜린의 분리를 추가로 확인한다.

[0520] **실시예 4: 수동 패치 클램프 전기생리학을 사용하는 조작된 수용체의 특징화**

[0521] HEK293 세포, 래트 DRG 뉴런 및 래트 해마 뉴런에서 전체 세포 수동 패치 클램프 전기생리학을 사용하여, Ach 및 비천연 리간드에 대한 본 명세서에 개시된 다양한 조작된 수용체의 EC50을 리간드의 상승하는 용량으로부터 피크 전류 측정과 함께 힐 방정식을 사용하여 측정하였다. 레오베이스 이동은 수용체의 효능을 반영하는 래트 DRG 뉴런에서도 측정하였다. 레오베이스를 계산하기 위해, 먼저 활동 전위를 생성할 수 있는 전류의 양을 결정하였다. 그런 다음 리간드를 추가하고, 주입된 전류를 700pA까지 단계적으로 증가시켰다.

[0522] 수동 패치 클램프 실험을 위해, 커버슬립 상에 도말된 세포를 도립 형광 현미경(Olympus)에서 10x 및 40x로 가시화하였다. 기록은 3-6 MOhm 유리 패치 전극(Sutter, BF150-86-10)을 사용하여 RT에서 Axopatch 200B 증폭기 및 Digidata 1550B(Molecular Devices)로 이루어졌다. 달리 명시되지 않는 한, 기록은 140mM 염화나트륨, 4mM 염화칼륨, 1mM 염화마그네슘, 2mM 염화칼슘, 10mM HEPES 및 10mM D-(+)-글루코스(수산화나트륨에 의해 pH = 7.3, 삼투압 = 305-315 mOsm)를 함유하는 세포외 용액(ECS)에서 이루어졌다. 8채널 제로 데드 볼륨 관류 연필(AutoMate Scientific)과 함께 8라인 저장소(AutoMate Scientific)를 관류에 사용하였다. pClamp 소프트웨어(Molecular Devices)를 사용하여 데이터를 수집하였다. 미량은 Clampfit(Molecular Devices)에서 또는 맞춤형 Python 코드를 사용하여 분석하였다. 플로팅 및 통계는 GraphPad Prism에서 수행하였다.

[0523] 용량-반응을 위해, 전압 클램프 모드에서 리간드-유도 전류를 기록하였다. HEK 세포 실험의 경우, 140mM 염화세슘, 5mM 불화칼륨, 2mM 염화칼슘, 2mM 염화마그네슘, 10mM HEPES 및 10mM EGTA(수산화세슘에 의해 pH = 7.2,

삼투압 = 290-295 mOsm)를 함유하는 세슘 기반 내부 용액을 사용하여 일반 ECS에서 기록이 이루어졌다. DRG 뉴런 실험을 위해, 세포를 정상적인 ECS에서 패치한 다음 145mM N-메틸-D-글루카민, 4mM 염화칼륨, 0.5mM 염화마그네슘, 0.5mM 염화칼슘, 10mM HEPES 및 10mM D-(+)-글루코스(염산에 의해 pH = 7.4, 삼투압 = 305-315mOsm)를 함유하는 NMDG 기반 ECS로 전환하여 내인성 양이온 전류를 방지하였다. DRG 뉴런을 위한 내부 용액은 145mM 염화세슘, 1mM 염화마그네슘, 5mM 마그네슘 ATP, 10mM HEPES 및 1mM EGTA(수산화세슘에 의해 pH = 7.2, 삼투압 = 290-295mOsm)을 함유하였다. 세포를 -60mV로 유지하였고 막을 가로지르는 전류는 1kHz에서 베셀 필터를 사용하여 3kHz 샘플링 속도에서 갭프리 모드로 기록하였다. 커패시턴스와 직렬 저항이 보상되었다. 테스트된 약물은 아세틸콜린 클로라이드 및 기타 합성 화합물을 포함한다. 전류의 피크가 관찰될 때까지 약물 용량을 1-10초 동안 적용하였고, 용량 적용 사이에 적어도 2분 동안 세척을 하였다. 전류 진폭을 찾기 위해 피크에서 유지 전류를 뺀다.

[0524] DRG 레오베이스 실험은 100mM D-글루콘산칼륨, 28mM 염화칼륨, 1mM 염화마그네슘 육수화물, 5mM 마그네슘 ATP, 10mM HEPES 및 0.5mM EGTA(수산화칼륨에 의해 pH = 7.2, 삼투압 = 290-295 mOsm, 계산된 액체 접합 전위 = -13.5 mV)을 함유하는 칼륨계 내부 용액을 사용하여 전류 클램프 모드에서 수행하였다. DRG 입력 저항과 레오베이스를 측정하기 위해, 500ms 전류 단계(-200pA 내지 700pA)를 화합물의 존재 및 부재에서 막에 적용하였다. 최종 데이터세트에 포함된 세포의 경우 막에 유지 전류를 적용하지 않았다. 데이터는 10kHz에서 수집하였으며 베셀 필터는 2kHz, 직렬 저항 보상은 100%이다. 레오베이스는 세포에서 활동 전위를 발생시키는 데 필요한 가장 작은 탈분극 전류 주입으로 정의되었다. 세포의 서브세트에서, 활동 전위는 진폭에서 등급이 매겨지는 것처럼 보였기 때문에 레오베이스는 모호하였다. 이 경우, 미량의 극성 플롯이 레오베이스를 명확히하였다. 입력 저항은 음전류 주입으로부터 측정하였고, 정상 상태에서 막 전위의 차이를 전류 주입 진폭으로 나눠 계산하였고 각 기록에 대한 4개의 음전류 단계에 걸쳐 평균하였다. 정지 막 전위는 각 스위프의 처음 100ms에서 측정하였고 각 기록에 대해 평균하였고 액체 접합 전위에 대해 보정하였다. 기준선, 약물 및 세척 조건 사이의 레오베이스 및 입력 저항의 차이의 중요성을 테스트하기 위해 다중 비교를 통한 일원 분산 분석을 사용하였다.

[0525] 115mM D-글루콘산칼륨, 13mM 염화칼륨, 1mM 염화마그네슘 6수화물, 5mM 마그네슘 ATP, 10mM HEPES, 및 0.5mM EGTA(수산화칼륨에 의해 pH = 7.2, 삼투압 = 290-295 mOsm, 계산된 액체 접합 전위 = -14.9 mV)를 함유하는 칼륨계 내부 용액을 사용하여 전류 클램프 모드에서 해마 레오베이스 실험을 수행하였다. 흥분성 시냅스 전달을 차단하기 위해 NBQX(10 μM) 및 AP5(50 μM)를 수조에 포함하였다. HC 입력 저항 및 레오베이스를 측정하기 위해, 500ms 전류 단계(-200pA 내지 700pA)를 화합물의 존재 및 부재하에서 막에 적용하였다. 최종 데이터 세트에 포함된 세포에 대해 유지 전류가 막에 적용되지 않았다. 데이터 수집 설정 및 분석 방법은 DRG 레오베이스 실험과 동일하였다.

[0526] 115mM D-글루콘산칼륨, 13mM 염화칼륨, 1mM 염화마그네슘 육수화물, 5mM 마그네슘 ATP, 10mM HEPES, 및 0.5mM EGTA(pH = 7.2, 삼투압 = 290-295mOsm, 계산된 액체 접합 전위 = -14.9mV)를 함유하는 칼륨계 내부 용액을 사용하여 전류 클램프 모드에서 해마 자발적 활동 전위를 기록하였다. 화합물의 존재 및 부재하에서 갭프리 모드에서 자발적 활동을 기록하였다. 데이터는 10kHz에서, 2kHz에서 베셀 필터, 100%에서 직렬 저항 보상으로 수집하였다. 유지 전류는 막에 적용되지 않았다. 데이터는 클램프핏(Clampfit)과 맞춤형 파이톤(Python) 코드를 사용하여 분석하였다(두 방법의 셀 내 비교는 결과의 차이를 나타내지 않았다). 클램프핏의 경우, 임계값 기반 이벤트 감지를 각 에포크에 대해 별도로 실행하여 활동 전위를 검출하였다. 맞춤형 파이톤 코드의 경우, 피크 찾기 패키지를 사용하여 활동 전위(SciPy)를 자동으로 검출하였다. 두 방법 모두의 경우, 최소 높이, 평균 높이, 최대 높이를 측정하고 빈도는 해당 에포크의 이벤트 수를 해당 에포크의 시간 길이로 나눈 값으로 계산하였다. 클램프핏의 경우, 휴지 막 전위를 이벤트 사이의 3개 지점에서 측정하고 각 에포크에 대해 평균하였다. 파이톤의 정지 막 전위를 위해, 중앙값 필터를 미량에 적용하고 각 에포크에 대해 평균하였다. 두 방법 모두에서, 계산된 액체 접합 전위에 대해 막 전위를 보정하였다. 기준선, 약물 및 세척 조건 간의 유의성을 테스트하기 위해 다중 비교를 통한 일원 분산 분석을 사용하였다.

[0527] 결과는 아래 표 23-27에 표로 정리되어 있다. 이러한 결과는 본 명세서에 개시된 조작된 수용체가 Ach에 대해 매우 낮은 효능을 갖지만, RG3487 및 TC5619와 같은 비천연 리간드에 대해 더 높은 효능 및 효과를 가짐을 확인시킨다. 실시예 6도 참조.

표 23

[0528] HEK293 세포주를 사용하는 수동 패치 클램프 기반 EC50 값

명칭	*TC-5619*	*CNL002*	*파시니클린/RG-3487*	*아세틸콜린*
CODA71	0.03 μM		0.20 μM	65 μM
CODA952				1740 μM
CODA806			0.29 μM	>30,000 μM
CODA807			0.23 μM	2200 μM
CODA1025	0.041 μM			3853 μM
CODA1027	0.095 μM			6412 μM
CODA1039	0.201 μM			5400 μM
CODA1045	0.253 μM			>100,000 μM
CODA1048	0.156 μM			7341 μM
CODA1054	0.040 μM			7426 μM
CODA1055	0.016 μM			3899 μM
CODA1056	0.096 μM			4460 μM
CODA1138		0.033 μM		1963 μM
CODA1140		0.018 μM		3134 μM
CODA1157		0.032 μM		2521 μM
CODA1173		0.039 μM		2782 μM

표 24

[0529] 래트 DRG 뉴런을 사용하는 수동 패치 클램프 기반 EC50 값

	EC50		
명칭	TC-5619	파시니클린/RG-3487	아세틸콜린
CODA806		0.29 μM	>30,000 μM
CODA1025	0.107 μM		9700 μM
CODA1027	0.377 μM		>100,000 μM
CODA1039	0.649 μM		>100,000 μM
CODA1045	0.268 μM		>100,000 μM
CODA1048	0.203 μM		8552 μM
CODA1054	0.150 μM		11070 μM
COAD1055	0.056 μM		6825 μM
COAD1056	0.116 μM		7449 μM

표 25

[0530] 래트 해마 뉴런을 사용하는 수동 패치 클램프 기반 EC50 값

	EC50	
명칭	CNL002	아세틸콜린
CODA1138	0.139 μM	3369 μM
CODA1140	0.031 μM	
CODA1157	0.095 μM	4469 μM
CODA1173	0.121 μM	8461 μM

표 26

[0531] EC90에서 표시된 리간드를 사용한 래트 DRG 뉴런의 레오베이스 이동

	레오베이스 이동; 래트 DRG 뉴런		
명칭	기준선	+TC-5619 @ EC90	파시니클린/RG-3487 @ EC90
CODA806	163±28 pA		625±35 pA

CODA1025	140±19 pA	560±72 pA	
CODA1027	100±23 pA	638±63 pA	
CODA1039	88±9 pA	453±58 pA	
CODA1045	141±22 pA	700±0 pA	
CODA1048	120±19 pA	590±46 pA	
CODA1054	105±13 pA	673±27 pA	
COAD1055	83±7 pA	562±35 pA	
COAD1056	114±12 pA	632±43 pA	

표 27

[0532] **EC90에서 래트 해마 뉴런의 자발적 발화 속도 및 유발된 레오베이스 이동**

자발적인 발사 속도; 래트 해마 뉴런		
조작된 수용체의 서열	***기준선***	***+CNL002 @ EC90***
R101F_L131N_S172D in SEQ ID NO: 33 (CODA1140)	3.29±0.75 Hz	0.71±0.29 Hz
유발된 레오베이스 이동; 래트 해마 뉴런		
조작된 수용체의 서열	***기준선***	***+CNL002 @ EC90***
R101F_L131N_S172D in SEQ ID NO: 33 (CODA1140)	40.63±10.50 pA	296.9±72.65 pA

[0533] **실시예 5: 조작된 수용체의 국소화의 특징화**

[0534] 본 명세서에 개시된 조작된 수용체가 세포 표면에 국소화되는 효율은 여러 방법을 사용하여 평가하였다. 먼저, HA-태그된 조작된 수용체를 HEK293T 세포에서 발현시켰고 이들의 표면 발현을 형광 태그된 HA 항체를 사용하여 모니터링하였다. 둘째, nAchRa7에서 유래된 LBD를 포함하는 조작된 수용체의 아미노산에 특이적으로 결합하는 형광 표지된 α-벙가로톡신을 조작된 수용체에 결합하는 데 사용하였다. 이 두 가지 방법을 사용한 후 유동 세포 계측법을 사용하여 조작된 수용체의 표면 국소화를 확증할 수 있었다.

[0535] 단클론 항체 항-HA-PeCy7(16B12)은 바이오레전드(Biolegend)(San Diego, CA)로부터 구입하였다. 단클론 항체 클론 명칭은 괄호 안에 표시된다. 비오틴에 접합된 알파-번가로톡신, Alexa Fluor 647은 모두 써모/피셔(Waltham MA)에서 구입하였다. 간략하게, HEK-293T를 웰당 200,00개 세포로 도말하고 다음날 진 6에 DNA 대 퓨진의 1:3 비율로 형질감염시켰다. 유세포 분석법을 사용하여 형질감염 다음날 세포를 분석하였다. 유세포 분석을 위해, 형질감염된 HEK293T 세포를 0.05% 트립신 및 0.02% EDTA(Thermo/Fisher)를 사용하여 들어올리고 세척하고 FACS 버퍼(2% BSA, Ca+ 및 Mg+가 없는 1X PBS 및 1X 페니실린 스트렙토마이신)에서 항체(30분, 1:100) 또는 α-번가로톡신(1시간. 1:1000)에서 배양하였다. 그런 다음 세포를 FACS 버퍼로 세척한 다음 Sony SH800 FACS 분류기(San Jose, CA)에서 분석하였다. 후속 분석은 플로우조(FlowJo)(San Jose, CA)를 사용하여 수행하였다. 제시된 데이터는 HA-태그 형광 또는 α-번가로톡신 염색에 대해 양성인 세포의 % 및 SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 포함하는 모 키메라 수용체의 중간 형광 강도에 대해 정규화된다.

[0536] **도 5** 및 **표 28**은 SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 발현하는 대조군 세포에 대해 정규화된 조작된 수용체를 발현하는 HA-태그 양성 세포의 %("정규화된 HA %"); 및 SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 발현하는 대조군 세포에 대해 정규화된 조작된 수용체를 발현하고 있는 α-번가로톡신 양성 세포의 %("정규화된 AB %")를 나타낸다. 이들은 또한 항-HA 항체("정규화된 HA MFI") 또는 Alexa Fluor 647에 접합된 형광 표지된 α-번가로톡신("정규화된 AB MFI")을 사용하여 평가할 때, SEQ ID NO: 33의 아미노산 서열을 발현하는 대조군 세포로 정규화된 조작된 수용체를 발현하는 세포의 중앙 형광 강도(MFI)를 나타낸다. 상이한 점 돌연변이는 유동 세포측정법에 의한 HA 및 알파-번가로톡신 둘 모두의 검출에 영향을 미칠 수 있다.

