

Даний винахід стосується фармацевтичних композицій, що включають позитивний модулятор агоніста нікотинного рецептора, де зазначений позитивний модулятор має здатність збільшувати ефективність вказаного агоніста нікотинного рецептора.

Попередній рівень техніки

Холінергічні рецептори звичайно зв'язуються з ендogenousним нейромедіатором ацетилхоліном (ACh), запускаючи таким чином відкриття іонних каналів. ACh-рецептори в центральній нервовій системі ссавців можна розділити на мускаринові (mAChR) і нікотинні (nAChR) субтипи, відповідно засновані на активності агоніста мускарину і нікотину. Нікотинні ацетилхолінові рецептори є воротними лігандами іонних каналів, що включають п'ять субодиниць [див. огляди Colquhoun et al. (1997), *Advances in Pharmacology*, 39, 191-220; Williams et al. (1994), *Drug News & Perspectives*, 7, 205-223; Doherty et al. (1995), *Annual reports in Medicinal Chemistry*, 30, 41-50]. Члени сімейства генів nAChR поділяються на дві групи на основі їх послідовності; члени однієї групи вважаються  $\beta$ -субодиницями, в той час, як другої групи - класифікуються, як  $\alpha$ -субодиниці [див. огляди Karlin & Akabas (1995), *Neuron*, 15, 1231-1244; Sargent (1993), *Annu. Rev. Neurosci.*, 16, 403-443]. Три з  $\alpha$ -субодиниць  $\alpha 7$ ,  $\alpha 8$  і  $\alpha 9$  утворюють функціональні рецептори, коли експресуються самі, і таким чином, ймовірно, утворюють гомоолігомерні рецептори.

Модель алостеричного переходу станів nAChR включає щонайменше стан спокою, стан активності і «десенсибілізований» стан закритих каналів [Williams et al., вище; Karlin & Akabas, вище]. Таким чином різні ліганди nAChR по різному стабілізують конформаційний стан, з яким вони переважно зв'язуються. Наприклад, агоністи ACh і (-)-нікотин стабілізують активний і десенсибілізований стан.

Зміни активності нікотинних рецепторів беруть участь в розвитку ряду захворювань. Деякі з них, наприклад, важка псевдопаралітична міастенія і ADNFLE (аутосомальна домінуюча ніктуріальна лобово-пайова епілепсія) [Kuryatov et al. (1997), *J. Neurosci.*, 17 (23):9035-47], пов'язані із зменшенням активності передачі в нікотинному рецепторі або за допомогою зменшення числа рецепторів, або підвищеної десенсибілізації, процесу, при якому рецептори стають нечутливими до агоністу. Була висловлена гіпотеза про те, що через зменшення числа нікотинних рецепторів розвивається недолік пізнавальної функції такої, як при хворобі Альцгеймера і шизофренії [Williams et al., вище]. Дія нікотину з тютюну також здійснюється через нікотинні рецептори. Підвищена активність нікотинних рецепторів може зменшити бажання курити.

Застосування сполук, які зв'язуються з нікотинними ацетилхоліновими рецепторами, при лікуванні ряду порушень, що включають знижену холінергічну функцію, таких, як хвороба Альцгеймера, порушення пізнавальної функції і уваги, дефіцитні гіперактивні порушення уваги, стан тривоги, депресія, припинення куріння, нейрозахист, шизофренія, аналгезія, хвороба Туретта, хвороба Паркінсона розглянуто в [McDonald et al. (1995) «Nicotinic Acetylcholine Receptors: Molecular Biology, Chemistry and Pharmacology», Chapter 5 in *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, vol. 30, pp. 41-50, Academic Press Inc., San Diego, CA; і в Williams et al. (1994) «Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors», *Drug News & Perspectives*, vol. 7, pp. 205-223].

Проте лікування агоністами нікотинних рецепторів, які діють в тому ж сайті, що ACh, є проблематичним, оскільки ACh не тільки активує, але і також блокує активність рецепторів за допомогою процесів, які включають десенсибілізацію [див. огляд Ochoa et al. (1989), *Cellular and Molecular Neurobiology*, 9, 141-178] і неконкурентну блокаду (блок відкритих каналів) [Forman & Miller (1988), *Biophysical Journal*, 54(1): 149-58]. Крім того виявилось, що пролонгована активація приводить до довго триваючої інактивації. Отже, можна передбачати, що агоністи ACh знижують активність, а також посилюють її. В нікотинних рецепторах взагалі, і, зокрема, в  $\alpha 7$ -нікотинному рецепторі, десенсибілізація обмежує тривалість струму під час використання агоніста.

