

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 500**

51 Int. Cl.:
C07K 14/435 (2006.01)
A61K 38/04 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/94 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **07734817 .5**
96 Fecha de presentación: **14.05.2007**
97 Número de publicación de la solicitud: **2158213**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **03.03.2010**

54 Título: **Vm23 y Vm24, dos péptidos de alacrán que bloquean con alta selectividad los canales de potasio (subtipo Kv1.3) de linfocitos T humanos**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
26.04.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
26.04.2012

73 Titular/es:
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO
9 PISO DE LA TORRE DE RECTORIA CIUDAD
UNIVERSITARIA DELEGACIÓN COYOACAN
C.P. 04510 MÉXICO D.F. MEXICO, MX**

72 Inventor/es:
**POSSANI POSTAY, Lourival, Domingos;
GURROLA-BRIONES, Georgina;
SALAS-CASTILLO, Saida Patricia;
FERREIRA BATISTA, Cesar Vicente;
VARGA, Zoltán, S.;
PANYI, György y
GÁSPÁR, Rezső**

74 Agente/Representante:
Ungría López, Javier

ES 2 379 500 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Vm23 y Vm24, dos péptidos de alacrán que bloquean con alta selectividad los canales de potasio (subtipo Kv1.3) de los linfocitos T humanos

5

Campo de la invención

La presente invención está relacionada de forma general con los campos de la bioquímica, biología molecular, inmunología y electrofisiología. Lo divulgado son péptidos, sus composiciones farmacéuticas y métodos para su uso como bloqueadores de canales de potasio Kv1.3, su uso para el tratamiento de varias condiciones inmunológicas y para aplicaciones de diagnóstico, y métodos para la síntesis química y procedimientos para el plegamiento correcto de estos péptidos correspondientes a dos componentes de proteína aislados del veneno del alacrán Mexicano *Vaejovis mexicanus smithi* (de aquí en adelante abreviado *V. mexicanus*), los cuales constituyen una nueva subfamilia de ligandos específicos para canales de potasio, capaces de bloquear con alta afinidad y especificidad un subtipo de canales de potasio (hKv1.3), el cual está implicado en enfermedades inmunológicas y rechazo de injertos. Los métodos y técnicas utilizadas para su caracterización química y funcional se revelan, así como, los resultados de los experimentos *in vivo* en la respuesta de hipersensibilidad tardía (DTH) de ratas sensibilizadas cuando son tratadas con Vm24. Este péptido (Vm24), su homólogo Vm23 y sus análogos equivalentes funcionales son compuestos clave, candidatos para el tratamiento de varias condiciones inmunológicas y aplicaciones en diagnóstico.

10

15

20

Antecedentes de la invención*Consideraciones generales*

25

Varios aspectos deben ser tomados en consideración respecto al objeto de la invención reportada aquí, entre los cuales están los avances importantes en los campos de la bioquímica, biología molecular, inmunología y electrofisiología relacionados con el conocimiento generado acerca de:

30

1)- la presencia de proteínas integrales de las membranas biológicas denominadas "canales iónicos" jugando un papel fundamental en la comunicación celular, vías de transducción de señales y la homeostasis general de los tejidos y funciones de varios órganos;

35

2)- diferentes niveles de expresión de estos canales en células del sistema inmune, principalmente en linfocitos T, mostrando jugar un claro papel en eventos relacionados a un conjunto de enfermedades autoinmunes;

40

3)- el posible control de la función de los canales, por lo tanto, el posible tratamiento de trastornos, mediante la adición de diversos productos químicos, ligandos naturales y sustancias sintéticamente preparadas, ya sea reproduciendo al ligando encontrado en la naturaleza o preparando derivados similares (peptidomiméticos).

Una multitud de canales de potasio (K) se han descubierto y reportado existir en los últimos 15 años, permitiendo su purificación, expresión individual y análisis funcional.

45

Son proteínas multiméricas implicadas en la determinación del potencial de membrana celular, controlando así el tono del músculo liso, excitabilidad sináptica, liberación de neurotransmisores y otros procesos. En la presente invención se desea enfatizar la importancia de las especies de canales de K, subtipo Kv1.3, y su papel en la proliferación de los linfocitos y en el control de enfermedades autoinmunes por medio de la inhibición de este canal. Este es un canal rectificador tardío, expresado predominantemente en linfocitos T [Grissmer *et al.*, 1990; Lewis y Cahalan, 1995] a diferencia de los subtipos Kv1.1, Kv1.2 ampliamente distribuidos en cerebro o el Kv1.5 en tejido cardíaco, por mencionar sólo algunos de los subtipos de canales de potasio.

50

El mecanismo por el cual la modulación de la actividad de los canales Kv1.3 afecta la proliferación de los linfocitos está siendo investigado en varios laboratorios y fueron objeto de muchas publicaciones recientes (revisado en [Beeton y Chandy, 2005; Judge y Bever, 2006, Panyi *et al.*, 2006], incluyendo algunas patentes (tal como los documentos US 5.397.702 de Cahalan *et al.* 1995 y US 6.077.680 de Kern *et al.* 2000).

55

Las enfermedades autoinmunes se caracterizan por su considerable morbilidad en todo el mundo. Entre estas enfermedades están: diabetes mellitus tipo 1 (insulinodependiente) esclerosis múltiple (EM), artritis reumatoide, síndrome de Sjogren, enfermedades mixtas del tejido conectivo, lupus eritematoso sistémico (LES), miastenia gravis, por mencionar sólo algunas de ellas. Un modelo experimental relevante para las enfermedades autoinmunes es la encefalitis autoinmune experimental (EAE). Es generalmente aceptado que estas enfermedades autoinmunes resultan de la respuesta del sistema inmune destruyendo tejidos específicos, ya sea por ataque directo a las células o por la producción de auto-anticuerpos. La sobre-expresión de canales Kv1.3 es un rasgo característico de las células T auto reactivas, proporcionando así una excelente oportunidad para la modificación de su proliferación por

60

65

los bloqueadores de Kv1.3

En estas líneas de investigación y experimentación, se han descrito e incluso patentado varias sustancias. Uno de estos ejemplos es la toxina Shk de la anémona marina *Stichoactyla helianthus* y varios de sus derivados afirmando tener un efecto protector en contra de varias enfermedades autoinmunes (tal como el documento US 6.077.680 de Kera *et al.* 2000)

Entre otros ligandos naturales que son capaces de afectar a la función de los canales iónicos están los péptidos tóxicos aislados del veneno de los alacranes. Los péptidos específicos para canales de K aislados de estos venenos son péptidos de cadena corta que contienen de 22 a 42 aminoácidos compactados por tres o cuatro puentes de disulfuro. Son bloqueadores de diferentes sub-tipos de canales con una enorme variabilidad en selectividad y afinidad (revisad por [Giangiacomo *et al.*, 2004; Rodríguez de la Vega y Possani, 2004]). Por ejemplo, caribdotoxina es un bloqueador potente de los canales de potasio rectificadores tardíos tipo *shaker* Kv1.1, Kv1.2 y Kv1.3 pero también bloquea los canales de potasio dependientes de calcio K(Ca) tipo maxi [Rauer *et al.*, 2000] Margatoxina, otro péptido del veneno de alacranes, no tiene actividad bloqueadora sobre canales K(Ca) pero bloquea con alta afinidad a los canales Kv1.3. [García-Calvo *et al.*, 1993] Angiotoxina, noxiustoxina, kaliotoxina son ejemplos de toxinas de alacrán que afectan diferentes tipos de canales de K con distintas afinidades y selectividades, pero usualmente modifican más de un sub-tipo de canales (revisado recientemente por [Panyi *et al.*, 2006]). Debido a su relativamente rígida estructura tridimensional, estabilizada por los puentes de disulfuro, algunos de estos péptidos de alacrán se han utilizado como “pinzas moleculares” para medir las distancias entre los residuos de aminoácidos en el vestíbulo externo de los canales de potasio [Krezel *et al.*, 1995; García *et al.*, 2000]. La estructura tridimensional de muchas toxinas de alacrán específicas para canales de K se resolvió por resonancia magnética nuclear y/o métodos de difracción de rayos X, y en conjunto con la ya conocida estructura de algunos canales de K han proporcionado una clave para modelar la interacción entre el receptor (canal iónico) y el ligando (toxina de alacrán). Mutagénesis dirigida al sitio de residuos de aminoácidos tanto sobre el canal iónico como en los ligandos han proporcionado información para la identificación de una superficie putativa de interacción entre el par de proteínas receptor-ligando [Rodríguez de la Vega *et al.*, 2003]. Esta información es fundamental para el diseño racional de fármacos con potencial de posibles aplicaciones farmacológicas. El único problema en el uso de estos péptidos naturales como fármacos potenciales es que carecen de especificidad y afinidad. En la actualidad, hay 20 sub-familias de toxinas de alacrán comprendiendo 125 péptidos estructuralmente relacionados, clasificados por su similitud de secuencia y posible función [Tytgat *et al.*, 1999; Rodríguez de la Vega y Possani, 2004].

Los siguientes ejemplos también pueden ser mencionados:

BATISTA CESAR V F *ET AL.*: (BIOPHYSICA ACTA, Vol. 1601, No. 2, páginas 123 a 131) da a conocer 2 novedosas toxinas del alacrán amazónico *Tityus cambridgei* que bloquean los canales Kv1.3 y *shaker* B K⁺; el documento WO 2006/116156 A da a conocer agentes terapéuticos de péptidos de toxina; EP0916681 A se refiere a neuropéptidos que se originan en el alacrán; y OLAMENDI-PORTUGAL *ET AL.*, (2005) (TOXICON, ELMSFORD, NY, US, vol. 46, no. 4, p. 418-419) se refiere a novedosos péptidos ct-KTx a partir del veneno de alacrán.

Bases moleculares para la terapia de enfermedades autoinmunes basada en la inhibición de Kv1.3

En esta sección los inventores presentan el estado de los conocimientos de vanguardia en el control de diversas enfermedades autoinmunes por simple aplicación de ligandos (péptidos o compuestos orgánicos) capaces de bloquear con alta afinidad y alta especificidad al canal Kv1.3 de las “células T de memoria efectoras” (T_{EM}) de los linfocitos.

Se ha demostrado previamente que el mecanismo por el cual los inhibidores del canal Kv1.3 interfieren con los procesos de activación del linfocito provocados por la estimulación fisiológica de antígenos o mitógenos es la despolarización de la membrana y la consecuente inhibición de las señales de Ca²⁺ necesaria para la progresión normal del ciclo celular hacia la proliferación y producción de los clones de células T específicas para el reto del antígeno (revisado por [Cahalan *et al.*, 2001; Panyi *et al.*, 2004; Panyi *et al.*, 2006]). Hay dos tipos de canales de K que se encargan de mantener el potencial de membrana suficientemente hiperpolarizado (-50,-60 mV) de las células T [Verheugen *et al.*, 1995], los canales de potasio dependientes de voltaje y activados por despolarización denotados como Kv1.3 [Decoursey *et al.*, 1984; Matteson y Deutsh, 1984] y los canales de potasio de mediana conductancia activados por calcio denominado IKCAI (o KCA3.1 de acuerdo a la nomenclatura reciente) [Grissmer *et al.*, 1993]. La actividad de estos canales proporciona el contrabalancee del eflujo de cargas positivas requerido para mantener el potencial de membrana negativo durante el influjo de Ca²⁺ dentro de las células T a través del canal liberador de Ca²⁺ activado por Ca²⁺ [Feske *et al.*, 2006; Yeromin *et al.*, 2006]. La contribución de estos dos tipos de canales de K al potencial de membrana de las células T depende del estado de activación de las células (de reposo frente a activadas) y su papel funcional en el sistema inmunológico determinado por el grado de diferenciación terminal de las células T, como veremos a continuación [Wulff *et al.*, 2003].

Dos tipos de células T, las células T naïve y las células centrales de memoria (T_{CM}) requieren una estimulación antigénica fuerte y co-estimulación en los órganos linfoides periféricos (secundarios) para ser activadas. Las células

T naïve que no se han encontrado antes con un antígeno llevan CCR7⁺CD45RA⁺, marcadores de expresión funcional. Las células centrales de memoria (T_{CM}, CCR7⁺CD45RA⁺) las que median la memoria reactiva, son probablemente arrestadas en un estado intermedio de diferenciación terminal para convertirse en células de memoria efectoras (T_{EM}) [Sallusto *et al.*, 2004]. Estas células tienen poca o ninguna función efectora, pero fácilmente proliferan y se diferencian a células efectoras en respuesta a la estimulación por el antígeno. La memoria protectora está gobernada por las células de memoria efectoras, T_{EM}, (CCR7⁺CD45RA⁺). Las células T_{EM} muestran un conjunto de receptores característicos para quimiocinas y moléculas de adhesión que son necesarias para estar en el tejido inflamado en el que ejercen inmediatamente su función efectora. En algunas enfermedades autoinmunes, incluyendo la esclerosis múltiple (EM (Wulff *et al.*, 2003), artritis reumatoide y diabetes mellitus tipo 1 [Beeton *et al.*, 2006], psoriasis autoinmune, lupus eritematoso, colitis ulcerativa, oftalmia simpática y reabsorción el hueso periodental, las células T_{EM} activadas crónicamente son las responsables del daño del tejido, lo que la inhibición selectiva de la proliferación y actividad funcional de estas células es de suma importancia en el manejo de estas enfermedades (revisado por [Chandy *et al.*, 2004; Beeton y Chandy, 2005; Panyi *et al.*, 2006]. Las células naïve en reposo, T_{CM} y las T_{EM} ya sea CD4⁺ (ayudadoras) o CD8⁺ (citotóxicas) expresan un fenotipo similar en número de canales Kv1.3 (200-300) y menos de 30 canales IKCa1 por célula [Wulff *et al.*, 2003]. La transformación de las células naïve y T_{CM} a células blastos proliferativas por la estimulación antigénica específica está acompañada de un modesto incremento (~1,5 veces) en el número de canales Kv1.3 por célula, mientras el número de canales IKCa1 aumenta drásticamente (500 canales/célula) y por tanto, estas adquieren un fenotipo IKCa1^{alto} Kv1.3^{bajo}. En contraste, la activación de las células T_{EM} ya sean fenotipo CD4⁺ o CD8⁺ en los tejidos periféricos se acompaña de un aumento dramático en el número de canales Kv1.3 a aproximadamente 1.500 por célula sin ningún cambio en el nivel de expresión de los canales IKCa1 lo que el fenotipo de las células T_{EM} activadas se convierte en IKCa1^{bajo} Kv1.3^{alto}.

La relación causal entre las células T_{EM} Kv1.3^{alto} y las enfermedades autoinmunes se fundamenta en los siguientes datos obtenidos de enfermedades humanas:

- 1) Las células T mielino-reativas de sangre periférica de pacientes con EM son Kv1.3^{alto} [Wulff *et al.*, 2003];
- 2) Las células T mielino-reativas de sangre periférica de controles sanos son Kv1.3^{alto}, consistente con el fenotipo de las células T_{CM} naïve;
- 3) La estimulación de las células T de pacientes con EM con antígenos irrelevantes como péptidos de insulina, ovoalbúmina o con mitógenos convencionales no induce la generación de células T_{EM} con el fenotipo Kv1.3^{alto} IKCa1^{bajo};
- 4) Las células T_{EM} Kv1.3^{alto} fueron encontradas en infiltrados inflamatorios de cerebro y en el parénquima de lesiones desmielinizadas en autopsias de pacientes con EM [Rus *et al.*, 2005];
- 5) Las células T aisladas de líquido sinovial de pacientes humanos que sufren artritis reumatoide (AR) expresan grandes cantidades de Kv1.3 en comparación con las células T del mismo donador aisladas de sangre periférica. Estas células son Kv1.3^{alto} y CCR7⁻ indicando que son células T_{EM} [Beeton *et al.*, 2006];
- 6) Líneas de células a corto plazo T CD4⁺ antígeno específico (TCL) generadas a partir de linfocitos de sangre periférica de pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) y específicas para autoantígenos asociados a DMT1, insulina y GAD65, muestran rasgos característicos de células T_{EM} ya que carecen del antígeno CCR7 (CCR7⁻) y muestran el fenotipo Kv1.3^{alto} [Beeton *et al.*, 2006].