표 28

[0537] **조작된 수용체의 표면 국소화**

명칭	**정규화된 HA %**	**정규화된 HA MFI**	**N**	**정규화된 AB %**	**정규화된 AB MFI**	**N**
CODA282	0.91	0.74	2	1.23	1.04	2
CODA283	1.16	1.00	2	1.24	1.31	2
CODA333	1.42	0.76	2	1.28	1.20	2

CODA335	2.00	0.88	2	1.65	1.32	3
CODA339	1.59	0.79	2	0.84	1.41	3
CODA342	1.83	0.74	2	0.61	1.24	3
CODA377	0.36	0.61	2	0.50	0.90	4
CODA409	0.96	1.09	2	0.88	0.62	4
CODA534	0.47	1.10	8	0.44	0.91	3
CODA535	0.33	0.86	9	0.43	0.72	2
CODA536	0.40	0.87	9	0.48	0.87	2
CODA805	0.70	0.94	4	0.56	0.93	4
CODA806	0.36	0.83	4	0.33	2.04	5
CODA807	0.91	1.00	4	0.78	1.14	4
CODA952	1.41	1.53	2	0.54	2.64	2
CODA1025	0.98	0.63	2	0.46	0.90	2
CODA1027	0.61	0.49	2	0.50	0.68	2
CODA1058	1.44	0.68	2	0.34	1.08	2
CODA1045	1.09	0.87	11	0.03	0.35	12
CODA1047	1.13	0.65	4	0.03	0.38	4
CODA1048	1.05	0.61	4	0.55	0.57	4
CODA1053	1.31	0.97	10	0.91	0.90	10
CODA1054	0.96	0.88	11	0.82	0.82	12
CODA1072	1.07	0.78	9	0.51	0.69	9
CODA1073	1.22	0.56	4	0.44	0.70	4

[0538] *약어: MFI- 평균 형광 강도; AB-α-번가로톡신

[0539] 결과는 본 명세서에 개시된 조작된 수용체의 돌연변이가 세포 표면에 대한 국소화에 영향을 미친다는 것을 보여준다. 일부 이중 돌연변이체의 국소화는 모 키메라(SEQ ID NO: 33)의 국소화에 필적하지만, 다른 것들은 모 키메라(SEQ ID NO: 33)와 비교하여 감소된 세포 표면 국소화를 갖는다. 예를 들어, 조작된 수용체 CODA409는 HA 태그에 의해 평가된 모 키메라에 필적하는 위치를 나타낸다. 더욱이, 조작된 수용체의 대부분은 HA 태그 및 α-번가로톡신에 의해 평가되는 두 기술에 의해 모 키메라에 필적하는 국소화를 나타낸다. 한편, 특정 돌연변이는 α-번가로톡신에 대한 결합에 영향을 줄 수 있다.

[0540] *뉴런 세포에서 조작된 수용체의 국소화*

[0541] 본 명세서에 개시된 조작된 수용체가 뉴런 세포의 표면에 국소화되는 효율을 측정하기 위해, 래트 DRG 뉴런 및 래트 해마 뉴런에서 면역세포화학을 사용하였다.

[0542] *1차 뉴런 배양:* 후근 신경절(DRG) 뉴런 실험을 위해, 성체 래트 요추 신경절을 수확하고 표준 프로토콜에 따라 분리하고, 폴리-L-라이신 및 마우스 라미닌으로 코팅된 유리 커버슬립 상에서 배양하고, 인간 시냅신-구동, ires-GFP 함유 렌티바이러스 벡터로 형질도입하고, 면역세포화학을 위해 처리하였다. 해마 뉴런 실험을 위해, 해마를 배아 18일째 새끼 래트로부터 수확하고, 표준 프로토콜에 따라 분리하고, 폴리-L-리신으로 코팅된 유리 커버슬립에서 배양하고, 인간 시냅신 구동, ires-GFP 함유 렌티바이러스 또는 AAV6 벡터로 형질도입고 면역 세포 화학을 위해 처리하였다. 5-플루오로-데옥시우리딘을 해마 배양물에 첨가하여 아교세포 성장을 억제하였다. ires-GFP-함유 렌티바이러스 벡터는 지시된 서열을 갖는 HA 태그 조작된 수용체에 대해 암호화되거나 빈 대조군 ires-GFP 벡터였다.

[0543] *면역세포화학 및 정량화:* 커버슬립을 단백질이 없는 HEPES 기반 세포외 버퍼로 헹구고 실온에서 Live-or-Dye 350/448(Biotium)로 염색한 생존 불가능한 세포를 헹구었다. 헹굼 후, 4C에서 토끼 항-HA 항체로 표면 HA 태그에 대해 세포를 염색하였다. 세포를 실온에서 4% 파라포름알데히드에 고정하고, 5% 정상 염소 혈청/0.1% 트리톤 X-100으로 차단 및 투과하고, 전체 HA 태그(마우스 항-HA 항체) 및 GFP에 대해 4℃에서 밤새 염색하였다. 세척 후, 세포를 적절한 형광 2차 염소 또는 당나귀 항체와 함께 배양하고, 세척하고, 장착하고, 4색 형광 현미경을 통해 이미지화하였다. 생존 가능한 신경 세포체 및 축삭/수지상 구획을 식별하고 이러한 구조에 존재하는 표면 및 총 HA 면역반응성을 정량화하기 위해 맞춤형 스크립트(ImageJ)로 이미지를 분석하였다. 모든 데이터는 표시된 대로 여러 독립 배양물에서 개별 커버슬립의 평균 +/- SEM으로 표현된다. 렌티바이러스 벡터로 형질도입된 DRG 뉴런의 결과의 경우, 빈 벡터로 형질도입된 세포의 값이 나열된다. 다른 모든 결과의 경우, 빈 벡터로 변환된 세포의 값은 실험 배경 보정의 일부로 모든 측정값에서 뺀다.

[0544] 결과는 **도 6a** 및 **도 6b**에 제공된다. 뉴런의 세포체 또는 융기(유사축삭 및 수상돌기 포함)에서 HA 태그 지정된 조작된 수용체의 형광 신호는 야생형 GLRA1 수용체의 상응하는 형광 신호의 일부로 표시된다. "전체" 값은 투과화 후 전체 세포로부터 얻은 야생형 GLRA1의 해당 형광 신호의 일부로서 조작된 수용체의 형광 신호를 나타낸다. "표면" 값은 투과화 없는 세포의 세포 표면에서 얻은 야생형 GLRA1의 상응하는 형광 신호의 일부로서 조작된 수용체의 형광 신호를 나타낸다. 빈 세포는 아직 사용할 수 없는 데이터를 나타낸다. (0)은 값이 분석 검출 임계값 미만임을 나타낸다.

[0545] 이들 결과는 조작된 수용체가 뉴런에서 발현될 수 있고 세포 표면에 국한될 수 있음을 나타낸다. 그리고 조작된 수용체 중 일부는 보다 효과적으로 발현되고 체세포에 국소화된다.

[0546] **실시예 6: CR-11 조작된 수용체의 특징화**

[0547] 고 처리량 전기생리학 플랫폼은 CR-11로 명명된 SEQ ID NO: 33에서 Y115D 및 L131Q의 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 조작된 수용체의 아세틸콜린에 대한 효능이 야생형 수용체와 비교하여 500배 이상 감소된 반면 RG-3487에 대한 효능은 10배 이상 증가하는 것을 나타내었다.

[0548] 전체 세포 수동 패치 클램프 전기생리학을 사용하여, HEK293 세포 및 배양된 래트 후근 신경절(DRG) 감각 뉴런 모두에서, SEQ ID NO: 33에서 Y115D 및 L131Q의 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 조작된 수용체는 기본적으로 아세틸콜린에 둔감하지만 야생형 nAchRα7 수용체에 비해 RG-3487에 훨씬 더 민감하다는 것을 확인하였다. **도 2a-도 2b** 참조.

[0549] HEK293 세포에서, SEQ ID NO: 33에서 ACh로의 Y115D 및 L131Q의 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 조작된 수용체의 EC_{50}은 최대 100mM의 Ach의 농도에서도 전류가 거의 생성되지 않기 때문에 측정할 수 없었다. 반대로 ACh에 대한 야생형 nAchRα7 수용체의 EC_{50}은 42.4μM이다(**도 2a**). 고 처리량 데이터를 추가로 확인하면, 수동 패치 클램프 전기생리학 결과는 SEQ ID NO: 33에서 Y115D 및 L131Q의 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 조작된 수용체가 야생형 nAchα7 수용체(EC_{50} = 2.9μM)와 비교(**도 2b**)하여 RG-3487(SA-2)(EC_{50} = 0.3μM)에 더 민감함을 나타낸다.

[0550] SEQ ID NO: 33에서 Y115D 및 L131Q의 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 조작된 수용체를 발현하는 배양된 성체 래트 DRG 뉴런에서, RG-3487(SA-2)의 적용은 용량 의존적으로 염화물 전류를 생성한 반면(**도 3**), 이러한 전류는 형질도입되지 않은 세포에서는 관찰되지 않는다.

[0551] 추가로, 형질도입된 래트 DRG 뉴런에서 3 μM 농도의 RG-3487(SA-2)로 SEQ ID NO: 33에서 Y115D 및 L131Q의 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 조작된 수용체의 비활성화는 전류를 가역적으로 억제한다. 활동 전위(n=7)를 유도하는 데 필요한 전류가 약 3배 증가한 주입 유발 활동 전위(도 4a). 3.0 mM의 아세틸콜린은 형질도입된 뉴런(n=4)에서 유발된 활동 전위에 영향을 미치지 않았다(도 4b). 이러한 결과는 DRG 뉴런에서 SEQ ID NO: 33의 Y115D 및 L131Q의 아미노산 치환을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 조작된 수용체의 발현이 유발된 활동 전위를 억제할 수 있음을 보여준다.

[0552] **실시예 7. IPSC-유래 뉴런에서 조작된 수용체의 특징화**

[0553] IPSC 유래 Aβ 뉴런을 생성하기 위한 분화 프로토콜이 개발되었다. 다음 마커는 세포를 Aβ 뉴런으로 정의하는 데 사용된다; 수초화된 1차 구심성 뉴런을 묘사하는 신경필라멘트 200(NF200)(Basbaum et al, 2009), Piezo 2, 저역치 기계수용체 감각 뉴런(LTMR)의 마커(Ranade et al., 2014) 및 TLR5, Aβ 섬유도 표시하는 톨-유사 수용체(Xu et al., 2015)의 발현. 특징화는 또한 많은 C 및 Aβ 섬유(Caterina et al., 1997)에서 발현되는 통각수용체 특이적 마커 TrpV1, 비펩타이드성 비수초성 구심성(Zylka et al., 2009)을 기술하는 전립선산 포스파타제 및 NaV1.1, Aβ 통각수용 뉴런의 마커의 부재에 대한 평가를 포함할 것이다. 위의 기준을 충족하는 IPSC 유래 뉴런은 c-Ret 및 MafA/C-Maf의 발현을 기반으로 빠르게 적응하는 LTMR 또는 c-Ret 발현의 부재하에서(Koch et al., 2018), TrkB 및 Shox2의 발현을 기반으로 천천히 적응하는 LTMR로 특징화될 것이다.

[0554] (1) Aβ 뉴런의 발현 마커 기준을 충족하는 세포가 비통각 감각 뉴런의 특징인 전기생리학적 특성을 가짐을 확인한다. 이러한 특성은 리간드에 반응하는 전류 생성과 직류 주입이 활동 전위를 유발한다는 것을 포함한다.

[0555] (2) 선택된 화학유전학적 수용체(조작된 수용체)로 형질도입된 뉴런에서 클로라이드 전류의 존재를 확인한다. 세포는 GFP 형광을 통해 형질도입된 세포를 식별하기 위해 IRES GFP와 함께 HA-태그가 붙은 화학유전학 수용체(들)를 암호화하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입된다. 합성 효현제에 반응하는 염화물 전류는 내부/외부 유체

양이온으로 NMGD+를 사용하여 전압 클램프 모드에서 검출된다. NMDG+는 양이온 채널에 불투과성이기 때문에, NMDG+를 포함하면 연구된 합성 효현제에 대한 반응으로 임의의 내인성 nAchRα7 양이온 전류를 제거한다. 그런 다음 화학유전학적 수용체-합성 효현제 쌍에 대한 EC50을 결정한다. 기록 후, 수용체(들)의 발현 및 세포 표면 국소화는 HA 태그에 대한 항체를 사용하여 투과성 및 비투과성 세포에서 형광 현미경으로 평가한다.

[0556] (3) 전류 주입 유발 활동 전위를 억제하는 능력을 평가한다. 세포는 GFP 형광을 통해 형질도입된 세포를 식별하기 위해 IRES GFP와 함께 HA-태그가 붙은 화학유전학 수용체(들)를 암호화하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입된다. 전류 클램프 모드에서, 세포막이 탈분극화될 때까지 전류 인가를 증가시킴으로써, 합성 효현제의 존재 및 부재에서의 레오베이스가 결정된다. 결과는 GFP로만 형질도입된 세포와 비교된다.

[0557] (4) 입력 저항에 대한 영향을 평가한다. 세포는 GFP 형광을 통해 세포를 식별하기 위해 IRES GFP와 함께 HA-태그가 붙은 화학유전학 수용체(들)를 암호화하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입된다. 전류 클램프 모드에서, 입력 저항을 계산하기 위해, 임계값 이하의 전류를 주입하고 그에 따른 막 전압의 변화를 결정한다. 결과는 GFP로만 형질도입된 세포와 비교된다.

[0558] (5) 합성 효현제의 존재 및 부재하에서 휴지 막 전위에 대한 영향을 평가한다. 세포는 GFP 형광을 통해 형질도입된 세포를 식별하기 위해 IRES GFP와 함께 HA-태그가 붙은 화학유전학적 수용체(들)를 암호화하는 렌티바이러스 벡터로 형질도입된다. 전압 클램프 모드에서, 휴식 막 전위는 합성 효현제의 존재 및 부재에서 결정된다. 결과는 GFP로만 형질도입된 세포와 비교된다.

[0559] IPSC 유래 Aβ 뉴런의 상기 전기생리학 특성을 IPSC 유래 C-섬유 뉴런 및 성체 랫트 DRG 뉴런의 전기생리학 특성과 비교하였다. 또한, 손상된 Aβ 섬유 구심성의 생화학적 변화가 신경병증 상태에서 자발적인 통증에 기여할 수 있기 때문에, IPSC 유래 Aβ 뉴런의 전기생리학적 특성은 시험관내 손상 후 조사된다. 시험관 내 손상을 일으키기 위해, 세포를 수확하고 배양 과정이 확장된 후 재도말한다. 재도말 과정은 축삭 손상을 모방하여 과정을 끊다. 손상 후 다양한 시점에서, 세포는 자발적 활동 전위의 생성, 휴식 막 전위의 변화 및 레오베이스의 변화를 포함하는 다양한 전기생리학 특성에 대해 평가된다. 화학유전학적 수용체의 효과는 손상된 상태에서도 평가된다.

[0560] **실시예 8. 동물 모델에서 질환을 치료하기 위한 조작된 수용체의 효능 평가**

[0561] 본 명세서에 개시된 조작된 수용체는 소분자 리간드의 투여 후 신경병성 통증의 래트 모델에서 무통증을 제공하는 능력에 대해 평가된다. 야생형 α7-nAChR 또는 본 명세서에 개시된 조작된 키메라 수용체 중 임의의 하나를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 연결된 인간 시냅신-1(hSYN) 프로모터를 함유하는 AAV 발현 카세트는 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 구성된다.

[0562] 이들 AAV 발현 카세트를 AAV 바크미드(bacmid)에 서브클로닝시키고, 정제하고 나서, Sf9 곤충세포에 형질감염시켜 재조합 바큘로바이러스를 생성하고, 이어서, 증폭시켰다. 재조합 AAV 벡터를 생성하기 위해 야생형 α7-nAChR 또는 상기 조작된 키메라 수용체 중 임의의 하나를 함유하는 증폭된 재조합 바큘로바이러스 및 Rep 및 AAV6(Y705+731F+T492V) Cap 유전자를 함유하는 다른 재조합 바큘로바이러스를 이용하여 Sf9 세포를 감염시킨다. 바이러스 벡터를 정제하고, qPCR을 이용하여 바이러스 역가를 결정하고, SDS-PAGE를 사용하여 AAV 벡터를 확인한다.

[0563] *거동 실험 및 통증 모델:* 신경병성 통증 상태를 모방하는 모델에서의 기계적 과민증을 생성하기 위해, 여분 신경 손상(spared nerve injury: SNI) 모델(기계적 이질통의 검증된 모델)을 사용한다(Shields et al., 2003, The Journal of Pain, 4, 465-470). 이 모델을 총 비골신경 및 비복신경의 절편화 및 경골 가지의 단리에 의해 생성한다. 와이어-메쉬 그리드 상에 래트를 위치시키고, 폰 프레이 필라멘트(von Frey filament)로 뒷발의 발바닥을 자극함으로써 기계적 회수 역치를 평가한다.

[0564] *래트의 척수 내로의 AAV 주사:* 요추 척수의 2개 세그먼트(약 1.5-2㎜)를 노출시키기 위해 요팽대 수준에서 등쪽 반측후궁절제술을 행하고, 이후에 경막을 절개하고, 반영하였다. 바이러스 용액을 유리 마이크로피펫(광유로 미리 채움)에 장입한다. 마이크로피펫을 정위(stereotactic) 장치 상에 장착된 수동 마이크로-주사기에 연결한다. 바이러스 용액을 배각부분(좌측)에 대해 표적화한다. 노출된 영역 내의 전후방향(rostro-caudal) 축을 따라서, 등거리 선형 방식으로 각각 240nℓ의 6회 주사를 수행한다. 각각의 주사 후에, 1분의 휴지 시간이 관찰되며, 이어서, 근육층을 봉합하고, 피부를 스테플(staple)로 봉합하고 나서, 열 패드를 이용하여 동물을 회복시킨 후에 이들을 우리에 복귀시켰다. 마지막 거동 검사 후에 조직학적 분석을 위해 동물을 관류시킨다.