Короткий опис малюнків

Фігура 1

Модель запису струму, отриманого з агоністом, що представляє визначення посилення ефективності агоніста шляхом виміру амплітуди струму. Пунктирні лінії показують тривалість застосування сполук.

Фігура 2

Модель запису струму, отриманого з агоністом, що представляє визначення збільшення ефективності агоніста шляхом виміру «площі під кривою». Стрілки вказують на перекриття струму ACh і струму ACh + модулятор. Пунктирні лінії показують тривалість застосування сполук.

Фігура 3

Дія 5-гідроксиіндола на активність ACh в  $\alpha 7$ -нікотинному рецепторі. Значення струму, рівне 100%, є екстрапольованим максимумом з кривої ACh.

(-) ACh

(O) ACh + 0,5мМ 5-гідроксиіндола

Фігура 4

Дія 5-гідроксиіндола на активність ACh в  $\alpha 7$ -нікотинному рецепторі (людському, щурачому і курячому), експресованому в ооцитах *Xenopus*.

Фігура 5

Дія 5-гідроксиіндола на активність ACh (незаштриховані стовпці) і (-)-спіро[1-азабіцикло[2.2.2]октан-3,5'-оксазолідин]-2'-она (заштриховані стовпці) в  $\alpha 7$ -нікотинному рецепторі, експресованому в ооцитах *Xenopus*.

Фігура 6

Дія nAChR  $\alpha 7$  модулятора на активність агоніста по вимірюванню потоку  $Ca^{2+}$  через nAChR, експресований в клітинах HEK-293. Агоніст представляє собою (-)-спіро [1-азабіцикло[2.2.2]октан-3,5'-оксазолідин]-2'-он.

#### Розкриття винаходу

Несподівано було встановлено, що деякі сполуки, наприклад, 5-гідроксиіндол (5-OHi), можуть посилювати ефективність агоністів в нікотинових рецепторах. Подібне посилення активності може складати більш, ніж в 2 рази. Покладається, що сполуки, що володіють цим типом дії(в подальшому що відносяться до «позитивних модуляторів»), будуть особливо корисними для лікування станів, пов'язаних зі зниженням передачі в нікотиновому рецепторі. У терапії подібні сполуки можуть відновлювати нормальну міжнейронну комунікацію без впливу на тимчасовий профіль активації. Крім того, вони не приведуть до тривалої інактивації, що може мати місце при тривалому застосуванні агоніста.

Наявність цієї ефективності в посиленні активності неможливо було передбачити на попередньому рівні техніки. Albuquerque et al. повідомили про інший алостеричний сайт на нікотинових рецепторах, який вони називають сайтом "неконкурентного агоніста". Сполуки, діючі в цьому сайті, також називаються "алостерично посилюючі ліганди"(API's). Виявилось, що сполуки, діючі в цьому сайті, включають декілька інгібіторів холінестерази, кодеїн і 5-HT. Стверджувалось, що активність неконкурентного агоніста через цей сайт "не впливає на рівень максимальної реакції" у відповідь на ACh; вона зсуває криву реакції у відповідь ліворуч [Maelicke & Albuquerque (1996), DDT vol. 1, 53-59]. Особливою відмінною ознакою сполук, діючих у відкритому сайті, є те, що вони збільшують максимальну реакцію у відповідь на ACh(його ефективність).

Іншою відмінністю між API's і даним винаходом є дія, яку надають модулятори стосовно загального струму(при визначенні за площею під кривою) в присутності насичуючої концентрації агоніста. API's надають невеликий ефект, або він відсутній зовсім, на площу під кривою в nAChR  $\alpha 7$ , експресованому в ооцитах; спостерігали збільшення площі під кривою на 8 - 10% протягом 1 секунди застосування агоніста. В протилежність 5-OHi спричиняє сильне збільшення площі під кривою(збільшення на  $\approx 400\%$ ) в тих же умовах(дивись фіг.4, верхній запис).