Como el control del potencial de membrana de las células T_{EM} se rige exclusivamente por la actividad de los canales Kv1.3, la proliferación de estas células, su actividad funcional y por lo tanto los síntomas de las enfermedades autoinmunes, deben ser mejorados por el uso de inhibidores de Kv1.3. Los siguientes datos en la literatura de estudios *in vivo* e *in vitro* apoyan este escenario:

- 1) La proliferación *in vitro* de líneas de células T crónicamente activadas con las características de T_{EM} (CCR7⁺Kv1.3^{alto}) y específicas para antígenos de mielina [Wulff *et al.*, 2003] o células T_{EM} aisladas de líquido sinovial de pacientes con AR es completa y permanentemente suprimida por péptidos que son bloqueadores específicos de Kv1.3 como Shk [Wulff *et al.*, 2003], Shk (L5) o por PAP-1 de bloqueador de Kv1.3 de moléculas pequeñas [Beeton *et al.*, 2006];
- 2) Experimentos *in vivo* con Margatoxina, otro péptido bloqueador de alta afinidad de Kv1.3, muestran que el bloqueo de Kv1.3 lleva a la inhibición de la reacción de hipersensibilidad tardía en cobayos, esta reacción es una buena medida de la actividad de las células T de memoria efectoras [Koo *et al.*, 1997];
- 3) El tratamiento con células T de rata MBP-específicas con Shk o Shk-Dap22 durante su estimulación *in vitro* con MBP (fase de sensibilización) junto con repetidas aplicaciones de los péptidos en el animal receptor (durante la fase efectora) evita la transferencia adoptiva de la Encefalomiелitis Autoinmune Experimental (TA-EAE) en ratas Lewis [Beeton *et al.*, 2001]. EAE en ratas [Ben Nun y Cohen, 1982], es el

5 modelo mejor caracterizado para la enfermedad humana EM, caracterizada por patogénesis y anomalías neurológicas similares, y la población de células T causantes de la enfermedad son las células T_{EM} mielina-específica teniendo el fenotipo Kv1.3 alto. La aplicación combinada de bloqueadores de canales Kv1.3 e IKCa1 también mejora los síntomas de EAE cuando se administran después de su inicio [Beeton *et al.*, 2001];

10 4) El modelo de artritis crónica restringida a MHC clase II inducida por pristan (PIA) en ratas Dark Agouti y es un modelo en rata para la artritis reumatoide humana. Una única inyección diaria de Shk (L5) redujo significativamente el número de articulaciones afectadas por la enfermedad durante el periodo de prueba (hasta 34 días) [Beeton *et al.*, 2006];

15 5) La eficacia de los inhibidores del canal Kv1.3 para prevenir la diabetes autoinmune experimental (EAD un modelo en rata para la DMT1 de los seres humanos) se estudio en ratas DP-BB/W [Beeton *et al.*, 2006]. Se mostró que administraciones repetidas diariamente de PAP-1, una molécula pequeña bloqueadora selectivamente y con alta afinidad del Kv1.3 reduce el número de ratas que muestran síntomas de EAD en un 50 % (sometido a ensayo a 110 días de edad) en comparación con los animales control tratados solamente con vehículo. Esto estuvo acompañado por una disminución de la infiltración intraislotes de células T y macrófagos y la reducción de la destrucción de las células β en el grupo tratado con PAP-1 comparado con el grupo de control tratado con vehículo (sometido a ensayo entre 35-70 días de edad) [Beeton *et al.*, 2006].

25 La inhibición de la proliferación de las células T por inhibidores específicos del canal Kv1.3 es específica de las células T_{EM3} lo que hace a estos compuestos herramientas ideales para el manejo o la prevención de enfermedades autoinmunes. Aunque la proliferación inducida por antígenos de las células naïve y células TCM en reposo es parcialmente sensible a la inhibición mediada por Kv1.3, la sobreexpresión transcripcional de los canales IKCa1 supera está en células T preactivadas y hace que la proliferación de estas células sea sensible a los inhibidores de IKCa1 pero no a los inhibidores de Kv1.3 [Ghanshani *et al.*, 2000]. Esta acción restringida de los inhibidores de Kv1.3 e IKCa1 en diferentes subconjuntos de células T subraya la importancia de la selectividad sobre una molécula determinada por Kv1.3 sobre IKCa1. También se ha demostrado recientemente que la inhibición de la proliferación de T_{EM} por inhibidores de Kv1.3 puede ser superada por una estimulación excesiva de antígeno imitando la activación de las células T_{CM} por patógenos y antígenos de vacunas durante una reacción de memoria inmunológica protectora normal [Beeton *et al.*, 2006]. Así, la aplicación de inhibidores de alta afinidad y altamente selectivos por el canal Kv1.3 idealmente afectaría las células T_{EM} repetidamente activadas durante las reacciones autoinmunes mientras el nivel de otras funciones protectoras del sistema inmune no se altera.

35 Además de los linfocitos T y B humanos los canales Kv1.3 se expresan en varios órganos y tejidos (incluyendo el sistema nervioso central, riñón, hígado, músculo esquelético) y el bloqueo de los canales Kv1.3 en estas células pueden provocar efectos colaterales considerables. Extensas pruebas toxicológicas *in vitro* y pruebas agudas y crónicas *in vivo* se han realizado previamente con Shk (L5) [Beeton *et al.*, 2005; Beeton *et al.*, 2006] del grupo de bloqueadores peptídicos y con PAP-1 [Schmitz *et al.*, 2005; Beeton *et al.*, 2006] del grupo de pequeñas moléculas bloqueadoras. Estos estudios demostraron la ausencia de síntomas clínicos de efectos secundarios neurológicos y cardíacos o cambios histológicos en los tejidos en los que se expresa Kv1.3. Así el efecto benéfico por el tratamiento de bloqueadores de canales Kv1.3 mencionado anteriormente combinado con un mínimo o la ausencia completa de efectos secundarios apunta a la aplicación de bloqueadores selectivos de canales Kv1.3 en el manejo de enfermedades autoinmunes.

50 En resumen, los datos arriba mencionados sugieren un papel crítico de los canales Kv1.3 en la ejecución de una respuesta inmune fisiológica y un punto de la aplicabilidad de una intervención terapéutica en enfermedades autoinmunes por inhibición de los canales Kv1.3.

Sumario de la invención

55 La presente invención concierne a la identificación y uso de péptidos nuevos aislados del veneno del alacrán Mexicano *V. mexicanus*: Vm23, Vm24 y sus análogos funcionales equivalentes, que son capaces de inhibir la función de los canales hKv1.3 de linfocitos humanos con alta afinidad y especificidad, por bloqueo de la conductancia iónica específica. En otras realizaciones de la presente invención, los inventores revelan composiciones farmacéuticas comprendiendo Vm23, Vm24 y sus análogos funcionales equivalentes, métodos para su uso como bloqueadores de canales de potasio Kv1.3, para tratar varias condiciones inmunológicas y su aplicación en diagnóstico y métodos para su síntesis química y plegamiento correcto. Estos péptidos se aislaron por métodos convencionales de cromatografía líquida de alta resolución y se ha tenido su secuencia primaria de aminoácidos determinada por degradación de Edman y espectrometría de masas, mostrando la estructura primaria mostrada en SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2. Vm24 contiene 36 aminoácidos con un peso molecular de 3863,5 Dalton. Es una molécula compacta mantenida por cuatro puentes de disulfuro establecidos por espectrometría de masas entre los pares de cisteína en las posiciones C6 y C26, C12 y C31, C16 y C33, y C21 y C36, en las que la letra C es la abreviatura del residuo cisteína y los números corresponden a su posición relativa en la secuencia de aminoácidos. El amiodácido del carboxilo terminal del péptido está amidado. El péptido completo se sintetizo

químicamente utilizando el método de fase sólida de Merrifield y se obtuvo el plegamiento correcto del péptido sintético y se confirmó por análisis funcional y químico. Vm24 no es tóxico en ratones cuando se inyecta una cantidad relativamente alta (sometido a ensayo hasta 200 microgramos por ratón de 20 gramos de peso corporal, que es 10,000 microgramos/ kilogramo de peso de ratón). Cuando se aplica a linfocitos humanos *in vitro*, éste muestra una extremadamente alta afinidad por los canales hKv1.3 sometido a ensayo por técnicas de "patch-clamp". Se une a estos canales de una manera casi irreversible, mostrando un valor de K_d en el rango bajo picomolar (menos de 3 picomolar -3 pM). No modifica las corriente de potasio de los siguientes canales iónicos: hKv1.4, hKv1.5, rKv2.1, hBK y hERG, y las corrientes del canal de Na^+ cardíaco activado por voltaje (hNav1.5) cuando se prueba a concentraciones de 10 nanomolar (10 nM). La inhibición de la corriente a concentraciones 10 nM para los canales hKCa1, mKv1.1, y hKv1.2 es aproximadamente de 20 a 50 %, opuesto al 100 % de bloqueo para canales hKv1.3. La toxina bloquea más del 50 % de la corriente del canal Kv1.3 a concentraciones tan bajas como 3 pM, siendo, así, aproximadamente 1.500 veces más efectiva sobre este canal que alguno de los otros canales sometidos a ensayo.

Las pruebas de letalidad realizadas con Vm24 no causan síntomas observables de intoxicación utilizando concentraciones hasta 200 microgramos/20 gramos de peso de ratón. Vm24 aplicado al modelo de la rata de hipersensibilidad tardía (DTH) protege a los animales de experimentación. La sensibilización de la piel de las ratas de experimentación con dinitrofluorobenceno (DNFB) causa una repuesta inmunológica considerable (enrojecimiento e inflamación de las orejas) El grupo de ratas sujeto a una simple inyección de 10 microgramos de Vm24 en el día 6 después de comenzar el tratamiento presenta una atenuación considerable de la respuesta inmune; la inflamación de las orejas tratadas es significativamente disminuida (al menos 60 % menos inflamación) comparado con las ratas control que recibieron sólo el vehículo.

Un péptido relacionado, llamado Vm23, también se aisló del mismo veneno y se secuenció completamente, tal como se muestra en SEQ ID NO: 2. Este péptido es idéntico en un 83 % a Vm24, tiene 35 residuos de aminoácidos empacados por cuatro puentes de disulfuro, y tiene un peso molecular de 3664 Dalton: Vm23 muestra funciones equivalentes a las de Vm24: alta afinidad y especificidad por los canales hKv1.3, El bloqueo de la corriente de los canales hKv1.3, hKCa1, mKv1.1, y hKv1.2 a una concentración de 10 nM de Vm23 fueron de aproximadamente 95 %, 1 %, 3 % y 9 %, respectivamente.

El análisis filogenético realizado con los dos péptidos usando más de 125 péptidos de alacrán específicos para canales de K conocidos [Bagdany *et al.*, 2005], muestran que Vm23 y Vm24 no están entre alguna de las 20 sub-familias de estructuras de toxinas de alacrán hasta ahora descritas. Son los primeros dos ejemplos de una nueva sub-familia estructural, proponemos que sea llamada α -KTx 21. Vm24 y Vm23 pueden ser así llamadas α -KTx21.1 y α -KTx21.2, respectivamente. Entre los criterios usados para definir nuevas familias de toxinas de alacrán específicas para canales de K, de acuerdo a un panel internacional de científicos que establecen la nomenclatura sistemática actualmente en uso (véase [Tytgat *et al.*, 1999]), es necesario que la estructura primaria sea diferente a otras menos de 50 %. De hecho, Vm23 y Vm24 muestran menos del 50 % de similitud de secuencia con las otras toxinas conocidas.

Basados en el estado actual del conocimiento del campo, estas propiedades hacen de Vm23, Vm24 y sus análogos funcionales equivalentes, excelentes candidatos para supresión inmune y en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades autoinmunes.

Breve descripción de las figuras

Las figuras incluidas en esta divulgación forman parte de la especificación presente y se incluyen aquí para demostrar aún más ciertos aspectos de la presente invención. El invento completo puede ser mejor entendido completando una o más de estas figuras con una descripción detallada de realizaciones concretas presentadas, especialmente en la sección de los ejemplos siguientes.

Figura 1: **Separación por HPLC de 1 mg de veneno soluble del alacrán *V. mexicanus*.** Más de 80 componentes diferentes se obtuvieron separadamente por la aplicación del veneno soluble en una columna de fase inversa C18 (número de catalogo 218TP54 de Vydac, Hisperia, GA) equilibrada con solución A (agua con 0.12 % de TFA) utilizando un gradiente lineal de 0 % a 60 % de solución B (Acetonitrilo con 0.1 % de TFA) en 60 minutos. Los números 1 y 2 en los tiempos de retención 23 y 24 minutos indican la posición de elusión de Vm23 y Vm24, respectivamente. Una separación adicional de cada uno de estas dos fracciones cromatográficas se realizó en el mismo sistema, pero utilizando un gradiente lineal de solución A a 40 % de solución B en 60 minutos. Los resultados se muestran en el inserto de la figura. Los asteriscos en el inserto indican la posición de elusión de los péptidos totalmente puros.

Figura 2: **Secuencia de aminoácidos de Vm23, Vm24 y consenso.** La secuencia de aminoácidos de Vm23 y Vm24 se obtuvo por degradación de Edman directa de muestras de los péptidos nativos reducidos y alquilados, en combinación con análisis de espectrometría de masas de los péptidos obtenidos por hidrólisis enzimática de los péptidos puros con enzimas específicas (endoproteasas Arginina -C y Lisina- C), tal como se indica bajo la secuencia correspondiente. La secuencia de aminoácidos de los péptidos purificados después de la hidrólisis enzimática y separación por HPLC se identificó por análisis de

espectrometría de masas (EM/EM, que significa fragmentación por espectrometría de masas por ionización con electro-pulverización). Bajo cada secuencia están las indicaciones de los segmentos identificados por los diferentes métodos usados. Directo significa degradación de Edman, Arg-C y Lys-C son los fragmentos purificados después de la digestión con esas enzimas. EM se refiere a la identificación basada en el peso molecular del aminoácido faltante. La secuencia consenso tiene 30 residuos de aminoácidos que son idénticos a Vm23 o Vm24. La posición marcada como “x” puede ser: X¹, cualquier aminoácido siempre y cuando no perturbe el plegamiento tridimensional de la proteína o mejor aún K o P; x², cualquier aminoácido que no perturbe la estructura tridimensional de la proteína o mejor aún L o P; x³, cualquier aminoácido que no perturbe la estructura tridimensional de la proteína o mejor aún K o R; x⁴, cualquier aminoácido siempre y cuando no perturbe el plegamiento tridimensional de la proteína o mejor aún S o N; x⁵, cualquier aminoácido siempre y cuando no perturbe el plegamiento tridimensional de la proteína o mejor aún K o R y x⁶, cualquier aminoácido siempre y cuando no perturbe el plegamiento tridimensional de la proteína o mejor aún Y o ninguno en absoluto.

Figura 3: **Vm24 presenta un C terminal amidado.** Disociación inducida por colisión (CID) del C-terminal muestra 1,0 unidad menos del valor teórico esperado de ión [M+H]⁺ a m/z 909,4 u.m.a. (peso molecular monoisotópico) que el valor teórico esperado [M+H]⁺ 910,5 u.m.a. La serie iónica y (en cursiva) corresponde a una secuencia C-terminal amidada tal como se muestra en el inserto marcado con 1). Los valores de la serie iónica y teórica del péptido con el C-terminal libre (TV-COOH), los valores de la serie y teórica del péptido con el C-terminal amidado (TV-NH₂) y los valores de la serie y experimental (EXP) se comparan en la tabla inserto (inserto marcado con 2).

Figura 4: **Heterodímeros de Vm24 para la asignación de los enlaces disulfuro.** Los números 1 y 2 muestran los pesos moleculares y las estructuras esquemáticas de los heterodímeros producidos por la rotura proteolítica simultánea de Vm24 utilizando tripsina y quimiotripsina a pH 6,5. La masa del ión [M+H]⁺ a m/z 788,0 u.m.a. corresponde a la masa molecular del heterodímero que contiene el par de cisteínas C4-C8 (número 1) y el ión [M+H]⁺ a m/z 560,4 u.m.a. al par de cisteínas C3-C7 (número 2).

Figura 5: **Semi-pares de cistina en Vm24.** A) espectro de masas de EM/EM correspondiente a la estructura del complejo que contiene dos pares de cistina, C1-C4 y C2-C6 con ión [M+2H]²⁺ a m/z 1099,7 u.m.a. Los valores de la serie iónica b de 1137 a 1507 u.m.a. inequívocamente representan la secuencia GSPE confirmando la asignación de los últimos dos puentes disulfuro. B) Se muestra la disposición completa de los puentes de disulfuro de Vm24, tal como se determinó por análisis de espectrometría de masas descrito en el inciso A de esta figura.

Figura 6: **Purificación por HPLC de Vm24 sintético.** Vm24 preparado sintéticamente (50 miligramos de proteína) se separó en una columna preparativa de fase inversa C18. El número 1 indica la posición de elusión de Vm24 sintético y correctamente plegado, los números 2 y 3 indican péptidos incorrectamente plegados o secuencias truncadas. Una separación adicional de esta fracción cromatográfica se realizó en el mismo sistema, pero usando una columna analítica desarrollada con un gradiente lineal de solución A y 40 % de solución B, durante 60 min. El resultado se muestra en el inserto de la figura.

Figura 7: **Comparación por HPLC del péptido Vm24 natural y sintético.** A) La aplicación de 10 microgramos de Vm24 nativo en una columna analítica C18 (número de catálogo 218TP54 de Vydac, Hesperia, CA) en el sistema de HPLC descrito en la Figura 1 muestra que el péptido puro eluye a 32,67 minutos, cuando se eluye con un gradiente lineal de solución A y 40 % de solución B, en 60 min. B) Cromatograma de 15 microgramos de Vm24 sintéticamente preparado y plegado en el mismo sistema y condiciones. C) Co-inyección de una mezcla 1:1 de Vm24 natural y sintética (8 microgramos en total) mostrando que co-eluyen al mismo tiempo de retención. Vale la pena mencionar que el eje X de la gráfica se ha movido hacia la derecha para las letras B y C, a fin de que las tres gráficas puedan observarse comparativamente, pero por separado, de lo contrario los tiempos de elución de los tres pases independientes de HPLC caerían en el mismo pico y serían indistinguibles.

Figura 8: **Secuencia y análisis filogenético de Vm23 y Vm24.** A) Alineamiento múltiple de secuencias Vm24 y Vm23 con sus más estrechamente relacionados péptidos α-KTx. El alineamiento se llevó a cabo con el programa CLUSTAL X [Thompson *et al.*, 1997] y la identidad de secuencia con Vm24 (% , última columna) se calculó con BioEdit. B) El árbol filogenético simplificado se calculó con MrBayes 3.0b4 [Huelsenbeck y Ronquist, 2001; Ronquist y Huelsenbeck, 2003]. Vm23 y Vm24 se agrupan y se diferencian sustancialmente de los miembros de la subfamilia α-KTx 6.