[0565] *래트의 후근 신경절(DRG) 내로의 AAV 신경절내 주사:* 주사를 붕규산염 유리 모세관(0.78/1㎜ 내경/외경)을 이용

하여 뾰족한 지점까지 잡아당기고, 폴리에틸렌 튜빙(0.4/0.8㎜ 내경/외경)에 의해 미량주사 펌프에 장착된 주사기에 부착한다. 바늘을 (단지 바늘을 잡거나 조작하는데 사용하기 위해) 바깥쪽으로 닫히는 정위 프레임(stereotaxic frame)의 연장된 아암(arm) 상에 장착한다. 튜빙, 주사기 및 바늘을 모두 물로 채운다. 1마이크로리터의 공기를 바늘 내로 취한 후에, 3㎕의 바이러스 벡터 용액을 취한다. 각각의 주사에 대해 이 용적과 별개로 바늘에 장입한다. 수술 전에 동물을 마취시켰다. 등쪽 정중선을 따라서 절개 후에, 척추골의 제거에 의해 L4 및 L5 DRG를 노출시킨다. DRG 위에 놓인 신경외막을 개방하고 나서, 신경절에 내에, 노출된 신경절의 표면으로부터 400㎛의 깊이로 유리 바늘을 삽입하였다. 유리 모세관 팁 주변 조직을 봉합하기 위해 3분 지연 후에, 1.1㎕ 바이러스 용액을 0.2㎕/분의 속도로 주사하였다. 2분의 추가 지연 후에, 바늘을 제거한다. L4 신경절에 처음 주사한 후에 L5 신경절에 주사한다. 척수 위에 놓인 근육을 5-0 봉합으로 느슨하게 봉합하고, 상처를 봉합한다. 37℃에서 동물을 회복시키고 수술후 무통증으로 되게 하였다.

[0566] *래트에서의 AAV 초내 주사:* 래트를 처음 마취시키고, 이어서, 정위 프레임에 이들의 머리를 고정시켜 수직으로 위치시켰다. 목덜미능선에서 그루브를 노출시키기 위해 목의 기저부에서 절개를 행한다. 수조막 내 절개를 뇌척수액이 누설되는 깊이까지(1 내지 2㎜) 행한다. 이어서, 4㎝ 32 G 초내 카테터를 요추 척수 방향으로 서서히 삽입하고, 피부를 카테터에 의해 봉합한다. 이어서, 레트를 회복시킨다. 이어서, 래트를 마취시키고 나서, 벡터(6㎕)를 투여한다. 카테터를 6㎕의 PBS로 씻어내고, 이어서, 제거하고 나서, 래트를 회복시켰다.

[0567] *투여의 효과:* 이 SNI 모델을 래트의 총 비골신경 및 비복신경의 절편화 및 경골 가지의 단리에 의해 생성한다. 문헌[Chaplan & Yaksh]의 업-다운(up-down) 방법을 사용하여 기계적 역치를 결정한 후에, 척수, DRG, 또는 초내 공간 내로 AAV.hSYN-α7-nAChR/GlyRα1을 주사한다. 편측성 벡터 주사의 3주 후에, 동물의 기계적 움츠림 역치(mechanical withdrawal threshold)가 변하지 않는다는 것을 검증하기 위해 동물을 다시 검사한다. 33rpm의 최대 속도로 가속된 로타로드(accelerating rotarod)(미국에 소재한 스톨팅(Stoelting))을 이용하여 주사 전에 그리고 후에 운동 협응을 또한 검사한다. 로타로드 상에서 래트가 소비한 지속시간을 기록하고, 컷오프는 300초이다. 각각의 래트를 3회 훈련 시험에서 살펴보고, 2시간 후에 테스트한다.

[0568] 후속적으로, 각각의 키메라 코호트에서 래트의 절반에 AZD-0328 또는 파시니클린의 단일 IP 주사를 투여하고, 기계적 역치는 IP 주사 후 1, 2, 5, 7 및 13일에 업-다운 방법을 이용하여 테스트하였다. 제3일에, 역치가 손상 후 기준까지 회복되었을 때, AZD-0328을 다시 IP로 주사하고 또한 비-손상 기준 역치에 대한 회복이 관찰된다. 이들 동물은 48시간 동안 따랐다. 이어서, 동물을 조직학을 위해 관류시킨다.

[0569] **실시예 9. 만성 통증을 앓고 있는 환자의 치료**

[0570] 비제한적 예에서, 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법을 이용하여 만성 근통을 앓고 있는 환자를 치료한다. 환자를 하나 이상의 배근 신경절(즉, 요추, 경추 또는 흉추 DRG 내로 신경절내 전도 촉진 투여)에 직접적으로 전달한 1.0mL의 용적으로 본 명세서에 개시된 조작된 수용체 중 임의의 하나를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결된 AAV.hSYN의 10^{13}개의 벡터 게놈으로 제1일에 치료한다. 본 실시예에서, AAV 벡터는 선택적 뉴런 발현을 위해 인간 시냅신-1(SYN1) 프로모터의 제어하에서 본 명세서에 개시된 조작된 수용체 중 임의의 하나를 암호화한다. 주사 2주 후에, 환자는 AZD-0328 또는 다른 비천연 리간드에 대한 처방을 위해 병원에 복귀한다. 환자는 필요하다면(즉, 통증 에피소드 동안) 0.1mg/kg의 AZD-0328 또는 다른 비천연 리간드를 경구로 자가 투여한다.

[0571] **실시예 10. 만성 통증을 앓고 있는 환자의 치료**

[0572] 비제한적 예에서, 만성 두개안면(예를 들어, 삼차 신경병증 또는 턱관절 기능장애)을 앓고 있는 환자를 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법을 이용하여 치료한다. 환자를 삼차 신경절(즉, 신경절내 전도 촉진 투여)에 직접적으로 전달하는 0.150mL 용적으로 본 명세서에 개시된 조작된 수용체 중 임의의 하나를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결된 AAV.hSYN의 10^{13}개의 벡터 게놈으로 제1일에 치료한다. 본 실시예에서, AAV 벡터는 선택적 뉴런 발현을 위해 인간 시냅신-1(SYN1) 프로모터의 제어하에서 본 명세서에 개시된 조작된 수용체 중 임의의 하나를 암호화한다. 주사 2주 후에, 환자는 AZD-0328 또는 다른 비천연 리간드에 대한 처방을 위해 병원에 복귀한다. 환자는 필요하다면(즉, 통증 에피소드 동안) 0.1mg/kg의 AZD-0328 또는 다른 비천연 리간드를 경구로 자가 투여한다.

[0573] **실시예 11. 비만인 환자의 치료**

[0574] 비제한적 예에서, 비만인 환자를 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법을 이용하여 치료한다. 환자를 AAV의 10^{13}개

의 벡터 게놈으로 제1일에 치료한다. 1.0mL의 용적으로 본 명세서에 개시된 조작된 수용체 중 임의의 하나를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결된 그렐린(Ghrelin)을 미주신경(즉, 신경내) 위 가지(gastric branch)에 직접 전달한다. 본 실시예에서, AAV 벡터는 선택적 뉴런 발현을 위한 인간 그렐린(Ghrelin) 프로모터의 제어하에서 조작된 수용체를 암호화한다. 주사 2주 후에, 환자는 AZD-0328 또는 다른 비천연 리간드에 대한 처방을 위해 병원에 복귀한다. 환자는 과도한 체중감소를 위해(즉, 식욕 억제를 위해) 0.1mg/kg의 AZD-0328 또는 다른 비천연 리간드를 경구로 매일 자가 투여한다.

[0575] **실시예 12. 비만인 환자의 치료**

[0576] 비-제한적 예에서, 비만인 환자를 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법을 이용하여 치료한다. 췌장을 자극하는 배근 신경절에 직접적으로(즉, 신경절내) 전달되는 1.0mL 용적으로 본 명세서에 개시된 조작된 수용체 중 임의의 하나를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결된 AAV-TRPV1의 10^{13}개의 벡터 게놈으로 환자를 제1일에 치료한다. 본 실시예에서, AAV 벡터는 통증수용체에서의 선택적 뉴런 발현을 위해 인간 TRPV1 프로모터의 제어하에서 조작된 수용체를 암호화한다. 주사 2주 후에, 환자는 AZD-0328 또는 다른 비천연 리간드에 대한 처방을 위해 병원에 복귀한다. 환자는 과도한 체중감소를 위해 0.1mg/kg의 AZD-0328 또는 다른 비천연 리간드를 경구로 매일 자가 투여한다.

[0577] **실시예 13. 비만인 환자의 치료**

[0578] 비-제한적 예에서, 비만인 환자를 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법을 이용하여 치료한다. 시상하부에서 뇌시상 하부 핵(PVH)에 직접적으로 전달된(즉, 두개내, 전도 촉진 투여) 1.0mL의 용적으로 본 명세서에 개시된 조작된 수용체 중 임의의 하나를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결된 AAV-SIM1의 10^{13}개의 벡터 게놈으로 환자를 제1일에 치료한다. 본 실시예에서, AAV 벡터는 프로-오피오멜라노코르틴(pro-opiomelanocortin: POMC) 뉴런에서 선택적 뉴런 발현을 위해 그리고 궁극적으로 식욕억제 경로의 자극을 위해 인간 싱글-마인디드 패밀리 BHLH 전사 인자 1(Single-Minded Family BHLH Transcription Factor 1: SIM1)의 제어 하에 조작된 통로를 암호화한다. 주사 2주 후에, 환자는 AZD-0328 또는 다른 비천연 리간드에 대한 처방을 위해 병원에 복귀한다. 환자는 과도한 체중감소를 위해(즉, 식욕 억제를 위해) 0.15mg/kg의 AZD-0328 또는 다른 비천연 리간드를 경구로 매일 자가 투여한다.

[0579] **실시예 14. PTSD를 앓고 있는 환자의 치료**

[0580] 비제한적 예에서, 외상 후 스트레스 장애(PTSD)를 앓고 있는 환자를 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법을 이용하여 치료한다. 환자를 C6 성상신경절에 직접적으로 전달된(즉, 신경절내) 1.0mL 용적으로 본 명세서에 개시된 조작된 수용체 중 임의의 하나를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결된 AAV-hSYN1의 10^{13}개의 벡터 게놈으로 제1일에 치료한다. 본 실시예에서, 선택적 뉴런 발현을 위해 AAV 벡터는 인간 시냅신-1(hSYN1) 프로모터의 제어 하에 조작된 수용체를 암호화한다. 주사 2주 후에, 환자는 AZD-0328 또는 다른 비천연 리간드에 대한 처방을 위해 병원에 복귀한다. 환자는 과도한 PTSD 증상에 대해(즉, 불안에 대해) 0.15mg/kg의 AZD-0328 또는 다른 비천연 리간드를 경구로 매일 자가 투여한다.

[0581] **실시예 15. 우울증을 앓고 있는 환자의 치료**

[0582] 비제한적 예에서, 치료-내성 우울증(treatment-resistant depression: TRD)을 앓고 있는 환자를 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법을 이용하여 치료한다. 환자를 미주신경 내로 직접적으로 전달된(즉, 신경내) 1.0mL 용적으로 본 명세서에 개시된 조작된 수용체 중 임의의 하나를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결된 AAV-hSYN1의 10^{13}개의 벡터 게놈으로 제1일에 치료한다. 본 실시예에서, AAV 벡터는 선택적 뉴런 발현을 위해 인간 시냅신-1(hSYN1) 프로모터의 제어 하에 조작된 수용체를 암호화한다. 주사 2주 후에, 환자는 AZD-0328 또는 다른 비천연 리간드에 대한 처방을 위해 병원에 복귀한다. 환자는 우울증 증상에 대해 0.1mg/kg의 AZD-0328 또는 다른 비천연 리간드를 경구로 매일 자가 투여한다.

[0583] **실시예 16. GERD를 앓고 있는 환자의 치료**

[0584] 비제한적 예에서, 위식도 역류질환(GERD)을 앓고 있는 환자를 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법을 이용하여 치료한다. 환자를 하부식도괄약근(LES) 미주신경 및 근층간신경총(즉, 신경내) 또는 민무늬근(근육내)에 각각 직접적으로 전달된 본 명세서에 개시된 조작된 수용체 중 임의의 하나를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결된 AAV-hSYN1 또는 본 명세서에 개시된 조작된 수용체 중 임의의 하나를 암호화하는 폴리뉴클레오

타이드에 작동 가능하게 연결된 AAV-CAG의 10^{13}개의 벡터 게놈으로 제1일에 치료한다. 본 실시예에서, AAV 벡터는 선택적 뉴런 발현을 위해 인간 시냅신-1(hSYN1) 프로모터 또는 LES 근세포에서 발현을 위해 CAG 프로모터의 제어 하에 조작된 수용체를 암호화한다. 주사 2주 후에, 환자는 AZD-0328 또는 다른 비천연 리간드에 대한 처방을 위해 병원에 복귀한다. 환자는 GERD 증상(즉, 위산역류)에 대해 0.15mg/kg의 AZD-0328 또는 다른 비천연 리간드를 경구로 매일 자가 투여한다.

[0585] **실시예 17. 간질을 앓고 있는 환자의 치료**

[0586] 비제한적 예에서, 간질과 연관된 발작을 앓고 있는 환자를 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법을 이용하여 치료한다. 운동피질(즉, 두개내)과 같은 사전 결정된 발작 병소에 직접적으로 전달된 1.0mL 용적으로 본 명세서에 개시된 조작된 수용체 중 임의의 하나를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결된 AAV-CamKIIα의 10^{13}개의 벡터 게놈으로 환자를 제1일에 치료한다. 본 실시예에서, AAV 벡터는 흥분성 뉴런에서 선택적 뉴런 발현을 위해 인간 칼슘/카모듈린-의존적 단백질 키나제 II α(CamKIIα) 프로모터의 제어 하에 조작된 수용체를 암호화한다. 주사 2주 후에, 환자는 AZD-0328에 대한 처방을 위해 병원에 복귀한다. 환자는 간질 증상(즉, 발작)에 대해 0.1mg/kg의 AZD-0328을 경구로 매일 자가 투여한다.

[0587] **실시예 18. 운동장애를 앓고 있는 환자의 치료**

[0588] 비제한적 예에서, 운동장애(예를 들어, 파킨슨증후군 떨림)를 앓고 있는 환자를 본 명세서에 개시된 조성물 및 방법을 치료한다. 환자를 시상하핵(즉, 두개내 STN)에 직접적으로 전달된 1.0mL 용적으로 본 명세서에 개시된 조작된 수용체 중 임의의 하나를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결된 AAV-CamKIIα의 10^{13}개의 벡터로 제1일에 치료한다. 본 실시예에서, AAV 벡터는 흥분성 뉴런에서 선택적 뉴런 발현을 위해 인간 칼슘/카모듈린-의존적 단백질 키나제 II α(CamKIIα) 프로모터의 제어 하에 조작된 수용체를 암호화한다. 주사 2주 후에, 환자는 AZD-0328에 대한 처방을 위해 병원에 복귀한다. 환자는 운동장애 증상(즉, 떨림)에 대해 0.1mg/kg의 AZD-0328을 경구로 매일 자가 투여한다.

[0589] **추가의 번호를 매긴 실시태양**

[0590] 본 발명의 추가 실시태양은 이하의 번호를 매긴 실시태양으로 제공된다:

[0591] 실시태양 1. 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR)로부터 유래된 리간드 결합 도메인을 포함하는 조작된 수용체로서, 여기서 리간드 결합 도메인은 SEQ ID NO: 4의 W77, R101, Y115, L131, Q139, Y140, S170, S172 또는 Y210에 상응하는 아미노산 잔기에서 아미노산 돌연변이를 포함하는 것인 조작된 수용체.

[0592] 실시태양 2. 제 1 실시태양에 있어서,

[0593] 리간드 결합 도메인은 SEQ ID NO: 4의 아미노산 잔기 23-220과 적어도 85% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 조작된 수용체.

[0594] 실시태양 3. 제 1 실시태양 또는 제 2 실시태양에 있어서,

[0595] 리간드 결합 도메인은 SEQ ID NO: 4의 W77, R101, Y115, L131, Q139, Y140, S170, S172 및 Y210에 상응하는 아미노산 잔기로부터 선택된 2개 이상의 아미노산 잔기에서 아미노산 돌연변이를 포함하는 것인 조작된 수용체.

[0596] 실시태양 4. 제 1 실시태양 내지 제 3 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0597] 리간드 결합 도메인은 SEQ ID NO: 4의 지시된 위치에 상응하는 아미노산 잔기(들)에서 돌연변이를 포함하는 것인 조작된 수용체:

[0598] a) Y140;

[0599] b) R101 및 L131;

[0600] c) Y115 및 Y210;

[0601] d) R101 및 Y210;

[0602] e) R101, Y115 및 Y210;

[0603] f) W77, R101 및 L131;

[0604] g) R101, L131 및 S172;

[0605] h) Q139 및 S172D;

[0606] i) S172 및 Y210

[0607] j) L131 및 S172;

[0608] k) Y115 및 S170; 또는

[0609] l) Y115 및 L131.

[0610] 실시태양 5. 제 1 실시태양 내지 제 4 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0611] 돌연변이는 아미노산 치환인 조작된 수용체.