Іншою відмінною властивістю API's і винаходом є специфічність дії всередині сімейства нікотинових рецепторів. API's надають їх позитивну модулюючу дію на всіх перевірених нікотинових рецепторах, включаючи м'язовий тип( $\alpha 1\beta 5$ ).

На деяких рецепторах, що не відносяться до нікотинових були виявлені сполуки, які можуть знижувати десенсибілізацію рецепторів. На збудливих амінокислотних рецепторах типу AMPA такі сполуки, як циклотіазид, деяких лектини, подібних аглютинину з проростків пшениці, ноотропіки, подібних пірацетаму, і AMPАкіни знижують десенсибілізацію [Partin et al. (1993), Neuron, 11, 1069-1082]. Повідомлялося, що гліцин зменшує десенсибілізацію збудливих амінокислотних рецепторів NMDA-типу [Mayer et al. (1989), Nature, 338, 425-427]. Однак, було встановлено, що сполуки, які зменшують десенсибілізацію відносно рецепторів однієї групи, в основному, не надають таку ж дію на рецептори інших груп. Наприклад, циклотіазид має невеликий ефект, або він відсутній зовсім, відносно глутаматних рецепторів субтипів NMDA і KA [Partin et al. (1993), Neuron, 11, 1069-1082]; більше за те, було виявлено, що циклотіазид блокує 5-HT<sub>3</sub>-рецептори [D.A.Gurley, неопубліковані дані]. Гліцин не має дію на 5-HT<sub>3</sub>-рецептори [Gurley and Lanthorn (друкується) Neurosci. Lett.].

Був відкритий сайт з використанням сполуки(5-OHi), про який відомо, що він знижує десенсибілізацію в рецепторі 5-HT<sub>3</sub> [Kooyman A.R. et al. (1993), British Journal of Pharmacology, 108, 287-289]. Однак повідомлялося, що тільки одна інша сполука, яка дає або збільшує активність в рецепторі 5-HT<sub>3</sub>, а саме 5-HT, збільшує активність в нікотинових рецепторах (Schrattenholz et al. (1996), Molecular Pharmacology, 49, 1-6), хоч про цю активність в ооцитах Xenopus ніколи не повідомлялося. Велика частина агоністів для 5-HT<sub>3</sub>-рецептора не має активності або є антагоністами в нікотинових рецепторах (неопубліковані дані), Крім того, заявникам даного винаходу не вдалося відтворити той факт, що 5-HT збільшує активність в нікотиновому рецепторі. Отже, неможливо було передбачити посилюючу дію 5-OHi в нікотинових рецепторах.

Отже, даний винахід забезпечує в першому аспекті фармацевтичну композицію, що включає позитивний модулятор агоніста нікотинового рецептора разом з фармацевтично прийнятним носієм, зазначений позитивний модулятор має здатність збільшувати ефективність вказаного агоніста рецептора. Для цілей даного винаходу термін "позитивний модулятор" або "позитивний модулятор агоніста нікотинового рецептора" потрібно розуміти як сполуку, що має здатність збільшувати максимальну ефективність агоніста нікотинового рецептора.

Зрозуміло, що цей винахід включає композиції, що включають або позитивний модулятор як тільки одна активна речовина, модулюючи таким чином активність ендогенних агоністів нікотинового рецептора, або позитивний модулятор в поєднанні з агоністом нікотинового рецептора.

Таким чином, вказані фармацевтичні композиції, що містять позитивний модулятор агоніста нікотинового рецептора, можуть додатково включати агоніст нікотинового рецептора.

У переважній формі винаходу зазначений позитивний модулятор є 5-гідроксиіндолом.

У іншій переважній формі винаходу зазначений агоніст нікотинового рецептора є агоністом  $\alpha 7$ -нікотинового рецептора. Прикладом агоніста  $\alpha 7$ -нікотинового рецептора є (-)-спіро[1-азабіцикло [2.2.2.]октан-3,5\*-оксазолідин]-2\*-он. В цій області відомо декілька агоністів  $\alpha 7$ -нікотинового рецептора, наприклад, з WO 96/06098, WO 97/30998 і WO 99/03859.