Figura 9: **Bloqueo selectivo de canales iónicos de linfocitos por Vm24.** A) Las corrientes de potasio de células completas a través de los canales hKv1.3 fueron evocados en linfocitos T humanos en respuesta a pulsos despolarizantes a +50 mV a partir de un potencial de prueba de -120 mV cada 15 s. Las corrientes en ausencia de Vm24 (control, indicado por una flecha) son casi totalmente bloqueadas cuando se administra 1 nM de Vm24 a la célula por perfusión del medio extracelular. La flecha indica el primer pulso en Vm24. B) Se muestra la corriente de pico normalizada como una función del tiempo seguida de la aplicación de 1 nM (círculos llenos) o 0,3 nM (círculos vacíos) de Vm24. La flecha indica el inicio de la aplicación de la toxina. C) Se muestra la corriente normalizada de pico de un linfocito como una función del tiempo cuando se aplica 3 pM de Vm24 y después se remueve (lavado) del medio extracelular. La perfusión con medio libre de toxina resulta en una muy lenta y parcial recuperación del bloqueo con una constante de tiempo de ~3800 s. Los pulsos se dieron cada 30 s. D) La relación dosis respuesta para la Vm24 se obtuvo representando la fracción restante de corriente (RCF = I / I_0) como una función de la concentración de la toxina, en la que I e I_0 son las corrientes de pico medida en presencia y ausencia de

toxina, respectivamente, los datos se ajustaron con la función $RCF = K_d^n / (K_d^n + [Tx]^n)$, en la que $[Tx]$ indica la concentración de la toxina y K_d es la constante de disociación. Las barras indican la desviación estándar ($n = 3-6$). La función dosis respuesta construida de esta forma calcula una $K_d = 2,9$ pM y un coeficiente de Hill $n \sim 1$. E) Los canales de K activados por Ca (hKCa1) de linfocitos T se expresaron en células Cos-7 y las corrientes fueron provocadas por pendientes de voltaje de -120 a +50 mV de un potencial de prueba de -120 mV cada 10 s. Se muestran los registros de los trazos de las corrientes antes de la aplicación de la toxina (control), seguido de equilibrio del bloqueo en presencia de 10 nM de Vm24 durante 45 min. y después de un lavado de la toxina durante 2,5 min. F) La fracción restante de la corriente hKCa1 en presencia de 1 nM y 10 nM de Vm24 se calculó como s/s_0 en la que s y s_0 son las pendientes de la relación I-V producidas por la pendiente de voltaje en presencia y ausencia de Vm24 respectivamente. Las barras indican SEM ($n = 3$).

Figura 10: **Vm24 es selectivo para hKv1.3 entre los canales de la familia Shaker (Kv1.x)**. Se muestran los trazos de las corrientes registradas antes de la aplicación de la toxina (control) tras el equilibrio del bloqueo por 10 nM de Vm24 y después del lavado de la toxina. A) Los canales mKv1.1 se expresaron en células L929 y las corrientes se provocaron por pasos de voltaje a +50 mV de un potencial de prueba de -120 mV cada 30 s. El equilibrio del bloqueo se alcanzó en 6 min., la duración del periodo de lavado fue de 5 min. B) Los canales hKv1.2 se expresaron en células Cos-7 y las corrientes se provocaron por cambios de voltaje a +50 mV de un potencial de prueba de -120 mV cada 30 s. El equilibrio del bloqueo se alcanzó en 5,5 min., la duración del periodo de lavado fue de 7 min. C) Los canales hKv1.3 se expresan generalmente en linfocitos de sangre periférica y las corrientes se provocaron por pasos de voltaje de +50 mV de un potencial de prueba de -120 mV cada 15 s. El equilibrio del bloqueo se alcanzó en 3,5 min., la duración del tiempo de lavado fue de 4,5 min. D) Los canales de inactivación rápida-removida, hKv1.4 (Kv1.4 ΔN) se expresaron en células Cos-7 y las corrientes se provocaron por pasos de voltaje de +50 mV de un potencial de prueba de -120 mV cada 30 s. La duración de la aplicación de Vm24 y el periodo de lavado fueron de 5 min. y 4,5 min., respectivamente. E) Los canales hKv1.5 se expresaron en células MEL y las corrientes se provocaron por pasos de voltaje de +50 mV de un potencial de prueba de -120 mV cada 15 s. La duración de la aplicación de Vm24 y el periodo de lavado fueron de 6 y 3,5 minutos, respectivamente.

Figura 11: **Vm24 no bloquea o inhibe una variedad de canales iónicos de importancia biológica**. Se muestran los trazos de corriente registradas antes de la aplicación de la toxina (control), tras el equilibrio del bloqueo por 10 nM de Vm24 y seguido del lavado de la toxina. A) Los canales rKv2.1 se expresaron en células Cos-7 y las corrientes se provocaron por pasos de voltaje de +50 mV a partir de un potencial de prueba de -120 mV cada 30 s. La duración de la aplicación de Vm24 y el periodo de lavado fue de 7 y 3 minutos, respectivamente. B) Los canales hERG se expresaron en células HEK y las corrientes se provocaron por pasos de voltaje de +20 mV seguidos de pasos de -40 mV durante el cual la corriente de pico se midió. El potencial de prueba fue de -80 mV, con pulsos cada 30 s. La duración de la aplicación de Vm24 y el periodo de lavado fueron de 5 y 2,5 min., respectivamente. C) Los canales hBK (Kca1.1) se expresaron en células TsA-201 y las corrientes se provocaron por pasos de voltaje a +50 mV precedidos por hiperpolarizaciones de 10 ms a -120 mV de un potencial de prueba de 0 mV. Los pulsos se dieron cada 5 s. La duración de la aplicación de Vm24 y los periodos de lavado fueron de 4 min. y un min., respectivamente. D) Los canales Nav1.5 se expresaron en células Cos-7 y las corrientes se provocaron por pasos de 0 mV de un potencial de prueba de -120 mV cada 15 s. La duración de la aplicación de Vm24 y de los periodos de lavado fue de 1 min. y nuevamente 1 min. respectivamente.

Figura 12: **Perfil de selectividad de Vm24**. Las barras indican la fracción de la corriente residual al equilibrio del bloqueo, de los canales indicados, por la aplicación de una concentración 1 nM (A) o 10 nM (B) de Vm24. Los datos se presentan como la media \pm SEM, para $n > 3$ experimentos independientes. Para los sistemas de expresión y el cálculo de RCF y otras condiciones véanse los detalles en las leyendas de las Figuras 9 a 11.

Figura 13: **Bloqueo de alta afinidad de los canales hKv1.3 por Vm24 sintética**. A) Corrientes de potasio en célula completa a través de los canales hKv1.3 de células T humanas se provocaron en respuesta a pulsos de despolarización a +50 mV de un potencial sostenido de -120 mV cada 30 s. Las corrientes registradas en la ausencia del péptido (control, indicada por la flecha) y el bloqueo sostenido (> 90 %) cuando se administra 100 pM de Vm24 sintética (sVm24) vía percusión del medio extracelular. La flecha indica el primer pulso en sVm24. B) Se muestran las corrientes de pico normalizadas como una función del tiempo seguida de la aplicación de 100 pM de sVm24. La flecha indica el inicio de la aplicación de la toxina. No se observa una recuperación significativa del bloqueo cuando la célula se perfunde con solución libre de sVm24 (las flechas indican el inicio del periodo de lavado). C) Las barras indican la fracción de corriente restante al equilibrio del bloqueo de hKv1.3 por sVm24 y Vm24 aplicada en una concentración 100 pM. Los datos se presentan como la media \pm SEM, para $n > 3$ experimentos independientes. Para el sistema de expresión, el cálculo de RCF y otras condiciones véanse los detalles en las leyendas de las Figuras 9 a 11.

Figura 14: **Vm23 es selectiva para hKv1.3**. Se muestran los trazos de las corrientes registradas antes de la aplicación de la toxina (control) tras el equilibrio del bloqueo por 10 nM de Vm23 y seguido de lavado de la toxina. Los canales iónicos bloqueados significativamente por una concentración de 10 nM de Vm24 se seleccionaron para el perfil farmacológico de la Vm23. A) Los canales hKv1.3 se expresan endógenamente en linfocitos de sangre periférica y las corrientes se provocaron por pasos de voltaje de +50 mV de un potencial de mantenimiento de -120 mV cada 15 s. El equilibrio del bloqueo se desarrolló en 3,5 min., la duración del periodo de lavado fue de 2 min. B) Los canales de K activados por Ca^{2+} de linfocitos T

(hKCa1) se expresaron en células Cos-7 y las corrientes se provocaron por pendientes de -120 a +50 mV de un potencial mantenido de -120 mV cada 15 s. La duración de la aplicación de Vm23 y la duración del periodo de lavado fue de 3,5 y 2 min., respectivamente. C) Los canales mKv1. 1 se expresaron en células L929 y las corrientes se provocaron por pasos de +50 mV de un potencial sostenido de -120 mV cada 15 s. La duración de la aplicación de Vm23 y el periodo de lavado fue de 3,5 y 1 minuto respectivamente. D) Los canales hKv1.2 se expresaron en células Cos-7 y las corrientes se provocaron por cambios de voltaje a +50 mV de un potencial sostenido de -120 mV cada 15 s. El equilibrio del bloqueo desarrollo en 3,5 min., la duración del periodo de lavado fue de 2 min.

Figura 15: **Perfil de selectividad de Vm23.** Las barras indican la fracción de la corriente restante al equilibrio del bloqueo de los canales indicados por Vm23 aplicada a una concentración de 10 nM. Los datos están presentados como la media \pm SEM, para $n > 3$ experimentos independientes. Para los sistemas de expresión y los cálculos de RCF y otras condiciones véanse los detalles en las leyendas de las Figuras 9 a 14.

Figura 16: **Respuesta de hipersensibilidad tardía (DTH) en ratas.** Dos grupos de 3 ratas cada uno se sensibilizaron y retaron por aplicación de DNFB. Un grupo recibió una inyección de sólo PBS (control, número 1) y el otro recibió una sola inyección de 10 microgramos de Vm24 (grupo 2). Las orejas se midieron a las 24 horas después de este tratamiento. La barra control muestra el grosor de las orejas después del reto con DNFB para las ratas control, mientras que la barra correspondiente al grupo tratado (grupo 2) muestra el grosor de las orejas de las ratas que se trataron con Vm24. Se observó aproximadamente un 60 % de disminución en inflamación de las ratas que recibieron Vm24, comparadas con las ratas control.

Descripción detallada de la invención

25 Definiciones

A menos que se defina de otra manera, todas las expresiones técnicas y científicas usadas en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por los expertos en la materia a la que pertenece la presente invención. Tal como se usa aquí, las siguientes expresiones tendrán el significado que se les atribuye a menos que se especifique lo contrario. Aunque todos los métodos y materiales similares o equivalentes descritos aquí pueden ser usados en la práctica o probados de la presente invención, se describen los materiales y métodos preferidos. Para efectos de la presente invención, las siguientes expresiones se definen a continuación.

En la presente invención, las expresiones “péptido”, “polipéptido” y “proteína” se usan indistintamente al referirse a las moléculas de péptido de la presente invención.

La expresión “bloqueo de la actividad del canal de potasio Kv1.3” generalmente se refiere a la estimación real del grado de inhibición del flujo de iones a través de dichos canales Kv1.3, causado por la presencia de un inhibidor del canal de potasio Kv1.3.

La expresión “bloqueador del canal de potasio Kv1.3” significa en general una sustancia que inhibe el flujo de iones potasio a través del canal Kv1.3 de la membrana celular que contiene dichos canales, por una oclusión directa de la vía de conducción de iones.

La expresión “análogo” significa en general cualquier cadena de polipéptidos que comparte al menos 83 % de identidad de secuencias pares en las 36 posiciones alineadas de las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO 3 (30 coincidencias sobre 36 posiciones) Esto podría incluir, pero no se limita a, hasta seis cambios de aminoácidos, uno o más residuos de aminoácidos no naturales, derivatización química de uno o más residuos y adiciones al N y/o al C-terminal ya sea por otros residuos de aminoácido u otros restos orgánicos.

La expresión “porcentaje de identidad de secuencias pares” significa de manera general el coeficiente entre las posiciones de residuos de aminoácidos que tienen el mismo aminoácido en dos secuencias alineadas sobre el total de las posiciones cuando se alinean las dos secuencias de proteínas.

La expresión “equivalente funcional” significa en general cualquier estructura molecular que muestra una afinidad y selectividad similar por Kv 1.3 tal como se establece en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2, a condición de que comparta los mismos determinantes estructurales de la afinidad y/o especificidad que confiere la alta afinidad y selectividad de estas secuencias hacia los canales Kv1.3. Podría ser un análogo o peptidomimético.

La expresión “determinantes estructurales de la afinidad y/o especificidad” significa en general todos los grupos funcionales y su posición tridimensional en la estructura del polipéptido que le confiere SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 con alta afinidad y especificidad hacia los canales hKv1.3 Estos determinantes estructurales de la afinidad y especificidad pueden estar relacionados con el mismo o superponerse parcialmente o ser diferentes residuos de aminoácido.

La expresión “grupo funcional” significa en general una molécula química dada en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o

SEQ ID NO: 3 ya sea en la cadena polipeptídica principal o en las cadenas laterales de sus residuos de aminoácido lo que hace los contactos fuertes y específicos con los canales hKv1.3 por lo tanto la determinación de la afinidad y selectividad de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 en dirección a los canales hKv1.3.

5 La expresión “análogo funcional equivalente” significa en general cualquier cadena de polipéptidos que comparte al menos 83 % de identidad de secuencias pares en las 36 posiciones alineadas de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 (30 coincidencias en las 36 posiciones) Esto podría incluir, pero no se limita, a uno o más residuos de aminoácidos no naturales, derivatización química de uno o más residuos, extensiones del N-terminal y/o C-terminal ya sea por otros residuos de aminoácidos o moléculas orgánicas que muestran una afinidad similar y selectividad
10 hacia hKv1.3 tal como se establecen SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

La expresión “peptidomimético” significa en general cualquier compuesto químico que muestra los mismos grupos funcionales en similar posición tridimensional que el de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, por lo tanto imitando los contactos específicos de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 con los canales hKv1.3.

15 La expresión “Péptidos de la presente invención” en general significa los péptidos que tienen una SEQ ID NO: 3, con una estructura terciaria mantenida por cuatro puentes de disulfuro establecidos por los pares de cisteínas en las posiciones C6 y C26; C12 y C31; C16 y C33; y C21 y C36; en las que la letra C representa la abreviatura del residuo de cisteína y los números corresponden a su posición relativa en el alineamiento de la secuencia de aminoácidos. Ejemplos preferidos son aquellos péptidos que tienen la secuencia SEQ ID NO: 1 (Vm23) y SEQ ID NO: 2 (Vm24). Dichos péptidos son capaces de bloquear con alta afinidad y especificidad los canales de potasio Kv1.3 Incluyendo los análogos funcionales equivalentes de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, que comparten al menos 83 % de identidad de secuencias pares alineadas sobre las 36 posiciones de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3 (30 coincidencias, sobre 36 posiciones) que conservan la estructura terciaria mantenida por los cuatro
20 puentes disulfuro y que muestran una afinidad similar y selectividad hacia hKv1.3 tal como se establece en SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 2.

La expresión “vehículo farmacéuticamente aceptable” incluye cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándar, amortiguadores y excipientes, incluyendo la solución amortiguadora de fosfatos salina, agua y emulsiones (como una emulsión aceite/ agua o agua/ aceite) y diversos tipos de agentes humectantes y/o adyuvantes. Vehículos farmacéuticos adecuados y sus formulaciones se describen en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Publishing Co., Easton, 19th ed. 1995). Los vehículos farmacéuticos preferidos dependen de la modalidad prevista de administración del agente activo. Los modos típicos de administración se describen a continuación.

30 La expresión “sales farmacéuticamente aceptables” se refiere a la adición de sales no tóxicas, incluyendo sales formadas con ácidos inorgánicos, tal como ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido fosfórico, ácido sulfúrico y ácido perclórico y sales formadas con ácidos orgánicos, como ácido acético, ácido oxálico, ácido maleico, ácido málico, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido succínico o ácido malónico. Otras sales aceptadas farmacéuticamente incluyen nitrato inorgánico, sulfato acetato, malato, formato, lactato, tartrato, succinato, citrato, ptoluensulfonato, y similares, incluyendo pero sin limitarse a, cationes alcalinos o metales alcalinotérreos como sodio, litio, potasio, calcio, magnesio y similares, así como los no tóxicos, amonio, amonio cuaternario, y aminos catiónicas, incluyendo pero sin limitarse a amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina etilamina y similares.

45 La expresión “composición farmacéutica” significa una composición adecuada para el uso farmacéutico en un sujeto incluyendo un sujeto mamífero o un sujeto humano. Una composición farmacéutica por lo general comprende una cantidad efectiva del principio activo y un vehículo farmacéuticamente aceptado.

La expresión “cantidad efectiva” significa una dosis de un agente activo particular, en este caso un péptido teniendo una actividad bloqueadora del canal de potasio Kv1.3, suficiente para producir el resultado deseado, por ejemplo suprimiendo la respuesta inmune en un mamífero, el tratamiento de una enfermedad autoinmune en un sujeto que necesita de ello, suprimiendo los procesos de activación de las células T del sistema inmune de mamíferos, atenuando las vías de serialización de calcio en los linfocitos T. El resultado deseado puede comprender una mejora objetiva o subjetiva en el sujeto (incluyendo a las células) que recibe la dosis.

55 La expresión “sujeto” se refiere a un animal mamífero, incluyendo un ser humano. Sujetos mamíferos no humanos sometidos a un tratamiento incluyen por ejemplo, vacas, ovejas, cerdos, caballos, perros y gatos. La expresión “enfermedades autoinmunes” en general significa una condición patológica impulsada por las células inmunes de un organismo que afectan la homeostasis de dicho organismo.