[0612] 실시태양 6. 제 4 실시태양에 있어서,

[0613] 리간드 결합 도메인은 SEQ ID NO: 4의 지시된 위치에 상응하는 아미노산 치환(들)을 포함하는 것인 조작된 수용체:

[0614] a) Y140I;

[0615] b) R101F 및 L131G;

[0616] c) R101F 및 L131D;

[0617] d) Y115E 및 Y210W;

[0618] e) R101W 및 Y210V;

[0619] f) R101F 및 Y210V;

[0620] g) R101F 및 Y210F;

[0621] h) R101M 및 L131A;

[0622] i) R101M 및 L131F;

[0623] j) R101W, Y115E 및 Y210W;

[0624] k) R101F, Y115E 및 Y210W;

[0625] l) W77F, R101F 및 L131D;

[0626] m) R101F, L131N 및 S172D;

[0627] n) Q139E 및 S172D;

[0628] o) S172D 및 Y210W;

[0629] p) L131S 및 S172D;

[0630] q) L131T 및 S172D;

[0631] r) L131D 및 S172D;

[0632] s) Y115D 및 S170T;

[0633] t) Y115D 및 L131Q;

[0634] u) Y115D 및 L131E;

[0635] v) L131E;

[0636] w) Y140C;

[0637] x) R101W;

[0638] y) Y210V; 또는

[0639] z) Q139E.

[0640] 실시태양 7. 제 1 실시태양 내지 제 6 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0641] 조작된 수용체는 인간 글리신 수용체로부터 유래된 이온 기공 도메인을 포함하는 키메라 리간드-개폐 이온 채널(LGIC) 수용체인 조작된 수용체.

[0642] 실시태양 8. 제 7 실시태양에 있어서,

[0643] 인간 글리신 수용체는 인간 글리신 수용체 α1, 인간 글리신 수용체 α2, 또는 인간 글리신 수용체 α3인 조작된 수용체.

[0644] 실시태양 9. 제 7 실시태양에 있어서,

[0645] 이온 기공 도메인은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 255-457, SEQ ID NO: 83의 아미노산 260-452, SEQ ID NO: 85의 아미노산 259-464 또는 SEQ ID NO: 87의 아미노산 259-449와 적어도 85% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 조작된 수용체.

[0646] 실시태양 10. 제 7 실시태양 내지 제 9 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0647] 조작된 수용체의 리간드 결합 도메인은 인간 글리신 수용체로부터 유래된 Cys-루프 도메인을 포함하는 것인 조작된 수용체.

[0648] 실시태양 11. 제 10 실시태양에 있어서,

[0649] Cys-루프 도메인은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 166-172를 포함하는 것인 조작된 수용체.

[0650] 실시태양 12. 제 10 실시태양에 있어서,

[0651] Cys-루프 도메인은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 166-180을 포함하는 것인 조작된 수용체.

[0652] 실시태양 13. 제 1 실시태양 내지 제 12 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0653] 조작된 수용체의 리간드 결합 도메인은 인간 글리신 수용체 α1 서브유닛으로부터의 β1-2 루프 도메인을 포함하는 것인 조작된 수용체.

[0654] 실시태양 14. 제 13 실시태양에 있어서,

[0655] β1-2 루프 도메인은 SEQ ID NO:2의 아미노산 81-84를 포함하는 것인 조작된 수용체.

[0656] 실시태양 15. 제 1 실시태양 내지 제 14 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0657] 조작된 수용체는 SEQ ID NOs 58-78 및 88 중 어느 하나에 따른 아미노산 서열을 포함하는 것인 조작된 수용체.

[0658] 실시태양 16. 제 1 LGIC로부터 유래된 리간드 결합 도메인 및 제 2 LGIC로부터 유래된 이온 기공 도메인을 포함하는 조작된 키메라 리간드-개폐 이온 채널(LGIC)로서, 여기서 제 1 LGIC는 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7- nAChR)이고 SEQ ID NO: 4의 W77, R101, Y115, L131, Q139, Y140, S170, S172 또는 Y210에 상응하는 아미노산 잔기에서 아미노산 돌연변이를 포함하는 것인 조작된 키메라 리간드-개폐 이온 채널(LGIC).

[0659] 실시태양 17. 제 16 실시태양에 있어서,

[0660] 리간드 결합 도메인은 SEQ ID NO: 4의 지시된 위치에 상응하는 아미노산 잔기(들)에서 돌연변이를 포함하는 것인 조작된 키메라 LGIC:

[0661] a. Y140;

[0662] b. R101 및 L131;

[0663] c. Y115 및 Y210;

[0664] d. R101 및 Y210;

[0665] e. R101, Y115 및 Y210;

[0666] f. W77, R101 및 L131;

[0667] g. R101, L131 및 S172;

[0668] h. Q139 및 S172D;

[0669] i. S172 및 Y210

[0670] j. L131 및 S172;

[0671] k. Y115 및 S170; 또는

[0672] l. Y115 및 L131.

[0673] 실시태양 18. 제 16 실시태양에 있어서,

[0674] 리간드 결합 도메인은 SEQ ID NO: 4의 지시된 위치에 상응하는 아미노산 치환(들)을 포함하는 것인조작된 키메라 LGIC:

[0675] a. Y140I;

[0676] b. R101F 및 L131G;

[0677] c. R101F 및 L131D;

[0678] d. Y115E 및 Y210W;

[0679] e. R101W 및 Y210V;

[0680] f. R101F 및 Y210V;

[0681] g. R101F 및 Y210F;

[0682] h. R101M 및 L131A;

[0683] i. R101M 및 L131F;

[0684] j. R101W, Y115E 및 Y210W;

[0685] k. R101F, Y115E 및 Y210W;

[0686] l. W77F, R101F 및 L131D;

[0687] m. R101F, L131N 및 S172D;

[0688] n. Q139E 및 S172D;

[0689] o. S172D 및 Y210W;

[0690] p. L131S 및 S172D;

[0691] q. L131T 및 S172D;

[0692] r. L131D 및 S172D;

[0693] s. Y115D 및 S170T;

[0694] t. Y115D 및 L131Q;

[0695] u. Y115D 및 L131E;

[0696] v. L131E;

[0697] w. Y140C;

[0698] x. R101W;

[0699] y. Y210V; 또는

[0700] z. Q139E.

[0701] 실시태양 19. 제 16 실시태양 내지 제 18 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0702] 제 2 LGIC는 인간 글리신 수용체인 조작된 키메라 LGIC.

[0703] 실시태양 20. 제 19 실시태양에 있어서,

[0704] 인간 글리신 수용체는 인간 글리신 수용체 α1인 조작된 키메라 LGIC.

[0705] 실시태양 21. 제 20 실시태양에 있어서,

[0706] SEQ ID NO: 33과 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 폴리펩타이드 서열을 포함하는 조작된 키메라 LGIC.

[0707] 실시태양 22. 제 1 실시태양 내지 제 21 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0708] 아세틸콜린에 대한 조작된 수용체의 효능은 아세틸콜린에 대한 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR) 또는 대조군 수용체의 효능보다 낮은 것인 조작된 수용체.

[0709] 실시태양 23. 제 22 실시태양에 있어서,

[0710] 아세틸콜린에 대한 조작된 수용체의 효능은 아세틸콜린에 대한 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR) 또는 대조군 수용체의 효능보다 적어도 2배 더 낮은 것인 조작된 수용체.

[0711] 실시태양 24. 제 1 실시태양 내지 제 23 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0712] 비천연 리간드에 대한 조작된 수용체의 효능은 비천연 리간드에 대한 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR) 또는 대조군 수용체의 효능과 거의 동일한 것인 조작된 수용체.

[0713] 실시태양 25. 제 1 실시태양 내지 제 24 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0714] 비천연 리간드에 대한 조작된 수용체의 효능은 비천연 리간드에 대한 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR) 또는 대조군 수용체의 효능보다 더 높은 것인 조작된 수용체.

[0715] 실시태양 26. 제 25 실시태양에 있어서,

[0716] 비천연 리간드에 대한 조작된 수용체의 효능은 비천연 리간드에 대한 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR) 또는 대조군 수용체의 효능보다 적어도 2배 더 높은 것인 조작된 수용체.

[0717] 실시태양 27. 제 22 실시태양 내지 제 26 실시태양 중 어느 하나에 잇어서,

[0718] 리간드에 대한 조작된 수용체의 효능은 Lenti-X 293T 세포를 사용하는 YFP 형광 소광 분석법에 따라 리간드에 대한 수용체의 EC50에 의해 결정되는 것인 조작된 수용체.

[0719] 실시태양 28. 제 1 실시태양 내지 제 27 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0720] 비천연 리간드의 존재하에서 조작된 수용체의 효능은 비천연 리간드의 존재하에서 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR) 또는 대조군 수용체의 효능보다 높은 것인 조작된 수용체.

[0721] 실시태양 29. 제 1 실시태양 내지 제 28 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0722] 비천연 리간드의 존재하에서 조작된 수용체의 효능은 비천연 리간드의 존재하에서 인간 α7 니코틴성 아세틸콜린 수용체(α7-nAChR) 또는 대조군 수용체의 효능보다 적어도 2배 더 높은 것인 조작된 수용체.

[0723] 실시태양 30. 제 28 실시태양 또는 제 29 실시태양에 있어서,

[0724] 효능을 결정하는 것은 비천연 리간드의 존재하에서 시험관 내에서 조작된 수용체를 통과하는 전류의 양을 결정하는 것을 포함하는 것인 조작된 수용체.

[0725] 실시태양 31. 제 24 실시태양 내지 제 30 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0726] 비천연 리간드는 AZD-0328, TC-6987, ABT-126, CNL002, TC-5619, CNL001, TC-6683, 바레니클린 및 파시니클린/RG3487로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인 조작된 수용체.

[0727] 실시태양 32. 제 31 실시태양에 있어서,

[0728] 비천연 리간드는 ABT-126, RG3487 및 CNL002로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인 조작된 수용체.

[0729] 실시태양 33. 제 31 실시태양에 있어서,

[0730] 비천연 리간드는 TC-5619인 조작된 수용체.

[0731] 실시태양 34. 제 1 실시태양 내지 제 33 실시태양 중 어느 한 항의 조작된 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타

이드.

[0732] 실시태양 35. SEQ ID NOs: 58-78 및 88 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 조작된 수용체를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드.

[0733] 실시태양 36. 제 34 실시태양 또는 제 35 실시태양에 있어서,

[0734] 폴리뉴클레오타이드는 조작된 수용체를 암호화하는 핵산에 작동가능하게 연결된 프로모터를 포함하는 것인 폴리뉴클레오타이드.

[0735] 실시태양 37. 제 36 실시태양에 있어서,

[0736] 프로모터는 조절가능한 프로모터인 폴리뉴클레오타이드.

[0737] 실시태양 38. 제 37 실시태양에 있어서,

[0738] 조절가능한 프로모터는 흥분성 세포에서 활성인 폴리뉴클레오타이드.

[0739] 실시태양 39. 제 38 실시태양에 있어서,

[0740] 흥분성 세포는 뉴런 또는 근육세포인 폴리뉴클레오타이드.

[0741] 실시태양 40. 제 39 실시태양에 있어서,

[0742] 흥분성 세포는 뉴런인 폴리뉴클레오타이드.

[0743] 실시태양 41. 제 34 실시태양 내지 제 40 실시태양 중 어느 하나의 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 벡터.

[0744] 실시태양 42. 제 41 실시태양에 있어서,

[0745] 벡터는 플라스미드 또는 바이러스 벡터인 벡터.

[0746] 실시태양 43. 제 42 실시태양에 있어서,

[0747] 벡터는 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아데노 관련 바이러스(AAV) 벡터 및 단순 헤르페스-1 바이러스 벡터(HSV-1)로 이루어진 그룹으로부터 선택된 바이러스 벡터인 벡터.

[0748] 실시태양 44. 제 43 실시태양에 있어서,

[0749] 바이러스 벡터는 AVV 벡터이고, AAV 벡터는 AAV5 또는 이의 변이체, AAV6 또는 이의 변이체 또는 AAV9 또는 이의 변이체인 벡터.

[0750] 실시태양 45. 제 1 실시태양 내지 제 33 실시태양 중 어느 하나의 조작된 수용체, 제 34 실시태양 내지 제 40 실시태양 중 어느 하나의 폴리뉴클레오타이드, 또는 제 41 실시태양 내지 제 44 실시태양 중 어느 하나의 벡터를 포함하는 조성물.

[0751] 실시태양 46. 제 1 실시태양 내지 제 33 실시태양 중 어느 하나의 조작된 수용체, 제 34 실시태양 내지 제 40 실시태양 중 어느 하나의 폴리뉴클레오타이드, 또는 제 41 실시태양 내지 제 44 실시태양 중 어느 하나의 벡터 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물.

[0752] 실시태양 47. 뉴런을 제 34 실시태양 내지 제 40 실시태양 중 어느 하나의 폴리뉴클레오타이드, 제 41 실시태양 내지 제 44 실시태양 중 어느 하나의 벡터, 제 45 실시태양의 조성물, 또는 제 46 실시태양의 약학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하여 뉴런에서 조작된 수용체를 발현시키는 방법.

[0753] 실시태양 48. 제 47 실시태양 또는 제 40 실시태양에 있어서,

[0754] 뉴런은 말초신경계의 뉴런인 방법 또는 폴리뉴클레오타이드.

[0755] 실시태양 49. 제 47 실시태양 또는 제 48 실시태양, 또는 제 40 실시태양에 있어서,

[0756] 뉴런은 중추신경계의 뉴런인 방법 또는 폴리뉴클레오타이드.

[0757] 실시태양 50. 제 47 실시태양 내지 제 49 실시태양 중 어느 하나 또는 제 40 실시태양에 있어서,

[0758] 뉴런은 통각 수용성 뉴런인 방법 또는 폴리뉴클레오타이드.

[0759] 실시태양 51. 제 47 실시태양 내지 제 50 실시태양 중 어느 하나 또는 제 40 실시태양에 있어서,

[0760] 뉴런은 비통각 수용성 뉴런인 방법 또는 폴리뉴클레오타이드.

[0761] 실시태양 52. 제 47 실시태양 내지 제 51 실시태양 중 어느 하나 또는 제 40 실시태양에 있어서,

[0762] 뉴런은 후근신경절(DRG) 뉴런, 삼차신경절(TG) 뉴런, 운동 뉴런, 흥분성 뉴런, 억제성 뉴런, 또는 감각 뉴런인 방법 또는 폴리뉴클레오타이드.

[0763] 실시태양 53. 제 47 실시태양 내지 제 52 실시태양 중 어느 하나 또는 제 40 실시태양에 있어서,

[0764] 뉴런은 Aδ 구심성 섬유, C 섬유 또는 Aβ 구심성 섬유인 방법 또는 폴리뉴클레오타이드.

[0765] 실시태양 54. 제 53 실시태양 또는 제 40 실시태양에 있어서,

[0766] 뉴런은 Aβ 구심성 섬유인 방법 또는 폴리뉴클레오타이드.

[0767] 실시태양 55. 제 54 실시태양 또는 제 40 실시태양에 있어서,

[0768] Aβ 구심성 섬유는 손상된 Aβ 구심성 섬유인 방법 또는 폴리뉴클레오타이드.

[0769] 실시태양 56. 제 54 실시태양 또는 제 40 실시태양에 있어서,

[0770] Aβ 구심성 섬유는 손상되지 않은 Aβ 구심성 섬유인 방법 또는 폴리뉴클레오타이드.

[0771] 실시태양 57. 제 47 실시태양 내지 제 56 실시태양 중 어느 하나 또는 제 40 실시태양에 있어서,

[0772] 뉴런은 신경필라멘트 200(NF200), 피에조 2 및 TLR-5를 발현하는 것인 방법 또는 폴리뉴클레오타이드.

[0773] 실시태양 58. 제 47 실시태양 내지 제 57 실시태양 중 어느 하나 또는 제 40 실시태양에 있어서,

[0774] 뉴런은 TrpV1, 전립선산 포스파타제, NaV1.1을 발현하지 않는 것인 방법 또는 폴리뉴클레오타이드.

[0775] 실시태양 59. 제 47 실시태양 내지 제 58 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0776] 접촉 단계는 시험관내, 생체외 또는 생체내에서 수행되는 것인 방법.

[0777] 실시태양 60. 제 59 실시태양에 있어서,

[0778] 접촉 단계는 대상에서 생체내에서 수행되는 것인 방법.

[0779] 실시태양 61. 제 60 실시태양에 있어서,

[0780] 접촉 단계는 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 조성물, 또는 약학적 조성물을 대상에게 투여하는 것을 포함하는 것인 방법.

[0781] 실시태양 62. 제 61 실시태양에 있어서,

[0782] 접촉 단계는 시험관내 또는 생체외에서 수행되는 것인 방법.

[0783] 실시태양 63. 제 62 실시태양에 있어서,

[0784] 접촉 단계는 리포펙션, 나노입자 전달, 입자 충격, 전기천공, 초음파처리 또는 미세주입을 포함하는 것인 방법.

[0785] 실시태양 64. 제 47 실시태양 내지 제 63 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0786] 조작된 수용체는 뉴런의 세포 표면에 국소화할 수 있는 것인 방법.