У додатковому аспекті винахід забезпечує спосіб лікування стану, пов'язаного із зниженою передачею в нікотиновому рецепторі, шляхом призначення пацієнту при необхідності такого лікування терапевтично ефективною кількістю позитивного модулятора агоніста нікотинового рецептора, зазначений позитивний модулятор має здатність збільшувати ефективність вказаного агоніста нікотинового рецептора.

Зрозуміло, що способи лікування за даним винаходом включають або позитивний модулятор в якості тільки однієї активної речовини, модулюючи таким чином активність ендогенних агоністів нікотинового

рецептора, або позитивний модулятор, що призначається разом з агоністом нікотинного рецептора.

У переважній формі винаходу зазначений спосіб лікування включає позитивний модулятор, який є 5-гідроксиіндолем.

У іншій переважній формі винаходу, зазначений спосіб лікування включає агоніст нікотинного рецептора, яким є агоніст  $\alpha 7$ -нікотинного рецептора. Прикладом агоніста  $\alpha 7$ -нікотинного рецептора є (-)-спіро[1-азабіцикло[2.2.2]октан-3,5\*-оксазолідин]-2\*-он, У цій області відомо декілька агоністів  $\alpha 7$ -нікотинного рецептора, наприклад, з WO 96/06098, WO 97/30998 і WO 99/03859.

В додатковому аспекті винахід забезпечує застосування фармацевтичної композиції за винаходом у виробництві лікарського препарату для лікування або профілактики стану, пов'язаного із зниженою передачею нікотинного рецептора, або стану, пов'язаного із зниженою нікотинною щільністю, який може бути одним із захворювань або станів, вказаних нижче, яке включає призначення пацієнту терапевтично ефективної кількості сполук за винаходом.

Зрозуміло, що застосування включає композиції, що включають або позитивний модулятор в якості тільки однієї активної речовини, модулюючи таким чином активність ендогенних агоністів нікотинного рецептора, або позитивний модулятор в поєднанні з агоністом нікотинного рецептора. Таким чином, вказане застосування фармацевтичних композицій, що містять позитивний модулятор агоніста нікотинного рецептора, може додатково включати агоніст нікотинного рецептора.

У переважній формі винаходу застосування включає позитивний модулятор, яким є 5-гідроксиіндол.

У іншій переважній формі винаходу застосування вказаного агоніста нікотинного рецептора представлено агоністом  $\alpha 7$ -нікотинного рецептора. Прикладом агоніста  $\alpha 7$ -нікотинного рецептора є (-)-спіро[1-азабіцикло[2.2.2]октан-3,5\*-оксазолідин]-2\*-он. В цій області відомо декілька агоністів  $\alpha 7$ -нікотинного рецептора, наприклад, з WO 96/06098, WO 97/30998 і WO 99/03859.

Приклади захворювань або станів включають шизофренію, манію і маніакальну депресію, стан тривоги, хворобу Альцгеймера, нестачу сприйняття, нестачу пізнавальної функції, нестачу уваги, втрату пам'яті і дефіцитне гіперактивне порушення уваги, хворобу Паркінсона, хворобу Хантінгтона, хворобу Туретта, розлад циркадного ритму, залежність від нікотину(включаючи отриману внаслідок впливу продуктів, що містять нікотин),

Зрозуміло, що зазначений позитивний модулятор можна призначати або з метою впливу на ендогенні агоністи нікотинного рецептора, або в поєднанні з екзогенним агоністом нікотинного рецептора.

Додатковий аспект винаходу відноситься до фармацевтичної композиції для лікування або профілактики стану або порушення, приведенного як приклад вище, виникаючих внаслідок дисфункції нейротрансмісії в нікотинних ацетилхолінових рецепторах у ссавця, переважно людини, композиціям, що включають або позитивний модулятор як тільки одна активна речовина, модулюючи таким чином активність ендогенних агоністів нікотинного рецептора, або позитивний модулятор в поєднанні з агоністом нікотинного рецептора. Таким чином, вказане застосування фармацевтичних композицій, що містять позитивний модулятор агоніста нікотинного рецептора, може, крім того, включати агоніст нікотинного рецептора, ефективний для лікування або профілактики такого порушення або стану, і інертний фармацевтично прийнятний носій.