60 La expresión “enfermedades autoinmunes asociadas a linfocitos T_{EM}” significa cualquier enfermedad autoinmune en la que las células que atacan el organismo es una célula de linfocito T_{EM}. Entre estas enfermedades se incluyen, pero no se limita a, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diabetes tipo 1, psoriasis autoinmune, lupus eritematoso, colitis ulcerosa, oftalmia simpática y enfermedad de la reabsorción del hueso periodontal.

65 Un “tratamiento profiláctico” es un tratamiento administrado a un sujeto que no exhibe signos de una enfermedad o

muestra sólo los primeros signos de la enfermedad en el que el tratamiento se administra con el fin de disminuir el riesgo de desarrollar la situación patológica, en particular, una enfermedad autoinmune, más específicamente una enfermedad autoinmune asociada a linfocitos T_{EM}.

- 5 Un “tratamiento terapéutico” es un tratamiento administrado a un sujeto que muestra signos de una patología en el que el tratamiento se administra con el fin de disminuir o eliminar los signos patológicos, en particular una enfermedad autoinmune, más específicamente una enfermedad autoinmune asociada a linfocitos T_{EM}.

10 La expresión “órgano” se refiere a los sistemas del cuerpo como, el corazón, hígado, pulmón, riñón, cerebro, suprarrenal, sistema vascular endotelial, sistema inmunológico etc.

15 La expresión “sonda molecular” significa en general cualquier sustancia química o biológica que puede ser usada específicamente para la identificación de células blanco, estructuras celulares, receptores y cualquier molécula a la que la sonda se pueda unir con alta afinidad y especificidad.

La expresión “aminoácido no esencial” significa en general cualquier aminoácido en las SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 que podría ser cambiado por cualquier otro aminoácido sin cambiar sustancialmente la afinidad o especificidad del análogo resultante hacia los canales Kv1.3.

20 **Hallazgos principales**

25 El tema principal de la presente invención se refiere a dos nuevos péptidos (Vm23 y Vm24), sus secuencias de aminoácidos (SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2), así como posibles análogos funcionales equivalentes, y su uso potencial como agentes inmunosupresores específicos. Vm23 y Vm24 son bloqueadores altamente selectivos de los canales iónicos de potasio del sub-tipo Kv1.3, particularmente de los linfocitos humanos (hKv1.3) y se muestra que disminuyen la respuesta inflamatoria *in vivo* de la reacción de hipersensibilidad tardía en ratas, por tanto estos dos péptidos y sus análogos funcionales equivalentes son compuestos dirigidos para ser usados para el tratamiento de algunas enfermedades inmunológicas relacionadas con la respuesta anormal de las células T. Antes de entrar en los detalles de estos agentes inmunosupresores y su efecto en los canales hKv1.3 es importante revisar algunos conocimientos básicos en el ámbito.

30 La regulación del potencial de membrana de todas las células es mantenida principalmente por la presencia de canales iónicos permeables a los iones potasio, simplemente llamados canales de K. Las células individuales pueden expresar varios canales de K distintos, que pueden abrirse o cerrarse en respuesta a cambios en el voltaje, niveles de calcio intracelular o ligandos específicos, aunque los canales activados por voltaje son los más comunes [Gutman *et al.*, 2005]. Entre los ligando naturales que pueden modular la función de los canales de K están las toxinas de los venenos de abeja, alacranes, serpientes y anémonas de mar [Castle *et al.*, 1989; Jouirou *et al.*, 2004; Rodríguez de la Vega y Possani, 2004]. Ejemplos de estas toxinas son noxiustoxina del alacrán *Centruroides noxius* [Carbone *et al.*, 1982] caribdotoxina del alacrán *Leiurus quinquestriatus* [Miller *et al.*, 1985], anurotoxina del alacrán *Anuroctonus phayodactillus* [Bagdany *et al.*, 2005], BgK de la anémona *Bundosoma granulifera* [Aneiros *et al.*, 1993] y ShK de *Stichodactyla helianthus* [Castaneda *et al.*, 1995]. Se ha demostrado que estas toxinas bloquean una variedad de diferentes tipos y subtipos de canales de potasio incluyendo Kv1.3 con diferentes afinidades y especificidades [revisado por Panyi *et al.* 2006]. Los canales Kv1.3 están implicados en la proliferación de linfocitos T y en la producción de linfocinas y los bloqueadores de Kv1.3 son de interés como inmunosupresores potenciales [Panyi *et al.* 2006].

35 Se ha determinado la estructura tridimensional de varias de estas toxinas específicas de canales de K (revisado en [Mouhat *et al.*, 2004]. Gracias a la resolución de la estructura tridimensional de un par de canales de potasio dependientes de voltaje que tienen seis segmentos transmembrana [Lee *et al.*, 2005; Long *et al.*, 2005] y los experimentos realizados con mutantes dobles (toxina y canales) por varios grupos [Goldstein *et al.*, 1994; Stampe *et al.*, 1994; Aiyar *et al.*, 1995; Hidalgo y Mackinnon, 1995] la superficie de contacto de varios de estos ligandos con los canales de K fueron identificados. En cuanto a las toxinas de alacrán conocidas a la fecha, más de 125 péptidos se han estudiado, cuya secuencia de aminoácidos ha sido reportada [Rodríguez de la Vega y Possani, 2004] Estos péptidos e agrupan en 20 subfamilias diferentes basándose en tres criterios: similitud en secuencia primaria, posición de los puentes de disulfuro y especificidad de función. Para el propósito de la presente invención, ambos péptidos (Vm23 y Vm24) se aislaron, se purificaron, se secuenciaron y se ensayaron. La originalidad y la importante propiedad de la información obtenida es la singularidad de su estructura primaria y la función muy específica, que no es evidente por simple observación de sus características estructurales, sino que necesita pruebas experimentales de la función, tanto *in vitro* como *in vivo*, tal como se muestra y se reivindica en la presente invención.

40 Este trabajo comienza con la colecta de los alacranes de la especie *V. mexicanus* en el campo y la extracción del veneno por estimulación eléctrica. Los alacranes se recogieron en el estado de Morelos, México. Los autores tienen la autorización oficial para este propósito (documento número SGPA/DGVS/02483 del 18 de Marzo de 2005, otorgado por la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales del Gobierno Mexicano) Regularmente se ordeñan 30 ejemplares después de anestesia con dióxido de carbono (CO₂). El veneno crudo es procesado inmediatamente o se mantiene congelado a -20 °C hasta su uso.

El veneno soluble fue separado subsecuentemente por HPLC. Los péptidos purificados, objeto de la presente invención, se ensayaron *in vivo* usando ratones como animales modelo para los posibles efectos tóxicos (pruebas de letalidad) y se obtuvo su secuencia primaria determinada por degradación de Edman y análisis de espectrometría de masas. Los detalles de estos experimentos son descritos en el ejemplo 1, a continuación.

5 Debido al hecho de que la cantidad de estos péptidos es relativamente pequeño en el veneno, con el fin de caracterizar su funcionalidad y especificidad de acción sobre canales hKv1.3, una cantidad considerable de Vm24 se sintetizó químicamente.

10 *Síntesis química de Vm24*

La síntesis de un péptido por métodos de fase sólida incluye el uso de una resina de fase sólida, tales como pero sin limitarse a poliestireno, poliacrilamida, ciertas fibras u otros polímeros estables. La derivatización de la resina en fase sólida se puede producir con un brazo adecuado como cloruro de clorotritilo, cloruro de 2-clorotritilo, hidroximetilfenilo, para producir un C-terminal funcionalmente ácido o puede ser preparado para estabilización proteolítica vía una resina enlazada, pero no limitada a un grupo 4-(2',4'- dimetoxifenil-Fmoc-aminometil)-fenoximetilo.

20 El ensamble de la cadena por lo general incluye alguno de las estrategias de grupos protectores en los que el grupo protector del aminoácido es t-butiloxicarbonilo (Boc) o 9-fluorenil-metoxicarbonilo (Fmoc). Las cadenas laterales reactivas de varios de los aminoácidos usados para la síntesis de los péptidos están normalmente protegidas. Los grupos protectores comúnmente usados incluyen: t-butilo, bencilo, tritilo, metiltritilo, bencilo-metilbencilo, tosilo, benciloximetilo, t-butiloxicarbonilo, 2-cloro-bencilo, 2-bromo-bencilo, metoxibencilo, formilo, acetomidometilo, pentametilmroman-sulfonilo, pentametildihidrobenzofurano-sulfonilo, nitro para las aminas de cadena lateral, guanidinas, fenoles, alcoholes, ácidos, imidazoles, tioles, e indoles. Otros grupos protectores se podrían inventar para lograr el mismo objetivo de eliminar las reacciones colaterales indeseables durante el ensamble de la cadena primaria.

30 La síntesis del enlace amida durante la adición de nuevos aminoácidos al péptido en crecimiento puede lograrse mediante el uso de cualquiera de los métodos de activación del ácido incluyendo pero sin limitarse a anhídridos simétricos (carbodiimida), ésteres HOBT, fluoruros de acilo, como activadores de uranio, pero sin limitarse a TBTU, HATU o HBTU, activadores de fosfonio tales como, pero sin limitarse a BP, PyBOP, PyBrOP. Estos son todos los métodos de activación del grupo carboxilo que se espera conozcan los expertos en la materia de la síntesis de péptidos.

35 La síntesis de estructuras análogas que incluyen la sustitución de aminoácidos no naturales en las secuencias SEQ ID NO: 1 (Vm23), SEQ ID NO: 2 (Vm24) o SEQ ID NO: 3 (Vm23 y la secuencia consenso Vm24) también puede ser útil para determinadas realizaciones de la invención. El uso de métodos convergentes mediante los cuales los fragmentos del péptido se montan de forma por el cual el producto final es Vm23, Vm24 o sus análogos también es conocido y puede ser utilizado por expertos en la materia. Los métodos para la ruptura del péptido sintético del soporte sólido en el final del procedimiento de síntesis y el correcto plegamiento de los puentes disulfuro para obtener las secuencias SEQ NO: 1 y 2 o sus análogos también son conocidos y pueden ser reproducidos por expertos en la materia. La ruptura definitiva y desprotección y plegado de la toxina puede ser, pero sin limitarse a HF o TFA en función de la estrategia empleada para la síntesis. La formación de puentes disulfuro incluye cualquier planteamiento ortogonal, en el que la protección diferencial de las Cis podría utilizarse en la posición de los puentes disulfuro para la forma correcta: C6-C26, C12-C31, C16-C33, y C21-C36 de ligamiento para Vm24. Sin embargo, la reacciones de la formación de puentes disulfuro también puede ser obtenido por oxidación al aire, o dirigir la reacción asistidas con una presencia de glutatión reducido y oxidado en diversas proporciones.

50 A raíz de esta metodología básica varias toxinas de origen natural de serpientes, de alacranes y de anémonas de mar se producen sintéticamente, radiomarcadas con 125 y utilizadas como sondas moleculares para investigar la estructura y función de los canales de potasio [Strong, 1990; Moczydlowski *et al.*, 1998; Garcia *et al.*, 2001, Kern *et al.*, Patente US6.077.680]. Muchas de estas toxinas son selectivas para algunos sub-tipos particulares de canal de K [Auguste *et al.*, 1990; Galvez *et al.*, 1990; Crest *et al.*, 1992; Garcia-Calvo *et al.*, 1993; Garcia *et al.*, 1994, Kern *et al.*, Patente US6.077.680]. Entre los ejemplos más usados está la dendrotoxina del veneno de la serpiente *Dendroaspis polylepsis* [Harvey, 1997], La toxina BgK de la anémona marina *Bunodosoma granulifera* [Aneiros *et al.*, 1993; Alessandri Haber *et al.*, 1999] y la toxina ShK de la anémona *Stichodactyla helianthus* [Castaneda *et al.*, 1995; Pennington *et al.*, 1995] y varias toxinas de alacrán como la noxiustoxina de *Centruroides noxius* [Drakopoulou *et al.*, 1995] y la caribdotoxina de *Lehirus quinquestratus* [Sugg *et al.*, 1990], por mencionar unas cuantas. Algunas de estas toxinas, como ShK bloquea los canales Kv1.2 de linfocitos T Jurkat a muy baja concentración (< 1 nM). Sin embargo, muchos de ellos sufren de la falta de especificidad. Es decir, en concentraciones del orden de 10 a 100 nM son también capaces de bloquear otros sub-tipos de canales. Dado que, tal como se demostrará en los ejemplos que se describen a continuación, Vm23 y Vm24 son extremadamente específicas para canales hKv1.3 y tienen una estructura primaria distinta de la de otros péptidos descritos hasta ahora en la literatura, se decidió preparar Vm24 sintéticamente.

La estructura covalente de Vm24 fue obtenida por síntesis química, de acuerdo con el sistema de fase sólida de Merrifield [Merrifield, 1964], utilizando Fmoc-aminoácidos, como ya se ha descrito por nuestro grupo [Drakopoulou *et al.*, 1995].

- 5 La posibilidad de la sustitución de algunos de los aminoácidos de la estructura primaria de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, por otros aminoácidos modificados a fin de obtener un péptido análogo con una vida media superior *in vivo*, lo que reduce la susceptibilidad a las proteasas de los péptidos nativos se encuentra dentro del ámbito de aplicación de la presente invención. Esto puede incluir el reemplazo o sustitución de los residuos que no son esenciales con reemplazos -conservativos isostéricos, por ejemplo: la lisina por glutamina o acetil-lisina, o un aminoácido neutro, como la alanina, o sustitución de aminoácidos Na-metilados en ciertas posiciones para reducir la degradación proteolítica de los péptidos biológicamente activos. También el truncamiento de la secuencia primaria, por la eliminación de ciertos aminoácidos no esenciales para la función, o la adición de residuos extra puede proporcionar análogos estructurales con una mayor estabilidad *in vivo*. Algunos residuos no esenciales de los péptidos de la presente invención identificada por el alineamiento de la SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 incluyen, pero no se limitan a: los residuos en las posiciones n.º 10, 13, 17, 23, 29 y 35 del alineamiento SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2 o alineados en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3.

Un péptido análogo funcional equivalente puede ser producido por la inclusión de D-aminoácidos seleccionados o por síntesis química de un análogo retro- inverso, en el que todos los residuos son D-aminoácidos y la secuencia de aminoácidos se invierte [Jameson *et al.*, 1994; Juvvadi *et al.*, 1996]. Estas modificaciones podrían aumentar la estabilidad del producto. Otro enfoque importante es el desarrollo de compuestos de bajo peso molecular, basado en los determinantes estructurales de la afinidad y la especificidad de la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 a fin de generar compuestos no peptídico (peptidomimético). En estos estudios, los andamios no peptídicos se han diseñado y sintetizado, los cuales contienen los principales grupos funcionales de superficie de unión a los canales de potasio del polipéptido padre. Hay muchos ejemplos en los que 1 compuestos de bajo peso molecular no peptídicos, que ocurren naturalmente, han demostrado imitar o antagonizar el efecto de un ligando polipeptídico o proteico. Compuestos peptidomiméticos han sido diseñadas y sintetizadas para una serie de péptidos terapéuticamente relevantes. Una asa presente en el receptor CD4 que une a las proteínas gpl20 del VIH fue diseñado y obtenido sintéticamente [Chen *et al.*, 1992] y ha demostrado ser un bloqueador eficaz de la unión de gpl20 al receptor CD4 en bajas concentraciones micromolares. FTI-276 es otro ejemplo de una mímica de la región C-terminal de proteínas Ras, que es un bloqueador potente de serialización Ras oncogénica [Lerneretal., 1995].

Tal como se puede deducir de lo descrito anteriormente, hay muchas formas de preparación de los análogos funcionales equivalentes de estos dos péptidos Vm23 y Vm24 que pueden ser utilizados como drogas principales para controlar las funciones anormales de los linfocitos T. La activación inapropiada de los linfocitos T se sabe que causa enfermedades autoinmunes (como la esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diabetes tipo I, psoriasis autoinmunes, lupus eritematoso sistémico, colitis ulcerosa, enfermedad de oftalmia simpática y la reabsorción del hueso peridontal), y el rechazo de trasplantes, entre otros.

40 Con el fin de comprobar la eficacia de posibles nuevos fármacos inmunosupresores hay muchos modelos animales, que proveen ensayos adecuados *in vivo* para probar la eficacia y los posibles efectos secundarios de una sustancia nueva desconocida, como es el caso de la reacción conocida como el hipersensibilidad tardía (DTH-respuesta) en ratas, que se ha utilizado en la presente invención. Tal como se muestra y se discute más adelante, para evaluar el efecto protector de los péptidos de la presente invención, pequeñas dosis de Vm24 fue probado para controlar la reacción inflamatoria que se produce en la oreja de ratas previamente sensibilizadas con dinitrofluorobenceno (DNFB). Este ensayo ha sido ampliamente utilizado y es aceptado como modelo adecuado para los fines de la presente invención [Phanuphak *et al.*, 1974].