[0787] 실시태양 65. (a) 뉴런을 제 1 실시태양 내지 제 33 실시태양 중 어느 하나의 조작된 수용체, 제 34 실시태양 내지 제 40 실시태양 중 어느 하나의 폴리뉴클레오타이드 또는 제 41 실시태양 내지 제 44 실시태양 중 어느 하나의 벡터, 제 45 실시태양의 조성물 또는 제 46 실시태양의 약학적 조성물과 접촉시키는 단계, 및 (b) 뉴런을 조작된 수용체의 비천연 리간드와 접촉시키는 단계를 포함하여 뉴런의 활성을 억제하는 방법.

[0788] 실시태양 66. 제 65 실시태양에 있어서,

[0789] 뉴런은 말초신경계의 뉴런인 방법.

[0790] 실시태양 67. 제 65 실시태양에 있어서,

[0791] 뉴런은 중추신경계의 뉴런인 방법.

[0792] 실시태양 68. 제 65 실시태양 내지 제 67 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0793] 뉴런은 통각 수용성 뉴런인 방법.

[0794] 실시태양 69. 제 65 실시태양 내지 제 67 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0795] 뉴런은 비통각 수용성인 뉴런인 방법.

[0796] 실시태양 70. 제 65 실시태양 내지 제 69 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0797] 뉴런은 후근신경절(DRG) 뉴런, 삼차신경절(TG) 뉴런, 운동 뉴런, 흥분성 뉴런, 억제성 뉴런, 또는 감각 뉴런인 방법.

[0798] 실시태양 71 제 65 실시태양 내지 제 70 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0799] 뉴런은 Aδ 구심성 섬유, C 섬유 또는 Aβ 구심성 섬유인 방법.

[0800] 실시태양 72. 제 71 실시태양에 있어서,

[0801] 뉴런은 Aβ 구심성 섬유인 방법.

[0802] 실시태양 73. 제 72 실시태양에 있어서,

[0803] Aβ 구심성 섬유는 손상된 Aβ 구심성 섬유인 방법.

[0804] 실시태양 74. 제 72 실시태양에 있어서,

[0805] Aβ 구심성 섬유는 손상되지 않은 Aβ 구심성 섬유인 방법.

[0806] 실시태양 75. 제 65 실시태양 내지 제 74 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0807] 뉴런은 신경필라멘트 200(NF200), 피에조 2 및 TLR-5를 발현하는 것인 방법.

[0808] 실시태양 76. 제 65 실시태양 내지 제 75 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0809] 뉴런은 TrpV1, 전립선산 포스파타제, NaV1.1을 발현하지 않는 것인 방법.

[0810] 실시태양 77. 제 65 실시태양 내지 제 76 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0811] 접촉 단계(a)는 시험관내, 생체외 또는 생체내에서 수행되는 것인 방법.

[0812] 실시태양 78. 제 65 실시태양 내지 제 77 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0813] 접촉 단계(b)는 시험관내, 생체외 또는 생체내에서 수행되는 것인 방법.

[0814] 실시태양 79. 제 65 실시태양 내지 제 78 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0815] 접촉 단계(a) 및/또는 (b)는 대상에서 생체내에서 수행되는 것인 방법.

[0816] 실시태양 80. 제 79 실시태양에 있어서,

[0817] 접촉 단계(a)는 대상에게 조작된 수용체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터 또는 약학적 조성물을 투여하는 것을 포함하고; 및/또는 접촉 단계(b)는 대상에게 비천연 리간드를 투여하는 것을 포함하는 것인 방법.

[0818] 실시태양 81. 제 65 실시태양 내지 제 80 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0819] 접촉 단계(a) 및/또는 (b)는 리포펙션, 나노입자 전달, 입자 충격, 전기천공, 초음파처리 또는 미세주입을 포함하는 것인 방법.

[0820] 실시태양 82. 제 65 실시태양 내지 제 81 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0821] 조작된 수용체는 뉴런의 세포 표면에 국소화할 수 있는 것인 방법.

[0822] 실시태양 83.

[0823] a. 대상에게 제 1 항 내지 제 33 항 중 어느 한 항의 조작된 수용체, 제 34 항 내지 제 40 항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오타이드 또는 제 41 항 내지 제 44 항 중 어느 한 항의 벡터, 제 45 항의 조성물 또는 제 46 항의 약학적 조성물을 투여하는 단계, 및

[0824] b. 대상에게 조작된 수용체의 비천연 리간드를 투여하는 단계를 포함하여 필요로 하는 대상에서 신경학적 장애의 개시를 치료 및/또는 지연시키는 방법.

[0825] 실시태양 84. 제 83 실시태양에 있어서,

[0826] 대상은 단계(a) 후에 비천연 리간드를 투여받는 것인 방법.

[0827] 실시태양 85. 제 83 실시태양에 있어서,

[0828] 대상은 단계(a)와 동시에 비천연 리간드를 투여받는 것인 방법.

[0829] 실시태양 86. 제 83 실시태양 내지 제 85 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0830] 신경학적 장애는 발작 장애, 운동 장애, 섭식 장애, 척수 손상, 신경인성 방광, 이질통, 경직 장애, 소양증, 알츠하이머병, 파킨슨병, 외상 후 스트레스 장애(PTSD), 위식도 역류 질환(GERD), 중독, 불안, 우울증, 기억 상실, 치매, 수면 무호흡증, 뇌졸중, 기면증, 요실금, 본태성 떨림, 삼차 신경통, 구강 작열감 증후군 또는 심방 세동인 방법.

[0831] 실시태양 87. 제 86 실시태양에 있어서,

[0832] 신경학적 장애는 이질통인 방법.

[0833] 실시태양 88. 제 83 실시태양 내지 제 87 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0834] 비천연 리간드는 AZD-0328, ABT-126, TC6987, CNL002, TC-5619, CNL001, TC-6683, 바레니클린 및 파시니클린/RG3487로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인 방법.

[0835] 실시태양 89. 제 83 실시태양 내지 제 88 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0836] 비천연 리간드는 경구, 피하, 국소 또는 정맥내로 투여되는 것인 방법.

[0837] 실시태양 90. 제 89 실시태양에 있어서,

[0838] 비천연 리간드는 경구로 투여되는 것인 방법.

[0839] 실시태양 91. 제 83 실시태양 내지 제 90 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0840] 조작된 수용체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 조성물 또는 약학적 조성물은 피하, 경구, 경막내, 국소, 정맥내, 신경절내, 신경내, 두개내, 척수내 또는 대수조에 투여되는 것인 방법.

[0841] 실시태양 92. 제 83 실시태양 내지 제 91 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0842] 조작된 수용체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 조성물, 또는 약학적 조성물은 추간공 주사에 의해 또는 척수강내로 투여되는 것인 방법.

[0843] 실시태양 93. 제 83 실시태양 내지 제 92 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0844] 대상은 삼차 신경통을 앓고 있고, 조작된 수용체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 조성물, 또는 약학적 조성물은 대상의 삼차 신경절(TG)에 투여되는 것인 방법.

[0845] 실시태양 94. 제 83 실시태양 내지 제 92 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0846] 대상은 신경병증성 통증을 앓고 있고, 조작된 수용체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 조성물, 또는 약학적 조성물은 대상의 후근 신경절(DRG)에 투여되는 것인 방법.

[0847] 실시태양 95. 제 83 실시태양 내지 제 94 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0848] 대상은 인간인 방법.

[0849] 실시태양 96. 제 83 실시태양 내지 제 95 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0850] 치료적 유효량은 신경학적 장애의 징후 및/또는 증상의 중증도를 감소시키는 것인 방법.

[0851] 실시태양 97. 제 83 실시태양 내지 제 96 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0852] 치료적 유효량은 신경학적 장애의 징후 및/또는 증상의 개시를 지연하는 것인 방법.

[0853] 실시태양 98. 제 83 실시태양 내지 제 97 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0854] 치료적 유효량은 신경학적 장애의 징후 및/또는 증상을 제거하는 것인 방법.

[0855] 실시태양 99. 제 96 실시태양 내지 제 98 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0856] 신경학적 장애의 징후는 신경 손상, 신경 위축 및/또는 발작인 방법.

[0857] 실시태양 100. 제 99 실시태양에 있어서,

[0858] 신경 손상은 말초 신경 손상인 방법.

[0859] 실시태양 101. 제 96 실시태양 내지 제 100 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0860] 신경학적 장애의 증상은 통증인 방법.

[0861] 실시태양 102.

[0862] a. 대상에게 제 1 실시태양 내지 제 33 실시태양 중 어느 하나의 조작된 수용체, 제 34 실시태양 내지 제 40 실시태양 중 어느 하나의 폴리뉴클레오타이드 또는 제 41 실시태양 내지 제 44 실시태양 중 어느 하나의 벡터, 제 45 실시태양의 조성물 또는 제 46 실시태양의 약학적 조성물을 투여하는 단계, 및

[0863] b. 대상에게 조작된 수용체의 비천연 리간드를 투여하는 단계를 포함하여 필요로 하는 대상에서 통증의 개시를 치료 및/또는 지연시키는 방법.

[0864] 실시태양 103. 제 102 실시태양에 있어서,

[0865] 대상은 단계(a) 후에 비천연 리간드를 투여받는 것인 방법.

[0866] 실시태양 104. 제 102 실시태양에 있어서,

[0867] 대상은 단계(a)와 동시에 비천연 리간드를 투여받는 것인 방법.

[0868] 실시태양 105. 제 102 실시태양 내지 제 104 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0869] 비천연 리간드는 AZD-0328, ABT-126, TC6987, CNL002, TC-5619, CNL001, TC-6683, 바레니클린 및 파시니클린/RG3487로 이루어진 그룹으로부터 선택되는 것인 방법.

[0870] 실시태양 106. 제 102 실시태양 내지 제 105 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0871] 비천연 리간드는 경구, 피하, 국소 또는 정맥내로 투여되는 것인 방법.

[0872] 실시태양 107. 제 106 실시태양에 있어서,

[0873] 비천연 리간드는 경구로 투여되는 것인 방법.

[0874] 실시태양 108. 제 102 실시태양 내지 제 107 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0875] 조작된 수용체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 조성물 또는 약학적 조성물은 피하, 경구, 경막내, 국소, 정맥내, 신경절내, 신경내, 두개내, 척수내 또는 대수조에 투여되는 것인 방법.

[0876] 실시태양 109. 제 102 실시태양 내지 제 108 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0877] 조작된 수용체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 조성물, 또는 약학적 조성물은 추간공 주사에 의해 또는 척수강내로 투여되는 것인 방법.

[0878] 실시태양 110. 제 102 실시태양 내지 제 109 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0879] 대상은 삼차 신경통을 앓고 있고, 조작된 수용체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 조성물, 또는 약학적 조성물은 대상의 삼차 신경절(TG)에 투여되는 것인 방법.

[0880] 실시태양 111. 제 102 실시태양 내지 제 110 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0881] 대상은 신경병증성 통증을 앓고 있고, 조작된 수용체, 폴리뉴클레오타이드, 벡터, 조성물, 또는 약학적 조성물은 대상의 후근 신경절(DRG)에 투여되는 것인 방법.

[0882] 실시태양 112. 제 102 실시태양 내지 제 111 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0883] 대상은 인간인 방법.

[0884] 실시태양 113. 제 101 실시태양 내지 제 112 실시태양 중 어느 한 항에 있어서,

[0885] 통증은 신경병성 통증인 방법.

[0886] 실시태양 114. 제 101 실시태양 내지 제 113 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0887] 통증은 화학요법과 연관되거나, 이에 의해 야기되거나, 또는 이로부터 초래되는 것인 방법.

[0888] 실시태양 115. 제 101 실시태양 내지 제 114 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0889] 통증은 외상과 연관되거나, 외상에 의해 야기되거나, 외상으로부터 초래되는 것인 방법.

[0890] 실시태양 116. 제 101 실시태양 내지 제 115 항 실시태양 어느 하나에 있어서,

[0891] 대상은 이질통을 앓고 있는 것인 방법.

[0892] 실시태양 117. 제 101 실시태양 내지 제 116 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0893] 통증은 의료 시술 후에 나타나는 것인 방법.

[0894] 실시태양 118. 제 101 실시태양 내지 제 117 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0895] 통증은 출산 또는 제왕절개와 연관되거나, 이에 의해 야기되거나, 또는 이로부터 초래되는 것인 방법.

[0896] 실시태양 119. 제 101 실시태양 내지 제 118 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0897] 통증은 편두통과 연관되거나, 이에 의해 야기되거나, 또는 이로부터 초래되는 것인 방법.

[0898] 실시태양 120. 제 101 실시태양 내지 제 119 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0899] 치료적 유효량은 대상의 통증을 일시적으로 감소시키고, 대상의 통증을 영구적으로 감소시키고, 대상의 통증 개시를 예방하고/하거나 대상의 통증을 제거하는 것인 방법.

[0900] 실시태양 121. 제 101 실시태양 내지 제 120 실시태양 중 어느 하나에 있어서,

[0901] 단계(a) 및 (b)는 대상에서 통증이 나타나기 전에 수행되는 것인 방법.

[0902] 실시태양 122.

[0903] (a) 제 41 실시태양 내지 제 44 실시태양 중 어느 하나의 벡터 및 (b) 조작된 수용체의 비천연 리간드를 포함하는 키트.

[0904] 실시태양 123.

[0905] (a) 제 1 실시태양 내지 제 33 실시태양 중 어느 하나의 조작된 수용체, 및 (b) 조작된 수용체의 비천연 리간드를 포함하는 키트.

[0906] 실시태양 124. 제 122 실시태양 또는 제 123 실시태양에 있어서,

[0907] 조작된 수용체 및 비천연 리간드의 조합은 표 29에 제공된 조합 중 어느 하나에 따르는 것인 키트.

[0908] 실시태양 125. 제 122 실시태양 또는 제 124 실시태양에 있어서,

[0909] 벡터의 투여에 적합한 장치를 포함하는 키트.

[0910] 상기 서술한 것은 단지 본 발명의 원칙을 예시한다. 본 명세서에서 경험적으로 기재하거나 나타내지 않았지만, 당업자가 본 발명의 원칙을 구현하고 취지와 범위 내에 포함되는 다양한 배열을 고안할 수 있다는 것이 인식될 것이다. 더 나아가, 본 명세서에 열거된 모든 실시예 및 조건적 언어는 원칙적으로 독자가 본 발명의 원칙 및 본 발명자에 의해 더 장래의 기술에 기여하는 개념을 이해하는 데 도움을 주는 것으로 의도되며, 이러한 구체적으로 열거되는 실시예 및 조건에 대한 제한은 없는 것으로 해석되어야 한다. 게다가, 본 발명의 원칙, 양태 및 실시태양을 열거하는 본 명세서의 모든 서술뿐만 아니라 이의 구체적 실시예는 이의 구조적 동등물과 기능적 동등물을 둘 다 포함하는 것으로 의도된다. 추가적으로, 이러한 동등물은 현재 공지된 동등물과 장래에 개발되는 동등물, 즉, 구조와 상관없이 동일한 기능을 수행하는 임의의 개발 요소를 포함하는 것으로 의도된다. 따라서, 본 발명의 범주는 본 명세서에 나타내고 기술한 예시적인 실시태양을 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

오히려, 본 발명의 취지와 범위는 첨부하는 청구범위에 의해 구현된다.