Для вищезгаданих застосувань дозування, що призначається буде, звичайно, залежати від композиції, що використовується, способу введення і бажаного лікування. Однак в основному задовільні результати будуть отримані, коли активні компоненти вводять в добовій дозі приблизно від 0,1мг до приблизно 20мг на кг масу тіла ссавця, що переважно дається в розділених дозах від 1 до 4 разів на день або в формі 3-безперервним вивільненням. Для людини загальна добова доза знаходиться в межах від 5мг до 1400мг, більш переважно від 10мг до 100мг, і одноразові дозувальні форми, придатні для перорального введення, включають від 2мг до 1400мг активних компонентів, змішаних з твердим або рідким фармацевтичним носієм або розріджувачем.

Вищезгадані композиції можна використати, як такі, або у вигляді відповідних лікувальних препаратів для ентерального, парентерального, ректального або інтраназального введення.

Прикладами придатних розріджувачів або носіїв є:

для таблеток і драже: лактоза, крохмаль, тальк, стеаринова кислота; для капсул: винна кислота або лактоза;

для ін'єкційних розчинів: вода, спирти, гліцерин, рослинні масла; для супозиторіїв: натуральні або відторгнуті масла або віск.

Також забезпечується спосіб отримання подібної фармацевтичної композиції, який включає перемішування інгредієнтів одночасно або послідовно.

У додатковому аспекті винахід забезпечує спосіб ідентифікації позитивного модулятора агоніста нікотинного рецептора. Сполуки вважаються "позитивними модуляторами", якщо в присутності насичуючих концентрацій агоніста ACh для nAChR  $\alpha 7$ , досягається струм, який перевищує на 200% від контрольного(100% посилення), коли вимірюється від основи до піка(дивись експериментальні методи). Контрольний струм визначається, як струм, що викликається агоністом у відсутності модулятора. Насичуюча концентрація ACh визначається, як перевищуюча в 10 разів EC<sub>50</sub> для специфічного типу, що використовується nAChR  $\alpha 7$ . EC<sub>50</sub> визначається, як концентрація, яка викликає половинну максимальну реакцію. Значення EC<sub>50</sub> для субтипів nAChR  $\alpha 7$  звичайно знаходяться в межах між 100-300мкМ (Bertrand et al. (1992), Neuroscience Letters, 146, 87-90; Peng et al. (1994), Molecular Pharmacology, 45, 546-554). Крім того, сполуки вважаються "позитивними модуляторами", якщо в присутності насичуючих концентрацій агоніста загальний струм через рецептор(потік) перевищує на 200% від контрольного струму. Загальний струм, що вимірюється є площею під кривою(запис струму) під час застосування агоніста.

Отже, спосіб за винаходом для ідентифікації позитивного модулятора агоніста нікотинного рецептора може включати стадії (а) експресування нікотинного рецептора на поверхні клітини; (b) контактування вказаного нікотинного рецептора із сполукою, відомою, як агоніст нікотинного рецептора, і сполукою, що тестується на позитивну модулюючу активність; (с) визначення того, яка сполука, що тестується, виявляє позитивний модулюючий вплив на дію вказаного агоніста нікотинного рецептора, що приводить до збільшення, амплітуди струму(вимірюваної від основи до піка) або загального струму(вимірюваного у вигляді площі під кривою запису струму) більш, ніж на 200% від контролю(100% посилення). Клітина може бути ооцитом *Xenopus*, кліткою HEK-293 або культивованим нейроном. Нікотинний рецептор може бути людським, щурячим, курячим, мишачим або бичачим нікотинним рецептором.

У додатковому аспекті даний винахід стосується способу ідентифікації позитивного модулятора агоніста нікотинного рецептора, нікотинний рецептор є  $\alpha 7$ -нікотинним рецептором.

Ще в додатковому аспекті винахід забезпечує спосіб ідентифікації сполуки, яка є агоністом нікотинного рецептора, зазначений спосіб включає стадії:

(а) експресування нікотинного рецептора на поверхні клітини; (b) контактування вказаного нікотинного рецептора із сполукою, що тестується на активність агоніста нікотинного рецептора, в присутності позитивного модулятора агоніста нікотинного рецептора; (с) визначення того, яка сполука, що тестується, виявляє активність агоніста нікотинного рецептора. Клітина може бути ооцитом *Xenopus*, кліткою HEK-293 або культивованим нейроном. Нікотинний рецептор може бути людським, щурячим, овечим, мишачим або бичачим нікотинним рецептором. Фахівцям в цій області буде зрозуміло, що "активність агоніста нікотинного рецептора" можна визначити способами, відомими в цій області, як способи описані в розділі "Експериментальні методи" нижче.