50 *Inmunosupresores*

Los inmunosupresores como la ciclosporina y FK506 muestran efectos secundarios graves que limitan su uso terapéutico. Investigaciones llevadas a cabo con estos dos compuestos han podido identificar por lo menos algunos de los mecanismos moleculares responsables de los efectos secundarios indeseables de la administración de estos fármacos. La ciclosporina interactúa con la proteína ciclofilina que está presente en muchos tejidos diferentes, mientras que el FK506 causa toxicidad, ya que su blanco es la proteína FK de unión, también se encuentra en muchos tejidos diferentes. Ha sido por tanto un gran esfuerzo identificar nuevos inmunosupresores, sin efectos secundarios graves. Uno de los principales objetivos es identificar nuevos blancos expresados principalmente en los linfocitos T, tales como el canal iónico Kv1.3. Los canales de potasio Kv1.3 expresados en los linfocitos T son muy importantes para determinadas funciones celulares, a pesar de que el ARN que codifica esta proteína también se encuentra en otras células (linfocitos B, microglia, macrófagos, los osteoclastos, las plaquetas y algunas células cerebrales). Sin embargo, sólo en los linfocitos T, Kv1.3 domina el potencial de membrana y su bloqueo tiene consecuencias funcionales importantes. Debido al mecanismo de acción de los bloqueadores de Kv1.3 y la distribución de tejidos relativamente limitado de canales Kv1.3, un bloqueador específico y de alta afinidad de Kv1.3 se espera que se vea menos efectos secundarios tóxicos que la ciclosporina y FK-506, por lo tanto, puede resultar útil para el tratamiento de enfermedades autoinmunes, así como para la terapia del trasplante.

Los científicos de Merck Sharpe & Dohme han demostrado que la margatoxina (otra toxina peptídica del escorpión) tiene un potente efecto como bloqueador del canal de Kv1.3 y es capaz de suprimir la respuesta inmune en un modelo animal (cerdo). Sin embargo, la margatoxina no es específica para los canales de Kv1.3, sino que también afecta al canal Kv1.2 con una potencia similar. Dado que el corazón y los tejidos del cerebro también expresan canales Kv1.2, su bloqueo podría tener graves efectos nocivos. Otro péptido aislado de anémoma de mar, ShK es un bloqueador potente de Kv1.3 (véase Kem *et al.*, 2000, patente US6.077.680), que también afecta a otros canales relacionados Kv1 pero concentraciones más de cien veces más altas son necesarias para un bloqueo similar. Esto significa que los canales están relacionados con > 100 veces menos sensibles a su aplicación, en comparación con Kv1.3. Los péptidos Vm23 y Vm24, objeto de la presente invención, son de un origen biológico distinto, tienen una estructura primaria muy diferente a la de ShK y son más específicos para canales hKv1.3 que ShK. Vm23 y Vm24 bloquean < 50 % de un par de otros canales de K cuando se aplica a una concentración de más de 3000 veces superior a lo que se necesita para bloquear la misma fracción de canales hKv1.3, tal como se muestra y se discute en detalle en los ejemplos a continuación (ejemplos 7 a 10).

La presente invención también comprende la producción de Vm23, Vm24 y sus análogos funcionales equivalentes por el método en fase sólida. Los procedimientos utilizados para la síntesis de sustancias químicas se incluyen una serie de protocolos bien conocidos para los expertos en el campo, tal como se detalla en la descripción del ejemplo 3.

20 *Caracterización electrofisiológica*

El desarrollo de una respuesta inmune eficaz contra antígenos foráneos o autoantígenos requiere la activación y proliferación de linfocitos específicos para un determinado antígeno. Esto requiere una interacción bien coordinada entre los distintos componentes celulares del sistema inmune. El primer paso en este proceso es la presentación de los antígenos procesados a los linfocitos por las células profesionales presentadoras de antígeno [Janeway *et al.*, 2001]. Dentro del objeto de la presente invención es la regulación de la respuesta inmune mediada por los linfocitos T (por ejemplo, hipersensibilidad tardía) por bloqueadores específicos para el canal de K activado por voltaje, Kv 1.3. Así pues, restringir la elaboración de la participación de los canales de K en la activación de los linfocitos T. Sin embargo, debemos mencionar que la proliferación de ciertos subconjuntos de linfocitos B también dependen de la actividad de los canales de Kv1.3. [Wulff *et al.*, 2004].

El reconocimiento del antígeno presentado por el receptor de antígeno de células T conduce a la activación, proliferación y diferenciación terminal de las células [Sallusto *et al.*, 2004]. Vías de serialización transmembrana desencadenada por el reconocimiento del antígeno incluyen la activación de varias proteínas quinasas y en consecuencia la de fosfolipasa C- γ (PLC- γ). La generación de inositol 1, 4,5-trifosfato (IP₃) por el PLC- γ mediada por la hidrólisis de los fosfolípidos de membrana fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP₂) inicia la señal bifásica de Ca²⁺ necesaria para comprometer la proliferación de las células T [Lewis, 2001]. IP₃ se difunde y se une a sus receptores en el retículo endoplásmico (RE), que resulta en la liberación de Ca²⁺ en el citosol y un aumento significativo en la concentración citosólica de calcio libre ([Ca²⁺]_i). El aumento transitorio de la [Ca²⁺]_j después de la liberación de RE no es suficiente para la ejecución de la cascada de transducción de señales, una señal sostenida de Ca²⁺ es necesaria. Esto se realiza por flujo de Ca²⁺ desde el espacio extracelular a través de canales de Ca²⁺ en la membrana plasmática a través de canales liberadores de calcio activados por Ca²⁺ (canales CRAC) [Zweifach y Lewis, 1993].

Aunque los canales CRAC son intrínsecamente independientes del voltaje, la corriente de Ca²⁺ es sensible al gradiente electroquímico de Ca²⁺, que es influido por el potencial de membrana de las células [Panyi *et al.*, 2004]. La entrada despolarizante de Ca²⁺ tiene que ser compensada por la activación de los canales de K para la fijación del potencial de membrana a valores negativos y por lo tanto, para proporcionar una fuerza motriz suficiente para la entrada de más Ca²⁺. [Fanger *et al.*, 2001]. La regulación selectiva, del eflujo de K⁺ es uno de los principales factores determinantes del potencial de membrana de los linfocitos T humanos, que es de alrededor de -50 a -60 mV. Dos tipos de canales de K conducen los flujos de salida de K⁺ en condiciones fisiológicas en estas células. El canal dominante es el canal de K activado por voltaje en los linfocitos T humanos, Kv1.3, se abre a la despolarización de la membrana con un umbral de activación cercano al potencial de reposo de las células [Matteson y Deutsch, 1984]. El canal de potasio activado por Ca²⁺ de los linfocitos T humanos, IKCa1 (o K_{Ca}3.1), se activa únicamente por el aumento de la concentración citosólica de calcio libre en -200 nM, independientemente del potencial de membrana [Grissmer *et al.*, 1993].

La contribución de Kv1.3 y canales IKCa1 al control potencial de membrana de las células T depende del estado de activación de las células (de reposo frente a activado) y su papel funcional en el sistema inmunológico determinado por el grado de diferenciación terminal de las células T [Wulff *et al.*, 2003], tal como se describe en detalle en la sección de Antecedentes de la invención. Desde el punto de aplicabilidad terapéutica de bloqueadores de Kv1.3 en las enfermedades autoinmunes, es importante destacar que la selectividad de los canales Kv1.3 a través de canales IKCa1 es de suma importancia [Wulff *et al.*, 2003]. Las células T efectoras de memoria (T_{EM}) que median la lesión tisular por ejemplo, en la esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diabetes tipo I, psoriasis autoinmunes, lupus eritematoso sistémico, colitis ulcerosa, enfermedad de oftalmía simpática y la reabsorción del hueso peridontal, selectivamente aumentan la expresión de los canales de Kv1.3 tras la activación, y, por tanto, el control del potencial

de membrana de estas células se rige únicamente por los canales de Kv1.3 [Beeton *et al.*, 2006] En consecuencia, la proliferación de estas células se puede suprimir de manera eficaz y persistente por inhibidores selectivos de Kv1.3 [Wulff *et al.*, 2003; Vennekamp *et al.*, 2004; Beeton *et al.*, 2005]. Por el contrario las células naïve y T de memoria central (T_{CM}) escapan de la inhibición de la proliferación mediada por el bloqueo de Kv1.3 [Wulff *et al.*, 2003], por regulación transcripcional por incrementos de IKCa1 [Ghanshani *et al.*, 2000]. La proliferación de estas células preactivadas se vuelve sensible a los inhibidores de IKCa1, pero no a los inhibidores de la Kv1.3. Así, una terapia basada en Kv1.3 que suprime la activación de células T_{EM} sin deterioro significativo de la proliferación de las células naïve y T_{CM} podría utilizarse en el tratamiento de enfermedades autoinmunes, en particular las enfermedades autoinmunes asociadas a linfocitos T_{EM}, tales como diabetes tipo I [Viglietta *et al.*, 2002; Beeton *et al.*, 2006], la artritis reumatoide [Beeton *et al.*, 2006], la esclerosis múltiple, la reabsorción ósea en la enfermedad periodontal inflamatoria experimental [Valverde *et al.*, 2004] y las condiciones asociadas al rechazo de órganos, tales como el rechazo crónico del injerto y del injerto frente a huésped que se proponen es sostenido por células T_{EM} crónicamente activadas [Yamashita *et al.*, 2004].

15 *Evaluación de la selectividad*

Algunos péptidos bloqueadores de Kv1.3 de alta afinidad son selectivos para Kv1.3 sobre IKCa1, al igual que Vm24. Estos incluyen las toxinas de alacrán, por ejemplo, Margatoxina (MgTx), Noxiustoxina (NTX), Kaliotoxina, Anurotoxina y la toxina ShK aislado de anémona de mar. Sin embargo, los canales iónicos importantes en la excitabilidad neuronal y muscular también son inhibidos por estas toxinas con afinidades nanomolar-picomolar, por ejemplo, Kv1.1 por ShK [Kalman *et al.*, 1998] y Kaliotoxin [Grissmer *et al.*, 1994], mientras que Kv1.2 es bloqueado por MgTx [Koch *et al.*, 1997], Ntx [Grissmer *et al.*, 1994] y Anuroctoxin [Bagdany *et al.*, 2005].

La falta de especificidad de las toxinas impone la posibilidad de importantes efectos biológicos. Los canales iónicos de la familia Kv están ampliamente distribuidos en células clásicamente excitables y en células no excitables (véase [Gutman *et al.*, 2005] para una revisión completa). En las neuronas, las células del músculo esquelético y cardíaco estos canales son determinantes críticos de la excitabilidad eléctrica. Contribuyen al mantenimiento del potencial de membrana en reposo, la conformación de los potenciales de acción, por influencia en el ritmo de la repolarización, y determinan la frecuencia de los picos después de la hiperpolarización neuronal (véase [Gutman *et al.*, 2005] para una revisión general). Los canales iónicos que se expresan en el sistema nervioso central están más protegidos contra las toxinas aplicadas sistemáticamente, debido a la barrera hematoencefálica, sin embargo, en la esclerosis múltiple, que es un área de aplicación potencial de los inhibidores Kv1.3, esta barrera se ve comprometida lo que lleva a la toxicidad neuronal en modelos animales de EM [Beeton *et al.*, 2005]. Debido al contacto directo de las células con el flujo de la sangre los miocitos cardíacos son más susceptibles a los efectos secundarios potenciales de un inhibidor no selectivo de Kv1.3. Los canales que determinan críticamente la fase de repolarización del potencial de acción, en los miocitos humanos de la aurícula Kv1.5: [Feng *et al.*, 1997], y en los miocitos del ventrículo Kv1.4 [Patel y Campbell, 2005] y hERG (revisado en [Sanguinetti y Tristani-Firouzi, 2006]) mientras que NaV1.5 es responsable de la fase de despolarización [Rogart *et al.*, 1989]. Los canales BK canales de K activados por Ca²⁺ están presentes en el cuerpo humano (cerebro, músculo esquelético, el músculo liso, las células de los islotes pancreáticos, etc., revisado en [Wei *et al.*, 2005]) y regulan una variedad de funciones fisiológicas incluyendo la excitabilidad eléctrica de las neuronas y las células del músculo esquelético y transitorios de Ca en el músculo liso. Los canales BK son bloqueados por las toxinas de la familia α -KTx1. X (por ejemplo, caribdoxin [Miller *et al.*, 1985]).

La disponibilidad la estructura cristalográfica de rayos X de un canal de K de una bacteria [Doyle *et al.*, 1998] y un canal de K activado por voltaje humano [Long *et al.*, 2005] amplía considerablemente nuestra comprensión de las bases moleculares de la especificidad de α -KTx para diferentes canales iónicos en la última década [Giangiacoimo *et al.*, 2004], sin embargo, hasta la fecha, la predicción de la selectividad, el perfil de una toxina peptídica determinada, basándose en su estructura primaria no es posible. Esto corrobora la determinación experimental de la selectividad de Vm24 en contra los canales iónicos con importancia biológica y conocida susceptibilidad al bloqueo por toxinas de origen animal.

El avance de la biología molecular y la donación de los genes de los canales iónicos permiten llevar a cabo los estudios farmacológicos en los canales iónicos recombinantes. La expresión de los canales recombinantes en líneas celulares adecuadas ofrece varias ventajas para los experimentos farmacológicos, por ejemplo, la magnitud de la contaminación de las corrientes es despreciable y la amplitud de las corrientes es adecuada para los ensayos farmacológicos. Además, los canales recombinantes expresados mantienen las características farmacológicas de los canales expresados en las células de origen.

60 *Composiciones farmacéuticas*

La invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden los péptidos de la presente invención. Como ya se mencionó, estos péptidos son útiles para la supresión de una respuesta inmune en un mamífero, en el que se activa un subconjunto específico de células-T. En particular, las composiciones farmacéuticas que comprenden los péptidos de la presente invención son útiles para tratar o prevenir una condición en la que la respuesta inmune es el resultado del rechazo de órganos heterólogos (por ejemplo, un corazón, un pulmón, un hígado, un riñón o un páncreas) o el resultado de una enfermedad autoinmune asociada a los linfocitos T_{EM}.

En un aspecto preferido de la invención, las composiciones farmacéuticas comprenden los péptidos de la presente invención o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. La forma preferida de estas composiciones farmacéuticas y de la selección del vehículo farmacéuticamente aceptable dependerá de la modalidad prevista de administración y aplicación terapéutica. Las composiciones farmacéuticas son (dependiendo de la formulación deseada) farmacéuticamente aceptables, los vehículos no tóxicos o disolvente, que se definen como los vehículos comúnmente utilizados para formular composiciones farmacéuticas para la administración en animales o humanos. Además, y opcionalmente, las composiciones farmacéuticas también podrán incluir, al menos, un agente inmunosupresor adicional, que puede tener un efecto complementario en el tratamiento. Algunos agentes inmunosupresores ilustrativos son ciclosporina, rapamicina, azatioprina, prednisona, la toxina ShK, derivados de ShK y desoxispergualina, sus derivados, o una sal del mismo. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden ser administradas tal como se indica a continuación.

Métodos terapéuticos y profilácticos

La presente invención proporciona composiciones para su uso en métodos para el tratamiento terapéutico o profiláctico de las condiciones en que se requiere la supresión de una respuesta inmune en un mamífero, especialmente cuando las células T se activan en sujetos con la necesidad de dicho tratamiento, en el que se dijo que las condiciones incluyen el rechazo de órganos heterólogos (por ejemplo, un corazón, un pulmón, un hígado, un riñón o un páncreas) o enfermedades autoinmunes (por ejemplo, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diabetes tipo I, psoriasis autoinmunes, lupus eritematoso sistémico, colitis ulcerosa, oftalmia simpática y la reabsorción ósea la enfermedad periodontal). Estos sujetos pueden incluir los seres humanos y otros mamíferos, tales como perros, gatos, cabras, vacas, caballos, cerdos, ovejas, por mencionar algunos de ellos. En un aspecto, la presente invención proporciona composiciones para su uso en métodos para el tratamiento profiláctico o terapéutico de las condiciones que se pueden tratar por que responda a, o sea sensible a la inhibición de los canales de potasio Kv1.3 en las membranas celulares de las células T de los sujetos necesitados de tal tratamiento. Estos métodos incluyen la administración a un sujeto, incluyendo un ser humano, que necesite este tratamiento, una cantidad eficaz de un péptido de la presente invención tal como se describe anteriormente. Generalmente, este péptido puede comprender los péptidos Vm24 con una secuencia SEQ ID NO: 1, Vm23 con SEQ ID NO: 2 o un péptido con una secuencia SEQ ID NO: 3, o su análogos funcionales equivalentes o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En una realización preferida, la presente invención proporciona composiciones para su uso en métodos específicamente dirigidos al tratamiento y la prevención de las enfermedades autoinmunes asociadas con activación de células T, o responda a la inhibición de los canales de potasio Kv1.3. Estas enfermedades autoinmunes incluyen pero no están limitados a la esclerosis múltiple, artritis reumatoide, la diabetes tipo I, psoriasis autoinmunes, lupus eritematoso sistémico, colitis ulcerosa, enfermedad de oftalmia simpática y la reabsorción del hueso periodontal. Estos métodos incluyen la administración a un sujeto en la necesidad de ellos, incluyendo un sujeto humano, una cantidad eficaz de un péptido de la presente invención tal como se describe anteriormente.

En otra realización preferida, la presente invención proporciona composiciones para su uso en métodos específicamente dirigidos a tratar y prevenir el rechazo de un órgano heterólogos (por ejemplo, un corazón, un pulmón, un hígado, un riñón o un páncreas). Estos métodos incluyen la administración a un sujeto en la necesidad de los mismos (es decir, un sujeto que se recibe o ha recibido un trasplante de órganos), como un ser humano, una cantidad eficaz de un péptido de la presente invención tal como se describe anteriormente.

Dosis y métodos de administración

En aplicaciones terapéuticas, un péptido de la invención adecuado para la administración a un sujeto que ya sufre de una enfermedad o una situación indeseable (por ejemplo, enfermedades autoinmunes o el rechazo de órganos heterólogos, respectivamente), en una cantidad suficiente para tratar, curar, detener parcialmente o detectablemente retardar la progresión de la enfermedad y sus complicaciones. La cantidad de un péptido de la invención efectiva para su utilización en aplicaciones terapéuticas dependerá de la severidad de la condición, el estado general del sujeto, y la vía de administración. La cantidad efectiva del péptido en aplicaciones terapéuticas en general, estará dentro de un rango de alrededor de 0,1 microgramos de péptido por kilogramo a alrededor de 10 microgramos de péptido por kilogramo (o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo) por dosis.