도면

도면1a

		아세틸콜린									
명칭	SEQ ID NO: 33에서 아미노산 돌연변이(들)	10 uM ach	30 uM ach	50 uM ach	100 uM ach	300 uM ach	500 uM ach	1 mM ach	3 mM ach	5 mM ach	10 mM ach
CODA71	-	15.61	63.31	73.16	74.94	65.94	62.78	74.24	76.27	77.15	77.96
CODA75	SEQ ID NO: 29	-12.88	-18.67	-0.29	-14.46	-16.31	-17.41	-16.46	-12.38	-20.88	-8.69
CODA217	W77F	-5.86			70.06			68.71	73.45		
CODA109	S170T	82.91	82.53	82.11	83.68			69.89	78.12		
CODA236	R101F	-18.24			60			66.07	71.38		
CODA237	R101M	-16.79			-18.63			46.28	69.31		
CODA238	R101W	-16.58			75.18			78.99	75.74		
CODA282	Y115D	6.81			1.19			-14.05	2.37		
CODA283	Y115E_N379K	-6.16			-11.12			-2.74	53.61		
CODA325	L131G	5.66			74.07			62.65	69.49		
CODA326	L131A	7.43			73.57			71.8	74.49		
CODA330	L131F	11.07			43.34			77.52	74.89		
CODA333	L131S	-10.11			-10.05			32.11	57.37		
CODA334	L131Q	-2.63	30.06		71.27			79.66	74.9		
CODA335	L131T	-9.13			-9.29			0.57	35.37		
CODA339	L131D	4.56			10.19			77.34	77.79		
CODA340	L131E	15.29	66.56		81.31			80.77	77.31		
CODA342	L131R	-2.57			-3.18			78.98	75.75		
CODA337	L131N	28.32			81.8			71.22	73.7		
CODA945	Q139E	-1.25			71.21			71.79	76.04		
CODA377	S172D	-3.19			0.07			71.7	76.95		
CODA405	Y210V	-6.31			-14.48			-2.82	1.06		
CODA407	Y210F	-3.75			-1.6			71.65	79.09		
CODA409	Y210W	-5.43			17.14			78.84	78.55		
CODA534	L131S_S172D	-11.3			-27.53			2.84	14.65		
CODA535	L131T_S172D	-12.24			-26.23			-1.16	2.97		
CODA536	L131D_S172D	-12.91			-20.88			79.85	79.98		
CODA805	Y115D_S170T	-0.46			-4.93			-11.18	-3.53		
CODA806	Y115D_L131Q	9.47			6.12			-1.56	17.57		
CODA807	Y115D_L131E	15.45			13.77			27.42	53.62		
CODA952	Y140I	-1.97			2.79			58.81	66.9		
CODA965	Y140C	-21.71			3.49			63.34	51.92		
CODA1025	R101F_L131G	12.57		-3.46	12.65	-6.96	-6.77	19.42	65.06		
CODA1027	R101F_L131D	-1.62		-1.6	-2.62	-6.12	-7.71	-5.73	33.69		
CODA1039	Y115E_Y210W	-2.97		-3.94	0.35	-4.13	-5.18	1.21	26.69		
CODA1045	R101W_Y210V	-2.52			-11.98	-16.71	-12.87	-14.41	-7.4		-1.5
CODA1047	R101F_Y210V	-4.26			-13.05	-11.73	-10.75	-8.81	-6.77		-1.03
CODA1048	R101F_Y210F				-17.31	-13.7	-10.1	5.53	68.61		78.22
CODA1053	R101M_L131A	-3.98			-11	-7.92	7.36	57.28	60.54		79.46
CODA1054	R101M_L131F	-3.98			-10.34	-10.25	-11.46	1.77	36.81		74.02
CODA1055	R101W_Y115E_Y210W				-15.63	-12.05	-12.87	-11.55	12.68		37.58
CODA1056	R101F_Y115E_Y210W				-20.55	-19.32	-19.75	-14.08	14.07		25.7
CODA1138	W77F_R101F_L131D	-12.92	-15.36		-19.35	-14.79		37.5	61.73		
CODA1140	R101F_L131N_S172D	-20.07	-16.92		-25.8	-11.21		9.02	45		
CODA1157	Q139E_S172D	-36.89	-37.78		-25.67	-18.94		16.38	45.71		
CODA1173	S172D_Y210W							-6.12	11.31		

도면1b

		CNL001									
명칭	SEQ ID NO: 33에서 아미노산의 돌연변이(들)	1nM CNL001	1nM CNL001	10nM CNL001	10nM CNL001	50nM CNL001	50nM CNL001	100nM CNL001	100nM CNL001	1uM CNL001	1uM CNL001
CODA71	-	3.727	20.231	81.096	82.368	83.62	84.482	84.297	85.368	85.647	86.358
CODA75	SEQ ID NO: 29	-8.496	-2.266	1.816	-4.649	-5.922	-5.597	-8.159	-5.058	-4.272	-1.281
CODA217	W77F	-22.273	-19.415	-9.563	6.398	61.938	66.837	79.791	80.908	83.444	83.905
CODA109	S170T	19.755	65.484	79.024	81.563	81.926	83.092	83	83.811	81.834	83.858
CODA236	R101F	9.048	26.601	71.533	72.948	75.895	74.238	76	75.861	76.367	76.162
CODA237	R101M	-2.114	-5.079	15.096	50.554	66.585	74.462	78	77.411	79.06	79.162
CODA238	R101W	32.42	54.768	75.149	75.339	75.881	77.844	78	78.575	81.126	79.482
CODA282	Y115D	-15.837	-6.519	-4.862	-8.244	-3.807	-2.871	-7.924	2.11	11.047	8.04
CODA283	Y115E_N379K	-0.713	-0.621	7.739	15.277	19.489	33.703	56.886	60.171	69.836	73.855
CODA325	L131G	74.429	78.715	79.033	79.322	79.966	80.091	81	79.701	79.289	80.581
CODA326	L131A	76.424	80.567	80.284	81.232	81.575	82.544	81	81.718	82.334	81.539
CODA330	L131F	76.289	78.896	79.339	80.245	80.831	80.605	81	80.663	81.293	81.428
CODA333	L131S	76.165	78.463	79.349	78.238	80.221	81.789	81.855	80.766	81.707	82.665
CODA334	L131Q	76.165	78.463	79.349	78.238	80.221	81.789	82	80.766	81.707	82.665
CODA335	L131T	-9.942	-0.475	17.889	38.46	61.741	69.159	73.635	76.092	80.633	79.637
CODA339	L131D	73.711	76.44	77.049	77.76	77.882	78.708	79.567	79.273	79.992	79.927
CODA340	L131E	76.413	77.144	78.258	78.763	79.757	79.327	79.011	79.948	79.855	80.618
CODA342	L131R	23.532	26.054	43.69	54.016	59.955	56.091	64.536	58.987	65.987	64.312
CODA337	L131N	76.917	79.554	79.479	79.506	81.465	81.297	82.619	81.722	81.96	81.773
CODA945	Q139E	6.65	13.512	78.678	82.723	84.91	84.849	85.046	84.642	85.493	86.073
CODA377	S172D	67.544	74.209	74.346	75.816	77.068	76.99	79.352	77.865	80.272	79.432
CODA405	Y210V	-16.246	-4.217	-6.142	-10.003	-11.054	-10.06	-3.832	-3.784	1.129	7.1
CODA407	Y210F	-10.845	-2.629	4.66	12.246	29.307	41.78	50.654	62.054	81.742	81.304
CODA409	Y210W	-8.914	-14.319	-1.444	4.393	11.897	11.434	12.719	16.053	14.077	15.495
CODA534	L131S_S172D	23.438	28.59	56.882	56.777	65.044	67.373	68.666	70.357	73.019	73.527
CODA535	L131T_S172D	8.736	24.572	60.552	63.09	73.242	73.889	76.147	76.21	78.988	78.818
CODA805	Y115D_S170T	-10.729	-15.278	-20.403	-14.905	-14.303	-15.741	-12.637	-10.606	-13.535	-11.335
CODA806	Y115D_L131Q	6.587	-5.179	-2.366	-1.272	2.763	1.995	3.091	1.45	7.331	9.103
CODA807	Y115D_L131E	0.885	-1.707	-0.567	0.043	5.141	9.409	9.796	11.009	27.914	29.109
CODA952	Y140I	0.368	-1.976	-3.923	4.348	74.107	75.866	80.323	81.996	83.489	82.208
CODA965	Y140C	-12.765	-12.608	68.134	71.394	80.298	82.159	82.404	82.14	82.34	80.649
CODA1025	R101F_L131G	-18.527	-21.577	14.063	49.818	77.765	79.23	80.344	80.695	81.191	82.385
CODA1027	R101F_L131D	24.049	36.755	52.927	61.449	67.308	68.77	69.049	71.613	71.811	69.907
CODA1039	Y115E_Y210W	-1.12	-3.941	6.275	11.943	12.949	18.635	17.576	18.319	19.329	20.672
CODA1045	R101W_Y210V	0.804	11.275	15.843	16.619	15.205	18.771	9.332	18.218	35.294	36.542
CODA1047	R101F_Y210V	-7.82	-8.382	-5.381	-1.431	-0.999	3.909	-0.823	-5.885	1.638	3.483
CODA1048	R101F_Y210F	9.114	0.845	28.944	53.629	68.581	74.379	80.541	80.774	83.143	81.751
CODA1053	R101M_L131A	-8.554	-13.711	39.631	66.809	82.122	82.031	83.312	83.986	84.363	83.877
CODA1054	R101M_L131F	21.932	39.689	54.192	64.111	71.409	70.989	74.148	71.722	71.378	71.411
CODA1055	R101W_Y115E_Y210W	-12.889	-13.295	-10.401	-7.981	-1.972	-1.661	0.277	4.325	2.88	3.259
CODA1056	R101F_Y115E_Y210W	-8.104	-12.153	-10.462	-4.735	-8.617	-1.606	-1.243	1.838	-0.567	4.663
CODA1138	W77F_R101F_L131D	-6.175	5.89	-2.032	7.601	9.263	4.423	24	30.448	73.823	73.271
CODA1140	R101F_L131N_S172D	52.592	61.248	71.678	71.881	73.807	75.649	76	76.329	76.168	74.076
CODA1157	Q139E_S172D	68.362	69.495	75.078	74.193	77.481	77.205	77	77.042	78.2	76.244
CODA1173	S172D_Y210W	16.321	30.264	61.978	65.343	73.006	74.903	76	76.759	76.928	76.619

도면1c

		TC-6683				
명칭	SEQ ID NO: 33에서 아미노산 돌연변이(들)	30nM TC-6683	300nM TC-6683	3uM TC-6683	30uM TC-6683	100uM TC-6683
CODA71	-	-14.43	-13.08	-13.71	-14.02	-8.77
CODA282	Y115D	0.365	-6.865	-4.927	-11.259	-11.894
CODA325	L131G	-21.27	-18.33	-7.03	56.84	64.51
CODA326	L131A	-16.28	-11.73	-2.38	-9.77	0.97
CODA330	L131F	-22.26	-18.89	-9.45	-9.23	-10.75
CODA333	L131S	-23.88	-21.46	-21.07	-16.15	-18.96
CODA334	L131Q	-17.99	-23.26	-18.84	-16.92	-15.59
CODA335	L131T	-13.84	-20.66	-17.86	-18.91	-16.88
CODA339	L131D	-18.32	-17.25	-10	-8.51	-9.77
CODA340	L131E	30.14	33.02	41.68	35.75	24.32
CODA342	L131R	-16.26	-22.45	-13.48	-12.68	-10.33
CODA337	L131N	-11.51	-13.17	-5.46	8.53	14.41
CODA945	Q139E	-26.47	-18.62	-13.39	-16.6	-12.89
CODA377	S172D	-20.23	-13.94	-14.17	1.86	43.61
CODA534	L131S_S172D	-22.464	-23.976	-24.897	-20.474	-22.253
CODA535	L131T_S172D	-29.362	-28.954	-23.708	-23.431	-18.324
CODA536	L131D_S172D	-22.285	-23.926	-20.514	-3.078	7.37
CODA807	Y115D_L131E	-26.801	-25.363	-23.651	-26.235	-24.182
CODA952	Y140I	-27.7	-26.87	-31.2	-33.12	-24.67
CODA965	Y140C	-8.21	-16.37	-19.48	-24.32	-24.99
CODA1025	R101F_L131G	-1.645	3.043	0.082	2.449	10.437
CODA1027	R101F_L131D	1.189	0.939	1.327	-0.845	-3.136
CODA1039	Y115E_Y210W	-1.608	-3.491	-6.153	-9.263	-9.19
CODA1045	R101W_Y210V	1.735	0.642	2.403	6.006	-4.277
CODA1047	R101F_Y210V	-24.195	-24.234	-21.291	-16.363	-24.9
CODA1048	R101F_Y210F	-29.055	-33.935	-24.613	-21.752	-22.815
CODA1054	R101M_L131F	-22.996	-27.055	-18.611	-13.879	-21.521
CODA1055	R101W_Y115E_Y210W	-30.056	-30.801	-25.558	-18.295	-17.554
CODA1056	R101F_Y115E_Y210W	-19.889	-22.443	-12.623	-10.728	-10.959

도면1d

		TC-5619/브라다니클린						
명칭	SEQ ID NO: 33에서 아미노산 돌연변이(들)	1 nM brd	3 nM brd	10 nM brd	30 nM brd	100 nM brd	300 nM brd	1 uM brd
CODA71	-	9.41	44.38	76.61	70.23	78.62	75.51	
CODA75	SEQ ID NO: 29	-13.39	-15.78	-13.47	-16.41		-17.56	
CODA217	W77F		-12.1		-14.72		-6.3	
CODA109	S170T		70.58		80.71		80.66	
CODA236	R101F		49.33		77.38		77.51	
CODA237	R101M		-14.87		69.93		76.57	
CODA238	R101W		74.7		76.78		77.01	
CODA282	Y115D	-0.54	-7.22	-2.82	-16.67	-0.02	-12.37	31.23
CODA283	Y115E_N379K	0.59	-6.41	-1.58	-14.24	33.36	43.81	75.39
CODA325	L131G		68.45		76.95		77.1	
CODA326	L131A		72.24		77.4		78.02	
CODA330	L131F	-12.4	25.12	72.19	76.35	78.94	77.06	78.61
CODA333	L131S	-0.85	-2.05	-2.8	-2.07	30.34	50.56	72.42
CODA334	L131Q		41.92		63.65		64.85	
CODA335	L131T	-2.39	-4.08	-3.3	-9.69	-1.05	10.53	34.72
CODA339	L131D	4.12	19.15	68.98	77.29	81.41	75.79	82.26
CODA340	L131E		68.57		76.85		78.49	
CODA342	L131R	-7.83	-12.89	-10.47	59.48	70.19	75.11	77.42
CODA337	L131N		71.02		78.43		77.12	
CODA945	Q139E		14.15		78.18		76.8	
CODA377	S172D	0.77	-4.59	0.06	-10.48	0.25	-10.61	3.82
CODA405	Y210V		9.92		4.37		59	
CODA407	Y210F		-0.53		8.71		76.26	
CODA409	Y210W	-13.45	-0.64	37.3	76.36	72.72	75.47	78.73
CODA534	L131S_S172D	-1.13	-3.83	-3.78		-2.03		1.68
CODA536	L131D_S172D	-1.24	0.25	-2.57	0.78	4.51	30.97	44.41
CODA805	Y115D_S170T	-9.78	-12.06	-9.02	-16.3	-7.44	-10.93	-4.55
CODA806	Y115D_L131Q	0.92	-4.65	0.38	-8.96	12.18	-0.3	45.47
CODA807	Y115D_L131E	-1.52	-5.35	-3.49	-2.16	4.18	70.2	43.11
CODA952	Y140I		-2.45		66.97		78.48	
CODA965	Y140C		-18.49		22.66		38.02	
CODA1025	R101F_L131G	-10.61	2.63	17.71	68.48		75.12	
CODA1027	R101F_L131D	-10.07	-0.8	1.74	53.95		76.74	
CODA1039	Y115E_Y210W	-5.55	6.78	-2.7	34.43		70.05	
CODA1045	R101W_Y210V	-1.431	-14.993	-5.52	15.49	72.105	71.411	
CODA1047	R101F_Y210V	-5.548	-9.432	-3.068	2.368	47.529	74.413	
CODA1048	R101F_Y210F	-2.084	-9.098	-2.587	55.818	76.957	74.268	
CODA1053	R101M_L131A	0.008	43.21	77.672	76.277	76.856	75.32	
CODA1054	R101M_L131F	6.609	-7.635	4.459	69.782	77.633	72.933	
CODA1055	R101W_Y115E_Y210W	-8.113	-11.136	38.755	39.111	61.378	52.398	
CODA1056	R101F_Y115E_Y210W	-7.894	-11.812	36.211	40.624	65.869	59.661	

도면1e

		CNL002					
명칭	SEQ ID NO: 33에서 아미노산 돌연변이(들)	1nM CNL002	10nM CNL002	50nM CNL002	100 nM CNL002	1 uM CNL002	30 uM CNL002
CODA71	-				49.61	74.15	75.21
CODA75	SEQ ID NO: 29				-7.94	-9.81	-15.27
CODA217	W77F				67.81	69.42	73.64
CODA109	S170T				73.48	70.03	
CODA236	R101F				-9.56	56.9	70.28
CODA237	R101M				-8.68	-2.24	66.99
CODA238	R101W				2.95	67.93	73.02
CODA282	Y115D				-9.7	-8.37	3.4
CODA283	Y115E_N379K				-5.81	9.69	-12.85
CODA325	L131G				45.62	74.72	77.4
CODA326	L131A				27.88	73.79	75.89
CODA330	L131F				-3.76	68.51	77.77
CODA333	L131S				-15.44	15.21	
CODA334	L131Q				49.9	80.72	80.97
CODA335	L131T				-14.53	6.45	57.43
CODA339	L131D				12.83	77.73	80.58
CODA340	L131E				49.97	67.8	64.58
CODA342	L131R				-17.2	8.12	57.24
CODA337	L131N				76.37	80.18	80.93
CODA945	Q139E				60.5	75.41	77.46
CODA377	S172D				59.35	79.26	79.96
CODA405	Y210V				-14.3	-7.56	-2.02
CODA407	Y210F				-12.47	-3.93	80.97
CODA409	Y210W				-14.92	-0.85	29.62
CODA534	L131S_S172D				14.26	45.55	64.93
CODA535	L131T_S172D				1.23	35.77	68.29
CODA536	L131D_S172D				71.72	77.26	77.5
CODA805	Y115D_S170T				-18.17	-15.2	-14
CODA806	Y115D_L131Q				-10.03	-3.33	6.96
CODA807	Y115D_L131E				-5.71	13.03	25.2
CODA952	Y140I				32.58	69.08	73.28
CODA965	Y140C				43.24	42.72	51.43
CODA1025	R101F_L131G				12.48	46.04	39.82
CODA1027	R101F_L131D				7.75	61.97	65.77
CODA1039	Y115E_Y210W				21.85	47.37	59.97
CODA1138	W77F_R101F_L131D	-2.209	43.044	73.418	81.66	81.69	
CODA1140	R101F_L131N_S172D	0.337	59.894	76.501	79.03	82.85	
CODA1157	Q139E_S172D				80.62	81.32	
CODA1173	S172D_Y210W				70.15	77.33	