У додатковому аспекті даний винахід стосується способу ідентифікації сполуки, яка є агоністом нікотинного рецептора, нікотинний рецептор є  $\alpha 7$ -нікотинним рецептором.

Експериментальні методи

(а) Реєстрація струму в ооцитах *Xenopus*

Ооцит *Xenopus* забезпечує могутній засіб для оцінки функції білків, які, як вважають, є субодиницями ворітних лігандів іонних каналів. Ін'єкція РНК, транскрибованої з кДНК клонів, що кодує відповідні рецепторні субодиниці, або ін'єкція кДНК, в якій кодує послідовність розташовується в прямому напрямі від промотора, призводить до появи функціональних ворітних ліганд іонних каналів на поверхні ооцита (дивись, наприклад, Boulter et al. (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 84, 7763-7767).

Отже, одним зручним способом оцінки посилення нікотинної ефективності є реєстрація фіксації напруження за двохелектродною схемою на ооцитах *Xenopus*, експресуючих  $\alpha 7$ -нікотинні рецептори з кРНК.

Жаб *Xenopus laevis* (*Xenopus* I, Kalamazoo, MI) анестезували, використовуючи 0,15% трикаїн. Ооцити промили розчином OR2 (82мм NaCl, 2,5мм KCl, 5мм HEPES, 1,5мм  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 1мм  $\text{MgCl}_2$ , 0,1мм EDTA; pH 7,4). Ооцити вивільняли з фолікулів інкубацією в 25мл OR2, що містить 0,2% колагенази 1A (Sigma), два рази протягом 60 хвилин на вібруючому майданчику при 1Гц і зберігали в середовищі Лейбовича L-15(50мкг/мл гентаміцина, 10Е/мл пеніциліну і 10мкг/мл стрептоміцина). На наступний день в кожний ооцит ін'єкували приблизно 50нг кРНК. кРНК синтезували з кДНК, використовуючи, Message Machine(отримана від Abion).

Зовнішній розчин для реєстрації складався з 90мм NaCl, 1мм KCl, 1мм  $\text{MgCl}_2$ , 1мм  $\text{BaCl}_2$ , 5мм HEPES; pH 7,4. Провели реєстрацію напруги за двохелектродною схемою, використовуючи кламповий підсилювач для ооцитів(OC 725C; Warner Instrument, Hamden, CT). Ооцити проколювали двома електродами з опором на кінці 1-2Мом при заповненні 3М KCl. Записи почали, коли мембранний потенціал став стабільним при негативних потенціалах -20мВ(мембранні потенціали спокою менш негативні, коли  $\text{Ba}^{++}$  замінює  $\text{Ca}^{++}$  в розчинах ванни). Мембранний потенціал фіксували при -80мВ. ACh отримали від Sigma.

Ооцити постійно перфузували(5мл/хвилину) розчином для реєстрації з і без ACh.

Амплітуду струму визначали від базової лінії до піка. Визначали значення  $\text{EC}_{50}$ , максимальний ефект і коефіцієнти Хілла, підставляючи дані в логістичне рівняння, використовуючи GraphPad Prism(GraphPad Software, Inc., San Diego, CA).

Збільшення в ефективності агоніста під дією позитивного модулятора можна розрахувати двома шляхами:

(1) У вигляді процентного збільшення амплітуди струму, яке визначається як  $100(I_m - I_c)/I_c$ , де  $I_m$  є амплітудою струму в присутності модулятора, і  $I_c$  є струмом у відсутності модулятора(Фіг.1).

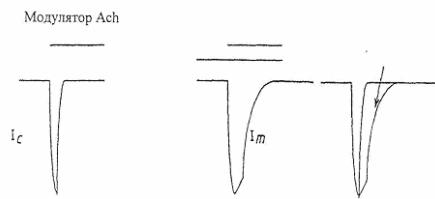
(2) У вигляді процентного збільшення "площі під кривою" запису струму агоніста. Площа під кривою є загальним представленням загального іонного потоку через канал(Фіг.2). В прикладі, показаному на Фіг.2, хоч амплітуда не зростає, площа під кривою збільшується приблизно на 100% в порівнянні з контролем під час застосування агоніста.