En las aplicaciones profilácticas, los péptidos o composiciones farmacéuticas objeto de los mismos adecuados para la administración a los sujetos con riesgo de, pero que no sufren ya una enfermedad o una condición no deseada. La cantidad efectiva de péptidos adecuados para la administración dependerá del estado de salud del sujeto y el estado general del sistema inmunológico. La cantidad efectiva del péptido para su uso en las aplicaciones profilácticas estará generalmente dentro de un rango de alrededor de 0,1 microgramos por kilogramo a alrededor de 10 microgramos por kilogramo del péptido por dosis.

La vía adecuada de administración de los péptidos y las composiciones farmacéuticas de la presente invención está determinada por la enfermedad o indicación clínica y el sitio en el que se requiere de tratamiento. Para un cierto tipo de enfermedad, limitadas a un área restringida del cuerpo, puede ser conveniente que se aplique el péptido o la composición de estos, en el sitio local (uso tópico). Como alternativa, con la progresión de la enfermedad o

simultáneamente a la aplicación tópica podría ser conveniente administrar el péptido o la composición sistémicamente.

5 Para otras indicaciones, los péptidos y las composiciones farmacéuticas de la invención pueden ser adecuados para la administración por inyección intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intranasal, y la intradérmica, así como mediante la instilación intrabronquial (por ejemplo, mediante un nebulizador), y transmucosa, sistémica, transdérmica (por ejemplo, con un vehículo soluble en lípidos en un parche de piel), oral, y la administración gastrointestinal (por ejemplo, con una cápsula o comprimido).

10 Uno o varios péptidos de la invención pueden ser adecuados para la administración en terapia de combinación. Por ejemplo, uno o más péptidos objeto pueden ser adecuados para la administración en combinación con otro agente inmunosupresor (como los arriba mencionados) a un sujeto con necesidad de tratamiento. Existen algunas enfermedades autoinmunes idiopáticas, tales como púrpura trombocitopénica inmune [Cooper y Bussel, 2006] o el síndrome linfoproliferativo autoinmune [Oren *et al*, 2002], en el que el tratamiento podría requerir un enfoque multiblanco, por lo tanto más de una sustancia inmunosupresora es necesario.

15 Los péptidos de la invención pueden ser adecuados para la administración, solos o en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable tal como se describe anteriormente en la sección "Composiciones Farmacéuticas". Los péptidos pueden ser adecuados para la administración en dosis única o múltiple. Vehículos farmacéuticos adecuados incluyen sólidos inertes diluyentes o rellenos, soluciones acuosas estériles, y diferentes disolventes orgánicos no tóxicos. Las composiciones farmacéuticas formadas por la combinación de un péptido objeto con un vehículo farmacéuticamente aceptable pueden ser fácilmente adecuadas para la administración en una variedad de formas de dosificación como comprimidos, pastillas para chupar, jarabes, soluciones inyectables, etc. Si se desea, el vehículo farmacéutico puede contener ingredientes adicionales, tales como saborizantes, aglutinantes, excipientes, etc.

20 Para administración oral, los comprimidos contienen excipientes distintos, como el citrato de sodio, carbonato de calcio y fosfato de calcio, puede ser utilizado junto con disgregantes diversos, como el almidón, preferiblemente almidón de patata o almidón de tapioca, ácido algínico, y algunos silicatos complejos, junto con aglutinantes, como polivinilpirrolidona, sacarosa, gelatina, y la acacia. Agentes lubricantes, tales como estearato de magnesio, lauril sulfato de sodio, y talco también se añaden a las tabletas para estos fines. Composiciones sólidas de un tipo similar también pueden ser empleadas como material de relleno de cápsulas de gelatina. Los materiales preferidos para este propósito incluyen la lactosa o azúcar de la leche y polietilenglicol de alto peso molecular. Cuando se desean las suspensiones acuosas de los elixires para la administración oral, el ingrediente esencial, el péptido activo, se puede combinar con diferentes agentes edulcorantes o saborizantes, materiales coloridos o tintes, y, si se desea, se puede emulsionar o suspender, junto con diluyentes, como el agua, el etanol, propilenglicol, glicerina, y sus combinaciones.

30 Las soluciones de los péptidos de la presente invención son adecuadas para la administración por vía parenteral, por ejemplo en aceite de sésamo o de maní o en polipropilenglicol acuoso, así como en la forma de soluciones salinas acuosas estériles de los metales solubles en agua correspondientes a las sales farmacéuticamente aceptables descritas anteriormente. Estas soluciones acuosas deben ser debidamente amortiguadas si es necesario, y el líquido diluyente hacerse isotónico primero con suficiente solución salina o con glucosa. Estas soluciones acuosas en particular, son especialmente adecuadas para inyección por vía intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal. Los medios acuosos estériles empleados son fáciles de obtener con las técnicas estándar bien conocidas por los expertos en la materia. Además, los compuestos mencionados pueden ser adecuados para administrarse por vía tópica (por ejemplo, a través de un catéter colocado), mediante una solución adecuada para el propósito particular.

50 *Vm23, Vm24 y análogos funcionales equivalentes como sondas moleculares*

Junto al uso terapéutico de los péptidos de la presente invención, estos péptidos podrían ser usados para detectar y caracterizar el nivel de expresión de canales Kv1.3 en una amplia variedad de células, o bien obtenidos a partir de tejidos animales o cultivos estables. La importancia de caracterizar la expresión de Kv1.3 en las células T ya se ha puesto de relieve en este documento, por lo tanto la presente invención se refiere también a la utilización de los péptidos de la presente invención como sondas moleculares para caracterizar fisiológicamente las células que expresan el canal Kv1.3. La detección y caracterización de la expresión de Kv1.3 se puede hacer utilizando varias técnicas de detección de los péptidos de la presente invención debidamente marcados, incluyendo pero sin limitarse a: citometría de flujo, microscopía confocal y de fluorescencia convencional, la emisión de fluorescencia total, técnicas de unión radiactiva y de desplazamiento y ensayos inmunológicos de "pull-down". La determinación cuantitativa de canales Kv1.3 expresados en una célula se puede realizar mediante técnicas de detección cuantitativa, incluyendo pero sin limitarse a: recuento de canales por microscopía láser confocal, inmunodetección, unión radiactiva y técnicas de desplazamiento. Por otra parte, las modificaciones químicas de la cadena de polipéptidos o cadenas laterales de algunos aminoácidos no esenciales podría proporcionar la marca de los análogos funcionales equivalentes que podrían ser utilizados para la detección y cuantificación de los canales Kv 1.3. A su vez, estos análogos funcionales equivalentes podrían utilizarse como sondas moleculares para la

búsqueda de ligandos específicos, la prestación de estos nuevos ligandos comparten el mismo lugar de unión en Kv1.3 como Vm23, Vm24 y sus análogos funcionales equivalentes. Cualquier modificación química debería dejar sin modificar los determinantes estructurales de Vm23, Vm24 y sus análogos funcionales equivalentes que les confieren una alta afinidad y especificidad a Kv1.3. Modificación química de las cadenas polipeptídicas es un procedimiento común para la obtención de sondas moleculares útiles, que se puede conseguir por varios métodos ampliamente disponibles y es utilizado regularmente por los expertos en este campo. La marca a la modificación podría incluir, pero sin limitarse a, un isótopo radioactivo, una marca fluorescente, quimioluminiscente o cromogénica y entrecruzar o fusionar con las proteínas de marca (anticuerpos, biotina, la proteína verde fluorescente o sus derivados).

En los ejemplos siguientes se describe en detalle como estos nuevos péptidos de la presente invención, se aislaron, purificado y caracterizado químicamente. La síntesis de un péptido ejemplar, Vm24, se describe, y la acción selectiva de los dos péptidos ejemplar de la presente invención (Vm23 y Vm24) en canales Kv1.3 de linfocitos T humanos se describe completamente. Por último, también se describe la acción protectora de Vm24, en baja concentración en el ensayo *in vivo* de DTH de respuesta en las ratas.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar realizaciones preferidas típicas de la invención. Si los productos finales incluyen las secuencias que se muestran aquí (SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3) o sus análogos funcionales equivalentes, están obligados a reproducir los mismos resultados que los aquí descritos y por lo tanto se espera funcionar bien en la práctica de la invención reivindicada aquí.

Ejemplo 1. Aislamiento, pruebas de letalidad en ratones y determinación de la estructura primaria de Vm23 y Vm24

Todos los disolventes y productos químicos utilizados fueron de grado analítico y agua bidestilada se utiliza en todo el procedimiento como antes descrito. [Batista *et al.*, 2007].

Procedimientos de aislamiento

Los procedimientos utilizados para el aislamiento de los diferentes ligandos naturales mencionados anteriormente hacen uso de técnicas cromatográficas. El veneno fue disuelto en agua y se centrifugó a 10.000 x g durante 5 min. El sobrenadante se recuperó y se separó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). Cien microlitros conteniendo 1,0 miligramos de la proteína del veneno soluble se aplicó a una columna Cis de fase inversa (dimensiones 10 x 250 mm, número de catálogo 238TP) obtenidos de Vydac (Hisperia, CA, EE.UU.), en un sistema de HPLC (del Milenio Millipore, Milford, MA). Componentes fueron purificados mediante un gradiente lineal de la solución A (ácido trifluoroacético 0,12 % - TFA en agua) a 60 % de solución B (0,10 % TFA en acetonitrilo), con una duración de 60 min. La detección fue supervisada por absorbancia a 230 nm y eluida a un flujo de 1 ml / min. Las fracciones se recogieron de forma manual y se secaron en un concentrador Savant Speed Vac. Tal como se muestra en Figura 1, más de 80 fracciones distintas se obtuvieron de esta separación de HPLC. Las fracciones que eluyen con tiempo de retención entre 20 a 35 minutos por lo general corresponden a los tiempos de elución de muchas toxinas de alacrán específicas para canales de K en otros venenos estudiados [Batista *et al.*, 2007]. Por esta razón, se prestó especial atención a los componentes del veneno que eluyen en estos tiempos. En concreto, dos fracciones: una eluyendo a los 23 y otra a los 24 minutos fueron analizadas más detalladamente, porque la determinación de la espectrometría de masas de los péptidos de estos tiempos de elución estaba estrechamente relacionada con los valores encontrados para otras toxinas conocidas específicas para canales de K, es decir, tienen masas moleculares de alrededor de 4.000 Dalton. Dado que estos componentes no eran todavía homogéneos, una segunda cromatografía se llevó a cabo utilizando el mismo sistema HPLC, pero con un gradiente de elución distinto (solvente A a 40 % de solvente B durante 60 minutos, utilizando una columna de C₁₈, número de catálogo 218TP54 de Vydac, Hisperia CA). Tal como se muestra en las inserciones de la Figura 1, un componente importante fue aislado de cada una de estas fracciones iniciales (marcado con un asterisco). La inserción de la izquierda corresponde a la fracción eluida a 23 minutos y la de la derecha a la fracción eluida a 24 min. Según el análisis por espectrometría de masas y la determinación de la secuencia por degradación automática de Edman ambos péptidos se consideraron homogéneos. La fracción eluida a los 24 min. en condiciones experimentales de la presente invención se analizó en primer lugar. Era pura y mostró una masa molecular de 3.864 unidades de masa atómica (u.m.a). En este documento se utilizan indistintamente u.m.a o Dalton (abreviado Da) para la designación de una unidad de masa molecular. Por esta razón el péptido fue nombrado Vm24, que significa péptidos del veneno de *V. mexicanus* que eluye a los 24 min. en condiciones experimentales de la presente invención. El cromatograma mostrado en la inserción del lado izquierdo (Figura 1) corresponde a la separación del péptido llamado Vm23. Es sinónimo de péptidos del veneno de *V. mexicanus* que eluye a los 23 min. La masa molecular experimental de este componente se determinó en 3665 Da.

Determinación in vivo de la toxicidad del veneno completo de V. mexicanus y pruebas de letalidad de Vm23 y Vm24

El efecto de los venenos y los péptidos puros es generalmente realizado en el laboratorio utilizando al menos tres modelos biológicos: los mamíferos, los grillos y crustáceos, ya que se sabe que el veneno de alacrán contiene

toxinas específicas frente a especies. Hay toxinas específicas para los mamíferos o para los diferentes tipos de artrópodos (revisado en [Possani *et al.*, 1999]). A los efectos de la presente invención se realizaron experimentos con ratones como el modelo animal, porque los resultados serían una indicación fiable de lo que podría ocurrir con los seres humanos en contacto con el veneno o las toxinas purificadas. Los ratones inyectados con diferentes cantidades de veneno soluble (50 a 200 microgramos de proteínas por ratón de 20 gramos de peso corporal) de *V. mexicanus* no mostraron síntomas de intoxicación. Normalmente, si el veneno contiene toxinas a seres humanos con estas cantidades de material se habrían visto síntomas clásicos de intoxicación, como la excitabilidad, salivación, dificultad respiratoria (disnea), parálisis de extremidades posteriores, diarrea, convulsiones, o incluso la muerte [Possani *et al.*, 1985]. Se dice que el péptido es “tóxico” si el animal inyectado presenta cualquiera de los síntomas anteriores, pero se recupera en 24 horas tras la administración del péptido, mientras que si el ratón muere se llama “letal”. Los componentes no tóxicos son los que no inducen síntomas de intoxicación y producen un comportamiento similar al de los ratones inyectados con PBS-solución salina, pH 7,2 [Possani *et al.*, 1985]. Eventualmente, el veneno completo a dosis relativamente bajas no es tóxico, pero péptidos purificados a dosis similares pueden producir los síntomas de la intoxicación, ya que durante la purificación de la muestra se enriquece en ese componente en particular. Por ello, y teniendo en cuenta que el veneno soluble de *V. mexicanus* no era tóxico a 200 microgramos / 20 gramos de peso del ratón, el péptido Vm24 puro se inyectó en ratones a diferentes concentraciones. La dosis máxima utilizada fue de 200 microgramo/ 20 gramos, es decir: 10.000 mg / Kg. de peso del ratón y no se observaron síntomas de intoxicación.

Esto está, sin duda, en contraste con los componentes letales, como la toxina Cn2, purificada de otro alacrán mexicano *Centruroides noxius*. La dosis letal cincuenta (DL50, es decir, la dosis que causa una mortandad del 50 % en un grupo de animales sometidos a ensayo) para Cn2 en ratones es de 0,25 microgramos/ 20 gramos de peso de ratón [Zamudio *et al.*, 1992]. Esto significa que Vm24 en 800 veces mayor concentración de proteínas no es tóxico para los ratones, mientras que Cn2 mata a la mitad de la población.

Determinación de la secuencia de aminoácidos de Vm23 y Vm24

Se aplicaron dos técnicas: la degradación automática de Edman y análisis de espectrometría de masas (EM) La determinación directa de la secuencia de aminoácidos de la toxina pura se realizó con un Secuenciador de proteínas Beckman LF 3000 (Palo Alto, California, EE.UU.) con los productos químicos y procedimientos previstos por la empresa. Una muestra reducida y alquilada del péptido puro se rompió enzimáticamente con Arg-C endopeptidasa (Roche Diagnostics, Basilea, Suiza), utilizando procedimientos similares a los descritos anteriormente para los componentes de otros alacranes [Valdez *et al.*, 2004, Batista *et al.*, 2007; Diego-García *et al.*, 2007]. Los péptidos correspondientes fueron purificados por HPLC y secuenciados. Para el análisis de espectrometría de masas las muestras se aplican directamente en la trampa de iones de un espectrómetro de masas Finnigan LCQDUO (San José, CA) utilizando un sistema de entrega de bomba de jeringa Surveyor MS. El eluato a 10 microlitros / min. se dividió a fin de que sólo el 5 % de la muestra entre en la fuente del nanopulverizador (0,5 microlitros / min.). El voltaje del pulverizador se fijó en 1,7 kV y la temperatura del capilar a 130 °C. Para los experimentos de EM / EM, la fuente de fragmentación fue operada con 25 V de energía de colisión, 35-45 % (unidades arbitrarias) de energía de colisión normalizada y la exploración con banda ancha activada. Todos los espectros fueron obtenidos en el modo de iones positivos. La adquisición de datos y la deconvolución de los datos se realizó con el programa Xcalibur en el sistema Windows NT-PC. Los espectros EM / EM de los péptidos generados enzimáticamente se analizaron de forma manual y con el programa Sequest [Batista *et al.*, 2007].

Se determinaron las estructuras primarias de ambos péptidos Vm23 y Vm24 (véase la Figura 2), y los péptidos fueron utilizados en los experimentos electrofisiológicos, tal como se describe a continuación (véanse los ejemplos 7 a 10 adjuntos de la presente invención). El nuevo péptido nativo purificado de la fracción de elución a 23 min. (véase el recuadro a la izquierda en la Figura 1) fue completamente caracterizado. Su masa molecular experimental se encontró ser de 3665 Da. Un nanomol de este péptido se cargó en el secuenciador y los primeros 34 aminoácidos fueron identificados directamente por la degradación de Edman (subrayado Directo). Los residuos de cisteína fueron confirmados por la reducción y alquilación, utilizando la metodología dada por la empresa (Beckman). El último residuo de Vm23 en la posición 35 se determina por espectrometría de masas. La masa molecular promedio teórica esperada basada en la secuencia determinada es de 3.665,51 Da, lo que confirma la determinación inequívoca de la secuencia completa. Tanto la determinación experimental y la masa molecular teórica esperada fueron las mismas, con el error de los aparatos utilizados (espectrómetro de masas LCQ^{Duo} de trampa de iones de Finnigan).