도면1f

		ABT-126									
명칭	SEQ ID NO: 33에서 아미노산 돌연변이(들)	50 nM abt	100 nM abt	300 nM abt	500 nM abt	1 uM abt	3 uM abt	10 uM abt	30 uM abt	50 uM abt	100 uM abt
CODA71	-	-1.98	24.27	56.8	76.28	73.16	70.98	72.62	77.49	77.96	77.81
CODA75	SEQ ID NO: 29	-17.07	-16.76	-16.76	-14.68	-16	-14.11	-13.98	-21.05	-21.35	-24.12
CODA217	W77F	37.81	57.31	12.61		66.05					
CODA109	S170T	55.83	68.89	72.52		70.96					
CODA236	R101F	-18.69	-23.01	-20.92		4.99					
CODA237	R101M	-24.34	-20.22	-20.57		-19.55					
CODA238	R101W	-14.97	-14.66	-16.35		50.02					
CODA282	Y115D	-21.22	-19.7	-15.55		-14.31					
CODA283	Y115E_N379K	-22.65	-20.55	-12.93		1.71					
CODA325	L131G	-17.39	6.89	38.65		45.82					
CODA326	L131A	-21.91	-0.5	34.86		56.66					
CODA330	L131F	-16.22	-11.89	39.23		66.5					
CODA333	L131S	-20.99	-16.21	-13.34		4.96					
CODA334	L131Q	23.65	61.83	76.44		77.68					
CODA335	L131T	-18	-16.39	-15.05		-5.56					
CODA339	L131D	-16.65	-12.3	18.5		59.09					
CODA340	L131E	2.2	25.39	36.48		50.76					
CODA342	L131R	-18.14	-18.14	-0.81	23.29	45.76	53.03	64.08	71.98	73.98	73.51
CODA337	L131N	-11.64	34.79	60.08		65.99					
CODA945	Q139E	-8.27	4.76	30.88		60.66					
CODA377	S172D	-1.53	18.18	59.15		72.28					
CODA405	Y210V	-2.9	-2.06	-0.19		-3.64					
CODA407	Y210F	-13.07	0.1	5.97		50.23					
CODA409	Y210W	8.23	55.53	74.82	77.39	77.77	69.33	74.79	75.61	75.72	78.52
CODA534	L131S_S172D	-11.96	-10.72	11.65		-3.06					
CODA535	L131T_S172D	-11.09	-10.37	-4		4.05					
CODA536	L131D_S172D	-3.19	7.58	-1.65		31.29					
CODA805	Y115D_S170T	-11.83	-11.5	-8.01		-9.34					
CODA806	Y115D_L131Q	-1.81	-2.61	-3.78		-2.6					
CODA807	Y115D_L131E	-1.68	-2.25	-2.37		3.68					
CODA952	Y140I	-12.34	-11.57	-5.21		3.93					
CODA965	Y140C	-10.75	-4.11	18.93		52.64					
CODA1025	R101F_L131G	-11.53	-7.61	6.55		25.08					
CODA1027	R101F_L131D	-11.89	-16.07	-11.21		-9.38					
CODA1039	Y115E_Y210W	-17.32	-13.93	9.9	36.97	48.37	50.5	58.13	64.1	66.67	68.63
CODA1045	R101W_Y210V	-24.16	-24.7	-16.09		-11.61					
CODA1047	R101F_Y210V	-14.1	-11.72	-12.98		-15.09					
CODA1048	R101F_Y210F	-23.28	-21.78	-19.35		-16.33					
CODA1053	R101M_L131A	-27.01	-18.76	-17.8		-6.55					
CODA1054	R101M_L131F	-19.54	-18.28	-16.87		-11.77					
CODA1055	R101W_Y115E_Y210W	-21.36	-22.28	-14.63		-7.34					
CODA1056	R101F_Y115E_Y210W	-20.96	-21.95	-10.96		10.79					
CODA1138	W77F_R101F_L131D	-11.71	-5.13	15.09		56.63		75.93			
CODA1140	R101F_L131N_S172D	-7.87	-5.35	-3.67		3.64		5.91			
CODA1157	Q139E_S172D	-26.77	-24.64	-10.64		19.57		55.64			
CODA1173	S172D_Y210W	5.15	25.08	66.86		66.94		78.67			

도면1g

		AZD-0328				
명칭	SEQ ID NO: 33에서 아미노산 돌연변이(들)	100 nM azd0328	300 nM azd0328	1 uM azd0328	10 uM azd0328	30 uM azd0328
CODA71	-	73.59	78.09			79.05
CODA75	SEQ ID NO: 29	-8.83	-11.15			-11.92
CODA217	W77F	-7.57	7.08			81.59
CODA109	S170T	84.01	87.08			87.27
CODA236	R101F	-9.78	49.64			81.14
CODA237	R101M	-17.84	-11.98			81.2
CODA238	R101W	22.94	75.38			81.8
CODA282	Y115D	3.19	4.79			76.78
CODA283	Y115E_N379K	-2.1	38.2			79.44
CODA325	L131G	79.75	80.62			80.19
CODA326	L131A	80.39	82.07			82.23
CODA330	L131F	27.56	73.35			77.14
CODA333	L131S	38.49	67.13			80.61
CODA334	L131Q	80.55	83.15			82.53
CODA335	L131T	11.33	44.15			80.96
CODA339	L131D	62.87	77.03			78.63
CODA340	L131E	82.48	82.04			81.8
CODA342	L131R	1.79	66.58			80.55
CODA337	L131N	82.1	82.52			82.32
CODA945	Q139E	-5.79	58.47			66.57
CODA377	S172D	65.04	81.73			82.3
CODA405	Y210V	-8.13	-3.35			-2.86
CODA407	Y210F	0.85	1.25			82.08
CODA409	Y210W	-6.57	-4.84			81.64
CODA534	L131S_S172D	-9.32	4.94			60.61
CODA535	L131T_S172D	-7.02	-0.48			70.16
CODA536	L131D_S172D	51.44	77.12			79.26
CODA805	Y115D_S170T	-0.71	-1.73			47.39
CODA806	Y115D_L131Q	12.15	30.92			68.65
CODA807	Y115D_L131E	24.49	45.34			71.21
CODA952	Y140I	-12.96	-13.21			68.5
CODA965	Y140C	-16.69	1.3			21.78
CODA1025	R101F_L131G	6.26	37.98			79.31
CODA1027	R101F_L131D	-4.76	-7.52			74.9
CODA1039	Y115E_Y210W	-10.45	-13			30.76

도면1h

		파시니클린						
명칭	SEQ ID NO: 33에서 아미노산 돌연변이(들)	30 nM fac	50 nM fac	100 nM fac	300 nM fac	1 uM fac	10 uM fac	30 uM fac
CODA71	-	53.42		83.6	77.44			79.62
CODA75	SEQ ID NO: 29	-11.68		4.35	-10.55			-5.25
CODA217	W77F	-10.14			68.29			87.35
CODA109	S170T	76.45		82.45	71.09			69.41
CODA236	R101F	-28.54			72.98			87.6
CODA237	R101M	-24.14			-14.38			88.78
CODA238	R101W	-19.61			76.54			87.94
CODA282	Y115D	10.17		24.77	51.04		79.76	81.7
CODA283	Y115E_N379K	6.39			78.36		81.93	78.63
CODA325	L131G	75.75			78.01			76.61
CODA326	L131A	69.94			80.07			78.32
CODA330	L131F	2.9			74.96		81.97	78.31
CODA333	L131S	6.27			69.8		80.07	81.35
CODA334	L131Q	83.07		85.36	84.19			82.75
CODA335	L131T	1.24			46.92		79.06	81.06
CODA339	L131D	12.67			80.4		82.18	82.14
CODA340	L131E	82.51		83.6	82.92			82.68
CODA342	L131R	-6.2			76.75		82.16	81.71
CODA337	L131N	82.25			83.59			82.82
CODA945	Q139E	-7.16			71.17			72.14
CODA377	S172D	4.93			84.13		66.96	85.29
CODA405	Y210V	-26.25			-23.52			0.83
CODA407	Y210F	-21.94			-22.46			82.63
CODA409	Y210W	-10.93			-5.82		60.97	57.77
CODA534	L131S_S172D	-23.44			2.75		69.71	61.44
CODA535	L131T_S172D	-21.36			4.17			65.94
CODA536	L131D_S172D	24.15			80.17		81.34	79.9
CODA805	Y115D_S170T	38.08		-14.37	19.41		67.33	79.67
CODA806	Y115D_L131Q	41.32		59.51	74.86		78.53	84.45
CODA807	Y115D_L131E	45.76		63.92	79.43		80.1	84.91
CODA952	Y140I	-8.83			51.6			71.01
CODA965	Y140C	-12.29			20.11			37.62
CODA1025	R101F_L131G	-8.99			10.21			78.24
CODA1027	R101F_L131D	-10.05			-12.54			70.96
CODA1039	Y115E_Y210W	-13.46			5.43			49.06

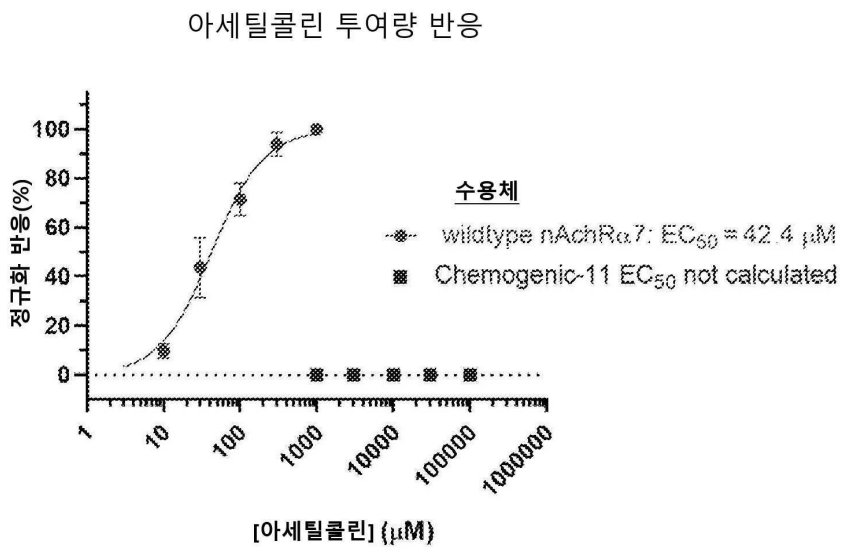
도면1i

		TC-6987								
명칭	SEQ ID NO: 33에서 아미노산 돌연변이(들)	1 uM tc6987	3 uM tc6987	5 uM tc6987	10 uM tc6987	30 uM tc6987	50 uM tc6987	100 uM tc6987	300 uM tc6987	500 uM tc6987
CODA71	-	31.56	31.82	30.75	56.68	51.46	61.26	43.21	7.79	51.58
CODA75	SEQ ID NO: 29	-11.79			-14.31					-19.65
CODA217	W77F	-10.35			-13.93					-7.54
CODA109	S170T	71.45			71.04					66.2
CODA236	R101F	45.34			70.04					75.86
CODA237	R101M	-21.62			21.52					60.33
CODA238	R101W	72.47			72.04					76.56
CODA282	Y115D	13.01			14.73					14.29
CODA283	Y115E_N379K	-9.54			-7.06					-15.15
CODA325	L131G	64.59			76.28					70.95
CODA326	L131A	73.37			78.18					75.42
CODA330	L131F	53.37			74.23					72.25
CODA333	L131S	-3.87	-20.2	-15.25	4.92	14.75	21.33	29.7	20.79	44.37
CODA334	L131Q	74.1			81.7					80.18
CODA335	L131T	-0.14	-8.32	-2.13	0.13	-6.86	-9.5	-10.98	-12.16	-2.41
CODA339	L131D	50	80.39	79.93	80.99	83.11	83.18	82.16	64.58	76.77
CODA340	L131E	80.13			81.29					79.6
CODA342	L131R	2.51			46.22					68.33
CODA337	L131N	79.06			82.36					80.19
CODA945	Q139E	-0.97			21.53					7.39
CODA377	S172D	-9.74	-14.04	-0.95	-7.41	-16.12	-12.79	-11.77	-19.68	-17.02
CODA405	Y210V	-22.63			-23.03					-40.88
CODA407	Y210F	-15.22			-19.89					-33.32
CODA409	Y210W	62.82			78.66					70.35
CODA534	L131S_S172D	-20.99			-27.62					-24.22
CODA535	L131T_S172D	-21.8			-27.08					-21.56
CODA536	L131D_S172D	-18.24			-23.06					-19.3
CODA805	Y115D_S170T	31.9			25.54					21.13
CODA806	Y115D_L131Q	38.83			31.59					29.83
CODA807	Y115D_L131E	36.07			31.35					28.18
CODA952	Y140I	6.03			2.25					-0.24
CODA965	Y140C	2.73			30.37					33.07
CODA1025	R101F_L131G	-13.32			43.71					53.98
CODA1027	R101F_L131D	0.88			56.27					71.3
CODA1039	Y115E_Y210W	7.26			11					7.97

도면1j

		바레니클린									
명칭	SEQ ID NO: 33에서 아미노산 돌연변이(들)	3nM var	3nM var	30nM var	30nM var	300nM var	300nM var	500nM var	500nM var	1uM var	1uM var
CODA71	-	-2.36	-3.522	-4.255	-3.636	46.195	45.522	69.253	71.705	79.254	79.244
CODA75	SEQ ID NO: 29	4.161	-6.216	-5.173	-6.593	-5.733	-7.312	-10.35	-7.586	-5.637	-3.757
CODA217	W77F	5.662	7.57	13.968	19.079	16.183	18.025	23.366	19.206	34.69	30.504
CODA109	S170T	-20.96	-19.953	-16.094	-21.502	64.373	71.198	71.892	73.53	75.461	78.578
CODA236	R101F	19.949	22.334	15.764	16.213	23.135	22.987	35.048	34.188	71.031	71.005
CODA237	R101M	18.429	16.83	23.07	15.868	18.819	19.155	19.117	22.593	24.525	23.383
CODA238	R101W	17.896	12.564	16.263	22.117	77.492	79.056	80.186	80.065	81.263	80.702
CODA282	Y115D	2.111	-12.265	-4.433	-6.153	-0.861	-1.308	0.733	-4.633	-4.512	0.02
CODA325	L131G	-12.241	-9.415	75.334	72.278	78.305	77.83	75.936	76.788	77.805	77.352
CODA326	L131A	-5.939	-2.294	68.663	70.718	79.88	79.742	79.311	80.029	80.952	79.329
CODA330	L131F	-3.016	-1.452	-0.193	-1.853	6.915	6.513	27.593	29.863	67.499	65.57
CODA333	L131S	-4.782	1.048	2.084	5.022	12.162	12.979	29.238	25.614	43.863	39.346
CODA334	L131Q	-5.192	-4.327	-0.688	0.672	75.189	74.923	79.048	80.337	79.766	76.836
CODA335	L131T	0.398	3.947	5.31	7.666	4.327	3.275	1.835	4.863	9.471	7.505
CODA339	L131D	-0.902	-7.62	-6.009	-3.447	49.328	47.685	66.7	64.798	70.85	69.038
CODA340	L131E	-4.061	-0.568	62.964	63.631	74.912	75.084	76.346	75.876	75.805	74.856
CODA342	L131R	0.271	-3.613	-4.935	-4.363	0.282	2.32	23.777	18.376	66.17	66.088
CODA337	L131N	3.093	12.327	77.097	77.653	79.446	79.998	80.691	80.309	80.258	79.509
CODA945	Q139E	8.207	7.835	9.509	10.204	9.818	12.539	16.762	15.21	48.292	54.096
CODA377	S172D	-3.433	-5.737	-5.319	-6.175	-4.135	-8.614	-6.062	-6.125	-14.134	-15.373
CODA405	Y210V	7.317	7.643	9.457	9.134	15.503	11.954	13.427	10.784	9.032	11.591
CODA407	Y210F	2.441	7.326	1.275	12.96	13.119	2.355	11.539	6.571	8.397	7.309
CODA409	Y210W	7.776	-2.964	-5.568	3.024	2.815	3.06	1.766	2.819	1.844	-4.059
CODA952	Y140I	-22.522	-18.173	-15.306	-12.832	-14.671	-17.016	-16.713	-18.893	-15.847	-16.236
CODA965	Y140C	-17.716	-23.019	-14.993	-12.182	-11.731	-10.13	-12.518	-15.043	-13.385	-17.022
CODA1025	R101F_L131G	48.074	60.978	70.023	69.433	78.989	79.21	79.212	79.771	79.538	80.577
CODA1027	R101F_L131D	-3.367	-0.431	-0.761	2.989	2.966	10.211	15.278	20.84	37.104	42.439
CODA1039	Y115E_Y210W	-10.926	-7.395	-5.661	-1.244	-4.555	1.081	9.172	12.561	7.139	12.664
CODA1045	R101W_Y210V	6.745	8.397	14.1	19.095	16.83	21.507	21.586	23.131	31.591	26.479
CODA1047	R101F_Y210V	-3.035	-0.786	-5.181	0.669	-2.748	-6.708	-9.123	-9.869	-6.702	-7.26
CODA1048	R101F_Y210F	-17.119	-13.234	-7.747	4.193	4.149	1.512	-1.572	3.71	8.414	4.091
CODA1053	R101M_L131A	74.835	76.119	77.608	79.015	80.71	79.002	78.709	78.884	79.688	80
CODA1054	R101M_L131F	34.923	28.944	42.214	43.015	47.059	52.768	59.542	62.641	71.449	69.145
CODA1055	R101W_Y115E_Y210W	0.468	-10.015	-15.532	-14.462	-17.027	-15.59	-13.343	-10.702	-6.604	-7.612
CODA1056	R101F_Y115E_Y210W										
CODA1138	W77F_R101F_L131D	3.893	1.107	0.972	0.872	2.282	-0.288	3.637	-1.804	-1.84	6.36
CODA1140	R101F_L131N_S172D	-6.169	-10.445	-9.679	-10.878	-9.572	-8.873	-14.656	-11.304	-13.996	-16.128
CODA1157	Q139E_S172D	-0.225	-1.954	1.269	5.972	6.84	5.943	8.717	6.41	5.635	7.068
CODA1173	S172D_Y210W	9.211	7.193	7.821	9.078	6.933	8.36	5.501	7.04	7.174	5.185