(b) Зображення  $\text{Ca}^{2+}$  потоку

Зображення  $\text{Ca}^{2+}$  потоку через рецептори nAChR  $\alpha 7$ , тимчасово експресовані в клітинній лінії, є іншим засобом оцінки модулюючої активності.

Клітини, експресуючі рецептори  $\alpha 7$ (наприклад, клітини HEK-290 або клітини культивованих нейронів) ростуть злитим шаром в 96 лункових планшетах, куди одночасно вноситься флуо-3, флуоресцентний кальцієвий індикатор. Для скринінга модулюючої активності у відношенні  $\alpha 7$ , 96-лунковий планшет вміщують до рідера для планшетів з флуоресцентним відображенням(FILIPR), і до всіх лунок вносять сполуки, що тестуються одночасно разом з агоністом для  $\alpha 7$ . Активування рецепторів визначають за кальцієвим притоком всередину клітин, який кількісно визначається за збільшенням інтенсивності

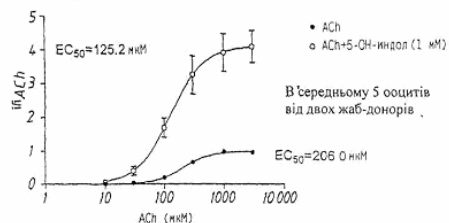
FIG. 1



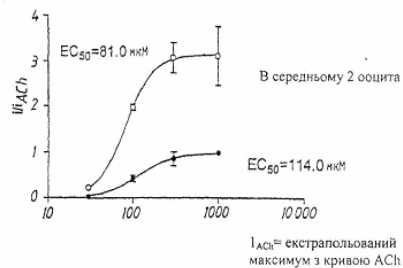
ФІГ. 2

Крива залежності "доза-реакція" для агоніста в присутності і відсутності 5-ОН-індола

Мишачий nAChR  $\alpha 7$

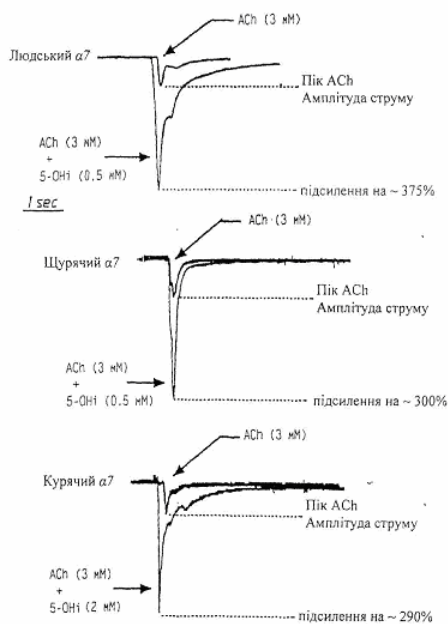


Людський nAChR  $\alpha 7$



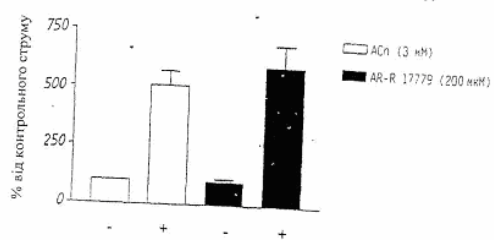
ФІГ. 3

Модуляція під дією 5-ОН-індола: аналогічна активність на nAChR  $\alpha 7$  від людини, щура і курок, експресованих в ооцитах



ФІГ. 4

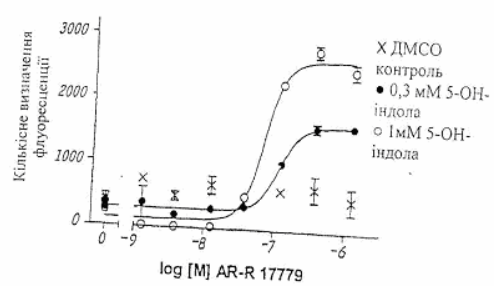
Дія 5-ОН-індола на АСн і AR-R 17779 - воротний струм



Всі реакції нормалізувалися до амплітуди струму, що викликається 3 мМ АСн

ФІГ. 5

Приток кальцію в α7-HEK293



ФІГ. 6