Asimismo, un nanomol del péptido Vm24 homogénea (repurificado tal como se muestra en el recuadro a la derecha de la Figura 1) fue sometido a la degradación automática de Edman, que permitió la identificación de los primeros 28 residuos de aminoácidos (Figura 2, marcado Vm24). El análisis llevado a cabo con diferentes alícuotas del péptido reducido y alquilado fue utilizado para la confirmación de los residuos de cisteína y para la digestión con endopeptidasas. La digestión de Vm24 con Arg C-endopeptidasa produce tres sub-péptidos, lo que confirmó la secuencia de los residuos de Ala1 a Arg17 (no se indica en la Figura 2, ya que comprende la misma secuencia N-terminal ya determinada cuando se analizó el péptido nativo, subrayado “directo”), otro de Ala8 a Arg29 indicado por la marca “Arg-CI”, y el último de Lys30 a Cys36 (subrayado Arg-C2). Estas secuencias fueron obtenidos por degradación de Edman, en combinación con fragmentación de EM / EM (véase la Figura 2, Vm24). Dado que los residuos últimos fueron identificados por CID (fragmentación inducida por colisión), los aminoácidos en las

posiciones 30 y 32 podrían haber sido la lisina o la glutamina (misma masa molecular). A fin de resolver la ambigüedad se llevo a cabo de una hidrólisis enzimática adicional de este último sub-péptido con tripsinas. Tres pequeños péptidos se separaron por HPLC, cuyas secuencias de aminoácidos se determinaron por CID y fueron identificados como los correspondientes a las posiciones Cys26 a Lys30 (subrayado Trp 1), Cys26 a Lys32 (no se indica, para la simplificación de la notación) y Cys33 a Cys36 (tampoco se indica). Dado que la tripsina rompe el enlace peptídico en el C-terminal de lisinas, estas dos posiciones fueron asignadas a ser residuos de lisina, resolviendo de forma inequívoca la secuencia completa. Los últimos cuatro aminoácidos en el C-terminal también fueron identificados por fragmentación EM / EM de un péptido aislado después de la hidrólisis con endoproteasa LysC (marcado como Lys-C). El promedio teórico de la masa molecular esperada del péptido, suponiendo un aminoácido C-terminal amidado fue 3863,64 Da y el valor encontrado experimentalmente fue 3.864,0 Da, lo que confirma la secuencia completa. Dado que la exactitud de la trampa de iones tridimensional está en el rango de 100 ppm para los péptidos menores de 1.000.Da, la pequeña diferencia de 0,36 unidades está dentro del valor esperado (para referencia. en la precisión del equipo véase [Aebersold y Goodlett, 2001]).

15 Relevante para la presente invención es importante resaltar cinco características de Vm23 y Vm24:

1) Las estructuras primarias en comparación con las otras toxinas de alacrán conocidas hasta la fecha tienen más de 50 % de diferencia (véase el ejemplo 6). Este hecho justifica la existencia de una nueva sub-familia (desconocida hasta hoy), aquí se propone la α -KTx número 21; ejemplos α -KTx21.1 y α -KTx21.2. Se trata de una revelación original y definitivamente demuestra que ambos péptidos son estructuralmente diferentes de los otros ligandos, incluidos los de anémoma de mar, de abejas y los péptidos de venenos de serpiente.

2) Los segmentos N-terminal de ambas secuencias hasta el aminoácido en la posición 10 son idénticas y 7 de las 8 cisteínas que mantienen los puentes disulfuro se encuentran en lugares idénticos de la estructura primaria. La octava cisteína (C8) de Vm23 se encuentra en la posición 35, en el extremo de la parte C-terminal, un aminoácido anterior en comparación con Vm24. Por esta razón Vm24 tiene 36 residuos, mientras que Vm23 tiene 3,5 residuos de aminoácidos. La última cisteína de Vm2.3 es no amidada, pero suponemos que el plegamiento estructural es el mismo que el de Vm24. Dado que los efectos fisiológicos de los dos Vm23 y Vm24 son comparables, se espera que la secuencia de aminoácidos en la región N-terminal sea crucial para la actividad. Al comparar las estructuras primarias de Vm23 y Vm24 cinco diferencias se encuentran en las posiciones: 10, 13, 17, 23 y 29, y un indel entre el penúltimo y último aminoácido (Y34 en Vm23 y Y35 en Vm24). La región más variable está en la parte central de ambos péptidos (residuos de 10 a 30, en la que se encuentran cinco de las seis diferencias), sugiriendo que posiblemente estos residuos no son tan críticos para la función de cualquiera de los péptidos. Cabe mencionar que las sustituciones en las posiciones 17 (R / K), 23 (N / S) y 29 (R / K) son modificaciones conservativas, porque tanto la arginina (R) como la lisina (K) son aminoácidos básicos cargados, mientras que las asparaginas (N) y la serina (S) son residuos de aminoácidos hidrófilos no cargados. La falta de tirosina en la posición 35 (sustituída por una cisteína en Vm23) en comparación con Vm24, sugiere que sólo una tirosina es suficiente para el mismo plegado y la función de ambos péptidos.

3) La región más variable se sitúa en la parte central, permitiendo una sustitución conservativa. Esto puede ser fácilmente diseñado por un experto en la materia, y las modificaciones o sustituciones de aminoácidos con propiedades físico-químicas similares en posiciones alineadas que comparten al menos un 83 % de identidad de las secuencias pares (tal como se muestra aquí para el caso de Vm23 y Vm24) se espera que generen un análogo funcional equivalente con propiedades similares, y por lo tanto deben incluirse en el ámbito de aplicación de la presente invención.

4) La característica más importante, sin embargo, tal como se muestra y se discute en los ejemplos de 7 a 10 a continuación, es la gran afinidad que tanto Vm23 y Vm24 tienen hacia los canales hKv1.3, en comparación con otros sub-tipos de canales de potasio. Vm23 y Vm24 tienen mayor afinidad hacia hKv1.3 que los otros bloqueadores conocidos, como Caribdotoxina, Anuroctoxin, BgK, ShK, etc. [Panyi *et al.*, 2006]. Los otros bloqueadores mencionados anteriormente tienen muy distintas secuencias de aminoácidos y / o puentes de disulfuro, o muestran una diferente especificidad de acción y afinidad de unión hacia los canales Kv1.3. Del simple análisis de las estructuras primarias de Vm23 y Vm24 no es obvio que deban afectar a los canales Kv1.3 de manera similar a la mostrada por otras toxinas de alacrán o de anémoma de mar. De este modo, las secuencias para las cuales la propiedad de la información y el uso se reivindica aquí para Vm23 y Vm24 no podían ser evidentes a partir del conocimiento de otros péptidos que afectan los canales Kv1.3. La presente invención reporta secuencias de aminoácidos completamente distintas y novedosas (véase SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ED NO: 3). Otras pruebas que muestran que la secuencia determinada es correcta proviene de los resultados obtenidos con Vm24 preparada sintéticamente. Tanto Vm24 nativa como Vm24 preparada sintéticamente tienen exactamente las mismas acciones fisiológicas, tal como se muestra a continuación (ejemplo 9).

5) Por último, otro hecho importante que se encuentra con estos dos péptidos es que no son tóxicos cuando se inyectan en animales de experimentación, en una concentración relativamente alta (hasta 10.000

microgramos por cada 20 gramos de peso del ratón). Esto es más significativo cuando se compara con otras toxinas de veneno de alacrán conocidas, por ejemplo, Cn2 de *Centruroides noxius*, tal como se mencionó anteriormente [Zamudio *et al.*, 1992]. Cn2 inyectada en ratones en alrededor de 800 veces menor dosis que la dosis de Vm24 que causa una mortalidad del 50 %.

5

Ejemplo 2: Análisis “mass finger print” de los componentes presentes en el veneno de *V. mexicanus*

Los venenos de alacrán son una mezcla muy compleja de componentes, conteniendo cadenas peptídicas cortas y largas activas sobre canales iónicos (revisado en [Possani y Rodriguez Vega, 2006]), aminas libres, nucleótidos, carbohidratos, lípidos (revisado en Possani *et al.*, 1999), enzimas como fosfolipasas [Zamudio *et al.*, 1997, Valdez *et al.*, 2004], y hialuronidasas y lisozimas [Batista *et al.*, 2007] y muchos otros compuestos proteicos de función desconocida [Diego-Garcia *et al.*, 2007]. Además, los alacranes son criaturas muy antiguas, con más de trescientos millones de años de evolución en la superficie de la Tierra y han tenido tiempo para seleccionar las herramientas específicas para la caza de sus presas o para defenderse de los depredadores. Por estas razones, es atractivo e inteligente buscar la presencia de componentes biológicamente activos, en sus venenos. Gracias a los recientes en comparación con otros sub-tipos de canales de potasio. Vm23 y Vm24 tienen mayor afinidad hacia hKv1.3 que los otros bloqueadores conocidos, como Caribdotoxina, Anuroctoxin, BgK, ShK, etc. [Panyi *et al.*, 2006]. Los otros bloqueadores mencionados anteriormente tienen muy distintas secuencias de aminoácidos y / o puentes de disulfuro, o muestran una diferente especificidad de acción y afinidad de unión hacia los canales Kv1.3. Del simple análisis de las estructuras primarias de Vm23 y Vm24 no es obvio que deban afectar a los canales Kv1.3 de manera similar a la mostrada por otras toxinas de alacrán o de anémoma de mar. De este modo, las secuencias para las cuales la propiedad de la información y el uso se reivindica aquí para Vm23 y Vm24 no podían ser evidentes a partir del conocimiento de otros péptidos que afectan los canales Kv1.3. La presente invención reporta secuencias de aminoácidos completamente distintas y novedosas (véase SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ED NO: 3). Otras pruebas que muestran que la secuencia determinada es correcta proviene de los resultados obtenidos con Vm24 preparada sintéticamente. Tanto Vm24 nativa como Vm24 preparada sintéticamente tienen exactamente las mismas acciones fisiológicas, tal como se muestra a continuación (ejemplo 9).

30

5) Por último, otro hecho importante que se encuentra con estos dos péptidos es que no son tóxicos cuando se inyectan en animales de experimentación, en una concentración relativamente alta (hasta 10.000 microgramos por cada 20 gramos de peso del ratón). Esto es más significativo cuando se compara con otras toxinas de veneno de alacrán conocidas, por ejemplo, Cn2 de *Centruroides noxius*, tal como se mencionó anteriormente [Zamudio *et al.*, 1992]. Cn2 inyectada en ratones en alrededor de 800 veces menor dosis que la dosis de Vm24 que causa una mortalidad del 50 %.

35

Ejemplo 2: Análisis “mass finger print” de los componentes presentes en el veneno de *V. mexicanus*

Los venenos de alacrán son una mezcla muy compleja de componentes, conteniendo cadenas peptídicas cortas y largas activas sobre canales iónicos (revisado en [Possani y Rodriguez Vega, 2006]), aminas libres, nucleótidos, carbohidratos, lípidos (revisado en Possani *et al.*, 1999), enzimas como fosfolipasas [Zamudio *et al.*, 1997, Valdez *et al.*, 2004], y hialuronidasas y lisozimas [Batista *et al.*, 2007] y muchos otros compuestos proteicos de función desconocida [Diego-Garcia *et al.*, 2007]. Además, los alacranes son criaturas muy antiguas, con más de trescientos millones de años de evolución en la superficie de la Tierra y han tenido tiempo para seleccionar las herramientas específicas para la caza de sus presas o para defenderse de los depredadores. Por estas razones, es atractivo e inteligente buscar la presencia de componentes biológicamente activos, en sus venenos. Gracias a los recientes avances en las metodologías y los equipos de espectrometría de masas, ahora es posible obtener un análisis de “mass finger print” de todo el veneno. Por estos motivos de los primeros estudios realizados con el veneno soluble de *V. mexicanus* fue la identificación de las masas moleculares de todos los componentes, que pueden ser identificados mediante una trampa de iones de espectrómetro de masas LCQDUO de Finnigan (San José, CA) (EIS / EM) y una matriz de desorción láser asistida tiempo de vuelo (MALDI-TOF), modelo de Ettan MALDI-TOF/Pro aparato de Amersham Biosciences (Uppsala, Suecia). La estrategia utilizada fue preseleccionar por separación por HPLC péptidos puros o familias de componentes relacionados eluyendo como las mezclas de la columna de fase inversa C₁₈ (Figura 1) y luego analizar su masa molecular por espectrometría de masas. En la Tabla 1, se enlista el tiempo de retención de las fracciones recogidas del sistema de HPLC seguido por las masas moleculares de los componentes encontrados en cada fracción. Se determinaron más de 340 componentes con distintas masas moleculares. Vale la pena mencionar que algunos de los componentes aparecen en dos sub-fracciones contiguas del sistema de separación de HPLC y en tales casos, sólo uno fue contado. Además, algunas fracciones no fueron identificadas (marcadas ND).

55

ES 2 379 500 T3

TABLA 1:

RT	Masa Promedio	RT	Masa Promedio
2.92	222.334, 260.168, 372.815	27.12	1340.203, 1642.177, 2620.029
5.06	272.055	28.24	2084.938, 2883.506 , 3770.697
B 5.06	429.1	28.72	222.295, 373.089, 4037.264, 4062.469 , 4860.475
7.40	- ND	29.12	2028.249, 4044.625, 4743.102
9.84	1235.349	S 29.82	1989.272, 2117.962 , 3770.356, 3828.061 , 4048.342, 5125.488
10.78	994.899, 1047.829, 1234.056	29.82	2368.289, 2514.764 , 3772.141, 4131.437 , 4196.231, 5612.061, 5684.0
11.28	117.063 , 1234.349	30.62	1219.7, 2029.978, 2756.56, 4051.043 , 5487.234

5

ES 2 379 500 T3

RT	Masa Promedio	RT	Masa Promedio
B11.28 -	ND	31.20	1894.409, 2288.761, 3544, 3695.567, 3873, 4053.615, 4623.314 , 5309.113, 5468.43 , 8340.499
13.07	300.703	31.71	2526.804, 4053.34, 4256.777 , 4623.389, 8184.727
14	1466.168, 1960.937 , 2363.969, 2441.293, 3091.036	32.22	2610.12 , 3068.716, 4050.544, 4251.603 , 4616.633, 8157.368
14.96	- ND	32.78	1727.988, 3115.418, 3838.78 , 6231.008
15	272.091 , 334.602, 427.197 , 1086.902, 1689.2	33.47	1288.661, 1630.123, 1856.102, 2076.866, 2116.85, 2306.616, 3302.189, 4160.467 , 4322.925 , 5434.357, 6514.206 , 7937.084 , 8364.316, 9125.702, 15373.608
16.22	- ND	34.11	1811.589, 2792.828 , 2890.806, 3272.21, 4008.728 , 4044.677
16.70	324.238, 418.72, 501.4, 834.6, 1049.296 , 1877.397	S135.79	3032.485, 3862.668 , 7469.49
17.34	261.344, 1205.752, 1274.737 , 1876.767, 1886.725	S2 35.72	2558.149, 3032.024 , 3987.629, 4232, 375, 8260.244
17.66	261.283, 1243.892	S3 35.79	3037.876 , 3058.507, 3738.686 , 4027.624
18.35	208.909 , 223.509, 373.827, 1436.27, 1652.505	35.79	3038.075 , 3738.649, 4027.696, 8269.386
19.10	1148.738, 2096.296, 2297.193, 2318.577 , 2353.524	36.19	2814.497, 3038.868 , 3564.677, 3721.56, 3807.978 , 3878.666, 4027.936, 8267.094, 13944.696
B 19.10	2377.208 , 2593.419, 2610.334	36.72	3588.529 , 3610.297, 3625.895, 3983.521, 4020.726, 4223.762
20.14.	2593.88	46.53	3915.145, 4051.546, 4319.845, 4710.326 , 4782.406, 4868.122, 5107.706 , 7067.905, 13435.689
20.14.2	1464.42, 2098.654, 2594.163 , 2610.477	46.86	3920.472 , 4236.709 , 5044.021 , 5182.747, 8246.293, 11459.022, 13358.3, 16209.23
20.23	- ND	47.82	4298.5, 4700.818, 5272.777, 12469.982
20.96	1866.081, 3777.92	48.70	2166.644, 2304.621 , 2569.271, 2768.228, 3278.62, 3424.448, 3819.497, 3916.217, 4265.672, 4292.422
21.98	431.4, 714.7, 1259.696 , 3777.049	49	5953.928, 11315.991
22.40	533.5, 788.5, 2286.744, 4024.456 , 4980.605	49.6	- ND
23.39	1014.47, 1129.8, 1390.042, 1527.099, 1902.299, 2111.018, 2228.143, 2311.791, 3665, 4025.1	50.75	-ND
S24.11	1048.604, 1657.949, 2310.809	51.66	- ND
S 24.11	1048.604, 1657.949, 2310.809	52.34	- ND
24.11	1952.328, 2166.86, 3864 , 5338.229	53.31	3460.978, 3807.741, 5673.486, 10978.726, 16185.602, 24611.234
B 24.11	253.04, 875.42, 1398.661, 1948.124, 2436.139, 2679.346, 5336.308	53.84	3548.378, 3591.69, 3899.344
25.10	1489.6 , 1511.315 , 1617.7, 2529.512 , 3864.577	54.27	-ND
25.10.2	253.073, 590.4, 1194.739, 1511.312, 1985.92, 2075.691	55.20	- ND
25.52	1485.399, 1728.229, 2258.489 , 2387.001	56.27	1603.661 , 1640.656

RT	Masa Promedio	RT	Masa Promedio
26.10	<i>422.3, 462.4, 1327.008, 1495.436,</i> <i>2258.772, 2620.03, 3870.226, 3917.489</i>	58.92	-ND
26.51	1234.369, 2621.099 , 3871.574		

5 Los componentes marcados con las cifras en negrita significan que se presenta en una mayor concentración en el veneno, mientras que las cifras en cursiva, el componente que sólo se identifica en el espectrómetro por EIS/EM. Cuando el tiempo de retención es precedido por la letra S significa que el pico cromatográfico no era simétrico, y la fracción recogida corresponde al segmento ascendente de la curva, mientras que si la letra es B significa el segmento descendente de la curva. Las cifras en cursiva significan que la masa molecular correspondiente se obtuvo solamente por EIS/ EM. Algunos valores no fueron determinados (ND).