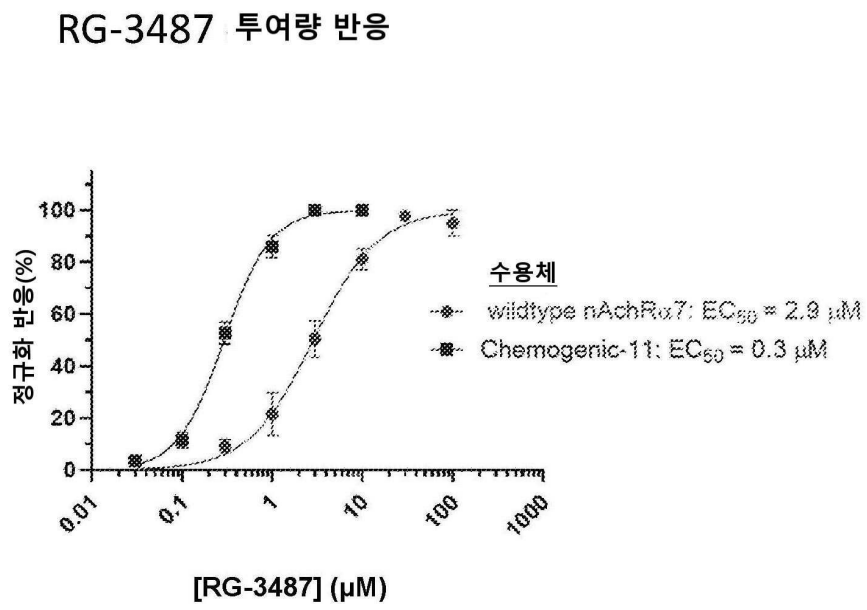
도면2a



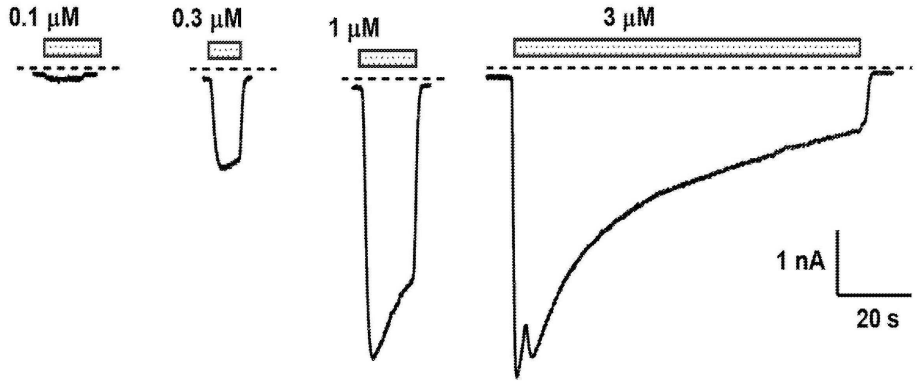
화학적-11(CR-11):

아미노산 치환 Y115D+L131Q를 갖는 SEQ ID NO: 33

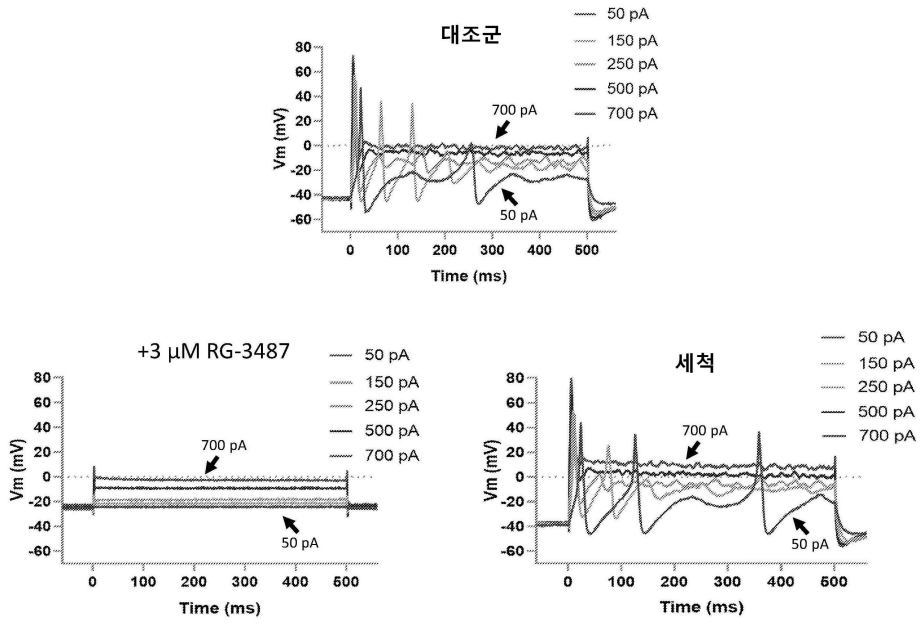
도면2b



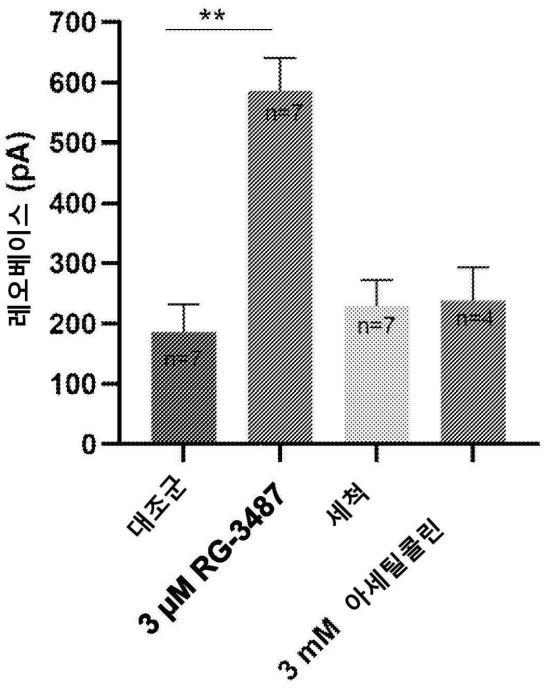
도면3


0.1 μM
0.3 μM
1 μM
3 μM
1 nA
20 s

도면4a


대조군
50 pA
150 pA
250 pA
500 pA
700 pA
Vm (mV)
Time (ms)
+3 μM RG-3487
세척

도면4b



도면5

조작된 수용체의 서열	정규화된 HA %	정규화된 HA MFI	N	정규화된 AB %	정규화된 AB MFI	N
Y115D in SEQ ID NO: 33	0.91	0.74	2	1.23	1.04	2
Y115E in SEQ ID NO: 33	1.16	1.00	2	1.24	1.31	2
L131S in SEQ ID NO: 33	1.42	0.76	2	1.28	1.20	2
L131T in SEQ ID NO: 33	2.00	0.88	2	1.65	1.32	3
L131D in SEQ ID NO: 33	1.59	0.79	2	0.84	1.41	3
L131R in SEQ ID NO: 33	1.83	0.74	2	0.61	1.24	3
S172D in SEQ ID NO: 33	0.36	0.61	2	0.50	0.90	4
Y210W in SEQ ID NO: 33	0.96	1.09	2	0.88	0.62	4
L131S_S172D in SEQ ID NO: 33	0.47	1.10	8	0.44	0.91	3
L131T_S172D in SEQ ID NO: 33	0.33	0.86	9	0.43	0.72	2
L131D_S172D in SEQ ID NO: 33	0.40	0.87	9	0.48	0.87	2
Y115D_S170T in SEQ ID NO: 33	0.70	0.94	4	0.56	0.93	4
Y115D_L131Q in SEQ ID NO: 33	0.36	0.83	4	0.33	2.04	5
Y115D_L131E in SEQ ID NO: 33	0.91	1.00	4	0.78	1.14	4
Y140I in SEQ ID NO: 33	1.41	1.53	2	0.54	2.64	2
R101F_L131G in SEQ ID NO: 33	0.98	0.63	2	0.46	0.90	2
R101F_L131D in SEQ ID NO: 33	0.61	0.49	2	0.50	0.68	2
Y115E_Y210W in SEQ ID NO: 33	1.44	0.68	2	0.34	1.08	2
R101W_Y210V in SEQ ID NO: 33	1.09	0.87	11	0.03	0.35	12
R101F_Y210V in SEQ ID NO: 33	1.13	0.65	4	0.03	0.38	4
R101F_Y210F in SEQ ID NO: 33	1.05	0.61	4	0.55	0.57	4
R101M_L131A in SEQ ID NO: 33	1.31	0.97	10	0.91	0.90	10
R101M_L131F in SEQ ID NO: 33	0.96	0.88	11	0.82	0.82	12
R101W_Y115E_Y210W in SEQ ID NO: 33	1.07	0.78	9	0.51	0.69	9
R101F_Y115E_Y210W in SEQ ID NO: 33	1.22	0.56	4	0.44	0.70	4

도면6a

	배양된 DRG 뉴런에서 상대적 전체 발현* (야생형 글리신 수용체에 대해 정규화됨)		배양된 DRG 뉴런에서 상대적 표면 발현* (야생형 글리신 수용체에 대해 정규화됨)			배양된 DRG 뉴런에서 발현 비율*		HEK 세포에서 상대적 표면 발현 (SEQ ID NO: 33에 대해 정규화됨)	
조작된 수용체	체세포	융기	체세포	융기	N 커버슬립	전체 HA, 축색 돌기 : 체세포	체세포 표면: 전체	% HA+	HA MFI
렌티바이러스 벡터									
야생형 글리신 수용체 a1	1	1	1	1	7				
L131R in SEQ ID NO: 33	0.33 ± .02	0.18 ± .03	0.55 ± .18	0.89 ± .50	5			2.28 ± .1.65	0.80 ± 0.20
Y210W in SEQ ID NO: 33	0.28 ± .03	0.12 ± .01	0.35 ± .06	0.30 ± .06	7			0.80 ± .0.23	0.76 ± .0.11
Y115E in SEQ ID NO: 33	0.45 ± .07	(0)	0.29 ± .06	0.25 ± .02	4			1.03 ± .16	1.07 ± .0.05
L131D in SEQ ID NO: 33	0.37 ± .07	0.19 ± .06	0.22 ± .05	0.35 ± .11	6			2.06 ± 1.55	1.04 ± .12
R101F, L131G in SEQ ID NO: 33	0.51 ± .09	(0)	0.25 ± .05	0.08 ± .05	4			0.78 ± .0.05	0.89 ± .0.01
R101F, L131D in SEQ ID NO: 33	0.19 ± .04	(0)	0.20 ± .05	0.08 ± .07	6			0.48 ± .0.01	0.69 ± .0.04
Y115E, Y210W in SEQ ID NO: 33	0.33 ± .03	0.09 ± .02	0.36 ± .05	0.51 ± .04	4				
	0.09 ± .03	0.01 ± .03	0.30 ± .10	0.15 ± .07	7				
AAV6 벡터									
야생형 글리신 수용체 a1	1	1	1	1	12	0.07 ± .01	1.01 ± .06		
SEQ ID NO: 33	0.44 ± .10	0.18 ± .08	0.26 ± .07	0.26 ± .21	5	0.01 ± .00	0.55 ± .12		
Y210W in SEQ ID NO: 33	0.35 ± .04	0.16 ± .02	0.14 ± .06	0.10 ± .08	4	0.03 ± .00	0.43 ± .18	0.80 ± .0.23	0.76 ± .0.11
R101W, Y210V in SEQ ID NO: 33	0.62 ± .06	0.33 ± .08	0.40 ± .12	0.52 ± .14	5	0.02 ± .00	0.73 ± .24	0.99 ± .0.36	0.99 ± .0.14
R101F, Y210F in SEQ ID NO: 33	0.46 ± .17	0.05 ± .02	0.06 ± .06	0.01 ± .1	3	0.01 ± .00	0.24 ± .25	0.90 ± .0.32	0.95 ± .0.15
R101M, L131F in SEQ ID NO: 33	0.31 ± .05	0.17 ± .04	0.24 ± .03	0.39 ± .14	6	0.02 ± .00	0.78 ± .06	0.92 ± .0.38	1.06 ± .0.15
R101W,Y115E,Y210W in SEQ ID NO: 33	0.39 ± .04	0.22 ± .03	0.30 ± .04	0.39 ± .14	6	0.03 ± .00	0.77 ± .06	0.78 ± .0.10	0.84 ± 0.10
R101F,Y115E,Y210W in SEQ ID NO: 33	0.49 ± .02	0.11 ± .04	0.31 ± .06	0.08 ± .08	6	0.02 ± .01	0.63 ± .11		
L131G, Q139L, Y217F in SEQ ID NO: 16	0.28 ± .06	0.01 ± .01	0.04 ± .03	0.02 ± .03	4	0.00 ± .00	0.10 ± .08	1.02 ± .23	1.01 ± .11

도면6b

	배양된 해마 뉴런에서 상대적 전체 발현* (야생형 글리신 수용체에 대해 정규화됨)		배양된 해마 뉴런에서 상대적 표면 발현* (야생형 글리신 수용체에 대해 정규화됨)		
조작된 수용체	체세포	융기	체세포	융기	N 커버슬립
렌티바이러스 벡터					
야생형 글리신 수용체 a1	1	1	1	1	12
SEQ ID NO: 33	0.44 ± .12	0.30 ± .08	0.61 ± .22	0.36 ± .11	4
L131R in SEQ ID NO: 33	0.65 ± .13	0.34 ± .07	0.29 ± .06	0.17 ± .03	5
Y210W in SEQ ID NO: 33	0.60 ± .05	0.27 ± .02	0.29 ± .05	0.18 ± .04	6
Y115E in SEQ ID NO: 33	0.58 ± .11	0.30 ± .04	0.42 ± .02	0.32 ± .03	4
L131D in SEQ ID NO: 33	0.54 ± .13	0.31 ± .06	0.29 ± .03	0.21 ± .03	6
R101F, L131G in SEQ ID NO: 33	0.38 ± .06	0.18 ± .02	0.38 ± .05	0.23 ± .02	3
R101F, L131D in SEQ ID NO: 33	0.24 ± 08	0.05 ± 03	0.10 ± .02	0.06 ± .02	2
Y115E, Y210W in SEQ ID NO: 33	0.29	0.19	0.48	0.35	1
AAV6 벡터					
야생형 글리신 수용체 a1	1	1	1	1	8
SEQ ID NO: 33	0.67 ± .26	0.35 ± .11	0.34 ± .11	0.23 ± .06	4
Y210W in SEQ ID NO: 33	0.65 ± .12	0.27 ± .03	0.24 ± .04	0.11 ± .02	4
R101M, L131F in SEQ ID NO: 33	0.57 ± .07	0.26 ± .02	0.12 ± .03	0.15 ± .11	4
R101W,Y115E,Y210W in SEQ ID NO: 33	0.39 ± .08	0.14 ± .02	0.13 ± .05	0.06 ± .03	4
R101F,Y115E,Y210W in SEQ ID NO: 33	0.38 ± .04	0.38 ± .12	0.13 ± .00	0.13 ± .13	2
L131G, Q139L, Y217F in SEQ ID NO: 16	0.38 ± .12	(-0.04 ± .04)	(-0.11 ± .07)	(-0.11 ± .04)	4

서 열 목 록 (첨부)

아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.