10 Los diferentes componentes registrados en la Tabla 1 se analizaron y se agruparon arbitrariamente según su peso molecular en incrementos de mil, empezando por aquellos que tenían menos de 500 Da, a continuación, 500-1.000, 1.000-2.000 y así sucesivamente hasta 9.000-10.000 Da (1.000 de diferencia en cada grupo). Más del 90 % de los componentes identificados tienen masas moleculares de menos de 10.000 Da de peso molecular. Tres grupos tenían al menos 60 diferentes componentes. Caen dentro del rango de 1.000-2.000; 2.000-3.000 y 3.000 a 4.000 Da. Más de 40 componentes tienen masas moleculares de 4.000 a 5.000 Da.

15 Estos resultados son importantes para la elección de los péptidos adecuados para el análisis funcional. El criterio seguido se discute y se publicó en un documento reciente del grupo de la presente invención utilizando el alacrán *Tityus stigmurus* [Batista *et al.*, 2007], en el que se realizó un análisis comparativo) considerando varios análisis de masas de las diferentes especies de alacranes (no incluido *V. mexicanus*). Es común encontrar que los péptidos con pesos moleculares en el orden de 4.000 Da sean específicos para el reconocimiento de los canales iónicos permeable a los iones K⁺. Por esta razón, se han seleccionado los péptidos en este rango de masas moleculares para los estudios fisiológicos, que se describen a continuación. Siguiendo esta estrategia los dos péptidos: Vm23 y Vm24 fueron seleccionados para la determinación de la estructura primaria (Figura 2) y ensayos fisiológicos adicionales (véase posteriormente, los ejemplos 7-10).

30 Ejemplo 3: Caracterización de la secuencia de aminoácidos C-terminal de Vm23 y Vm24

En cuanto a los últimos residuos en la secuencia de aminoácidos C-terminal de Vm23 los resultados son claros. El análisis de la secuencia descrita en el ejemplo 1 de esta divulgación, cuya secuencia se muestra en la Figura 2, deja pocas dudas de que el residuo final no es amidado y termina la estructura principal con un residuo de carboxil cisteína libre.

35 Sin embargo, para Vm24 los resultados de la espectrometría de masas indican que el residuo C-terminal podría ser amidado. La literatura reporta ejemplos en los que la amidación del último aminoácido de un péptido dado es importante para definir su función biológica. Un ejemplo es el caso encontrado para la toxina HsTx1 del alacrán *Heterometrus spinifer* [Lebrun *et al.*, 1997], Experimentos electrofisiológicos han demostrado que la forma amidada de esta toxina es 5 veces más potente que la que tiene el terminal libre de carboxilo y es hasta 300 veces más activo en experimentos de unión en sinaptosomas del cerebro de rata [Lebrun *et al.*, 1997]. Por esta razón es muy importante estar seguro de la forma química del último residuo de Vm24. Tal como se mencionó en la discusión del ejemplo 1, la masa molecular experimental encontrada para Vm24 fue de 3.864 Da, y el peso molecular teórico esperado de la secuencia de aminoácidos se muestra en la Figura 2 fue de 3.864,6 Da. Los dos valores son diferentes en un 0,6 u.m.a. lo que podría atribuirse a la presencia de un residuo C-terminal amidado de Vm24. Se realizaron experimentos de disociación inducida por colisión (CID), con el péptido C-terminal (909,4 u.m.a. masa monoisotópica) producido por hidrólisis con la enzima Arg-C mostrando toda la serie iónica y valores de 1,0 u.m.a. inferior a los que teóricamente se espera de un péptido con el terminal libre de carboxilo y los valores exactos para la serie iónica *b*, confirman que el C-terminal de la toxina es amidado (Figura 3).

50 Para este experimento una alícuota de 25 microgramos de proteína Vm24 fue enzimáticamente cortada, con el enzima Arg-C, utilizando el mismo procedimiento descrito en el ejemplo 1 anterior [Valdez *et al.*, 2004, Batista *et al.*, 2007]. Los productos de la hidrólisis enzimática se separaron por HPLC en el mismo sistema que se describe en Figura 1. Todos los péptidos en forma homogénea fueron analizados sistemáticamente por EM y el péptido con una masa molecular de 909,5 u.m.a. fue sometido a análisis EM/EM. El protocolo experimental descrito para la fuente de ionización del nano-pulverizador del espectrómetro de masas fue 130 C para el calentamiento capilar y 1,65 kV como voltaje de pulverizador. El sistema de distribución del disolvente fue operado con 0,6 microlitros/ min. con 50 % de acetonitrilo (AcCN) en el modo lineal. Los escaneos EM/EM se definieron con 200 lecturas/ milisegundos de tiempo de inyección, de banda ancha activada, 25 V de energía de colisión, 1,0 (m/z) de ancho de aislamiento y el 40 % de la energía de colisión normalizado. Los datos fueron analizados de forma manual y automática utilizando la herramienta MS-product del Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu/>) desarrollado por el departamento de Espectrometría de Masas de la Universidad de California, San Francisco. La herramienta MS-product permite la estimación de los posibles fragmentos de iones producidos por el péptido KCKCYC usando cisteínas sin modificar,

masa mono isotópica y residuo N-terminal no bloqueado. El cálculo se realizó tanto para el péptido con el ácido carboxílico terminal libre y el C-terminal amidado. Un instrumento de trampa iónica ESI fue elegido para esta evaluación. La fragmentación teórica del péptido con C-terminal amidado se realizó con el Protein Prospector, y mostró exactamente los mismos valores que los obtenidos experimentalmente para los iones *b* (232,11, 360,21, 463,22, 626,28 y 789,34) y para los iones *y* (782,27, 679,26, 551,16, 448,15, 285,09 y 122,03). Por lo tanto, el péptido Vm24 posee el C-terminal amidado, es decir, un residuo de cisteinamida.

Ejemplo 4. Determinación de los puentes de disulfuro de Vm24

Debido a su pequeño tamaño la toxina Vm24 es una molécula ideal para estudiar las relaciones estructura-función. El péptido contiene ocho residuos de cisteína, que se encuentra en las posiciones. 6, 12, 16, 21, 26, 31, 33 y 36, que forman cuatro puentes disulfuro intramoleculares. En este ejemplo se describe la determinación del patrón de los enlaces disulfuro de Vm24 usando la degradación de Edman y la determinación de la espectrometría de masas de los péptidos purificados por RP-columnas de HPLC, después de la hidrólisis con enzimas proteolíticas.

Los pares de disulfuro se determinaron por análisis de espectrometría de masas de los fragmentos peptídicos obtenidos después de la hidrólisis con endopeptidasas de la toxina pura y su separación por HPLC. Una muestra de la toxina que contiene 25 microgramos de proteína se incubó con una mezcla a partes iguales (0,5 microgramos cada una) de tripsina y quimiotripsina (Boehringer Mannheim, Alemania) en Tris-HCl 150 mM, pH 6,8, durante 12 horas a 37 °C. Los péptidos generados se separaron por HPLC utilizando una columna de fase inversa Cig (218TP54 número de catálogo, de Vydac, Hisperia, CA). Un gradiente lineal a partir de solvente A (0,12 % TFA en agua) a 60 % de solvente B (0,10 % TFA en acetonitrilo) se aplicó a la columna con una duración de 60 minutos. Los picos de efluentes, se recogieron y se liofilizaron de inmediato. Los péptidos individuales fueron analizados por fragmentación por espectrometría de masas (EM/EM) de la que se obtuvo la secuencia de aminoácidos. Dado que la estructura primaria era conocida, la asignación de los puentes disulfuro pudo deducirse.

La comparación de las masas moleculares de las formas reducidas y oxidadas de Vm24 muestran exactamente una diferencia de 8 u.m.a. la masa molecular experimental encontrada para el péptido nativo era 3.864,0 u.m.a. y el péptido reducido totalmente fue de 3,872 u.m.a., que confirma que todas las cistinas están implicados en la formación de puentes disulfuro. Tres fragmentos peptídicos principales se obtuvieron de la digestión simultánea de quimiotripsina y tripsina a pH 6,8 (pH ligeramente ácido a fin de evitar el reordenamientos de disulfuro), mostrando masas moleculares mono-isotópica de $[M + H]^+$ 788,0 $[M + H]^+$ 560,4 y $[M + 2H]^{2+}$ 1.099,7 u.m.a. (Figuras: 4-1 y 4-2) y 5A). El péptido con $[M + H]^+$ 788,0 corresponde exactamente con el peso molecular esperado de las cistinas pares (C4-C8), del heterodímero con secuencia de aminoácidos AQGCK-CY (Figura 4-1). El segundo puente disulfuro establecido fue C3-C6 que tiene los mismos valores teóricos y experimentales de 560,4 u.m.a (Figura 4-2). Ambos péptidos se caracterizaron además mediante experimentos CID mostrando las secuencias de aminoácidos esperadas. La señal en m/z $[M + 2H]^{2+}$ 1.099,7 u.m.a (2197,4 masa deconvolucionada) proviene del heterodímero que contiene los dos últimos pares de cistina (Figura 5A). Este fragmento fue directamente analizado. Las series de iones de CID de la señal en m/z $[M + 2H]^{2+}$ 1.099,7 muestra dos valores de iones que cumple la condición para la determinación completa de los dos últimos pares de cistina. El *ión-b* en 1.507,4 y el *ión-j*; en 691,3 que son productos del mismo enlace de escisión de amida entre el ácido glutámico (E11) y la cisteína (C12) claramente asignan los pares C1-C5 y C2-C7. Además, los valores de la fragmentación en tándem del b-ión 1.710,5 al b-ión 1.137,3 caracterizan la etiqueta interna (GSPEC-C) con valores de masa inequívoca lo que confirma la disposición de puentes disulfuro esquemáticamente representados en la Figura 5-B).

Ejemplo 5. Síntesis química de Vm24

En este ejemplo y antes de describir la síntesis química de Vm24 es importante cubrir algunos conceptos básicos en el tema de la química de péptidos y la justificación para la producción de ligandos por síntesis química, más que por la extracción natural de los productos existentes.

Muchos polipéptidos tóxicos se han purificado a partir de fuentes de veneno y demostraron ser herramientas valiosas para estudiar la comunicación celular, porque afectan a la distribución de iones a través de la membrana biológica mediante la unión a receptores (la mayoría de los canales iónicos en el caso de las toxinas de alacrán) y causan la despolarización de la célula o la modulación de los potenciales eléctricos a través de las membranas., controlando de esta forma de la función celular. Por estas razones, encontrar péptidos tóxicos específicos que pueden discriminar diferentes tipos o subtipos de canales iónicos son valiosos líderes terapéuticos en el tratamiento de una serie de condiciones fisiológicas o anormales de los animales de experimentación y, eventualmente, para el tratamiento de patologías humanas. La mayoría de las estructuras de los péptidos conocidos son cortos, bien plegados y estructuras empaquetadas presenta una serie de ventajas con respecto a otros compuestos orgánicos, tales como alta potencia, buena especificidad de blanco, alta solubilidad y acción rápida. Además, a menudo son pequeñas proteínas entrecruzadas por varios puentes disulfuro. Estas características estructurales confieren a estos péptidos un alto grado de estabilidad, aunque el correcto plegamiento de un derivado preparado sintético plantea algunos problemas adicionales para la síntesis adecuada. Sin embargo, las cantidades de estos polipéptidos presentes en las fuentes de veneno por lo general son bastante pequeñas. En realidad, ya que son tan específicos y eficientes en sus acciones fisiológicas, el animal que produce estos péptidos no necesita producir grandes

cantidades con el fin de utilizarlos de manera eficaz, ya sea para capturar a sus presas o defenderse de depredadores. Aunque la cantidad varios de estos péptidos aislados directamente de las fuentes por lo general son suficientes para caracterizar el mecanismo general de acción y han permitido, en el pasado, la conducción de la caracterización estructural del péptido, en particular mediante técnicas de resonancia magnética nuclear, por lo general es necesario producir el mismo péptido o sus derivados sintéticos, dependiendo del alcance perseguido por la investigación o aplicaciones clínicas. La determinación de la estructura tridimensional de los péptidos y la determinación de la superficie implicada en el reconocimiento de los lados de los receptores (canales iónicos) son fundamentales para el diseño de las versiones modificadas del modelo inicial o para la síntesis de peptidomiméticos.

5 Aquí se describe la síntesis química de Vm24. Históricamente Vm24 fue identificado antes que Vm23. Por esta razón la mayor parte del trabajo detallado, objeto de la presente invención, se ha hecho y aquí se describe para el caso de Vm24, y luego se confirmó que es verdad para ambos péptidos.

15 Un análogo lineal de Vm24 fue sintetizado por el método en fase sólida de resina Rink Amide MBHA, (Calbiochem-Novabiochem Corp). Fmoc-aminoácidos (Calbiochem-Novabiochem Corp) se utilizaron con los siguientes grupos protectores en la cadena lateral Arg (Pbf), Asn (Trt), Cis (Trt), Gin (Trt), Glu (OtBu), Lys (Boc), Ser (tBu), y Tyr (tBu).

20 El grupo Fmoc se elimina mediante el tratamiento con 20 % piperidina en dimetilformamida (DMF) durante 20 minutos seguido de lavado con DMF. Fmoc-aminoácidos (0,5 mmol), se acoplaron como ésteres activos preformados en DMF con HBTU (2-(1-H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametil-hexafluorofosfato uronio) /DIPEA (diisopropiletilamina) (0,45 mmol/0,75 mmol, 2 minutos de activación), como agentes de activación. Los tiempos de acoplamiento fueron 30 min. Las aminos libres que no han reaccionado o aminos libres desbloqueadas fueron supervisadas a través de la prueba de ninhidrina, (Sarin *et al.*, 1981) en cada ciclo de la síntesis de péptidos. Durante toda la síntesis, antes del acoplamiento del siguiente aminoácido, las aminos libres residuales indeseables fueron bloqueadas por acetilación. Todas las operaciones se realizan de forma manual en un recipiente de vidrio de 50 ml de reacción con tapón de rosca recubierto de teflón. La resina peptídica fue agitada por inversión suave durante la N α -desprotección y los pasos de acoplamiento.

30 Tras la eliminación definitiva del grupo Fmoc, la resina con el péptido (1,7 gramos) fue cortada de la resina y, simultáneamente, desprotegida utilizando reactivo K [Drakopoulou *et al.*, 1995] durante dos horas a temperatura ambiente. Tras la escisión, el péptido crudo fue precipitado y lavado con-t-butil éter frío, entonces se disuelve en 20 % de ácido acético acuoso. El producto fue liofilizado y mantenido desecado a -20 °C hasta su uso.

35 La reacción de ciclización para hacer los puentes disulfuro correspondiente de la molécula se llevo a cabo en 0,1 M NaCl, 5 mM de glutatión reducido, 0,5mM glutatión oxidado, 20mM Na₂HPO₄ (pH 7,8) y 30 μ M de Vm24 sintética no plegada. El producto ciclizado crudo se purifica en dos pasos de HPLC. El primero utiliza una columna C₁₈ preparativa (238TP1022 Vydac), con un gradiente lineal de la solución A (0,12 % TFA en agua) a la solución B (0,1 % TFA en acetonitrilo) hasta el 60 % de B en 60 min. El perfil del cromatograma obtenido se muestra en la Figura 6. El componente principal (marcado con el número 1 en la Figura 6), fue finalmente purificado utilizando una columna analítica, C₁₈ (218TP54 Vydac) ejecutada con un gradiente lineal de solvente A a 40 % de solvente B en 60 min. (Inserción de la Figura 6) La estructura y la pureza de la toxina sintética fueron confirmadas por HPLC analítico, la secuencia de aminoácidos y análisis de espectrometría de masas. La secuencia de aminoácidos se llevo a cabo en un Beckman LF3000 Protein Sequencer (Fullerton, CA) y el análisis de espectrometría de masas se realizó en un espectrómetro Finnigan LCQDuo (San José, CA. EE.UU.). La exactitud de la secuencia de aminoácidos fue verificada por la degradación de Edman directa hasta el residuo número 30. El tiempo de elución de la columna de HPLC coincidió exactamente con el momento en el que el péptido nativo eluye de la misma columna, en idénticas condiciones. Ejemplos del patrón de elución obtenidos con Vm24 nativo (Figura 7A), Vm24 sintéticas tal como se describe aquí (Figura 7B) y una mezcla equimolar de Vm24 nativa y sintética (Figura 7C) se muestran en la Figura 7. La masa molecular determinada por espectrometría de masas es de 3.864 Da mostrando que corresponde exactamente con la de la secuencia prevista. Vale la pena señalar que la resina utilizada esta diseñada para la producción de un péptido con el C-terminal amidado, tal y como es el caso de Vm24.

55 De alrededor de 1,7 gramos de resina que contiene el péptido sintético preparado con la secuencia primaria esperada de Vm24, se obtuvo alrededor de 300 miligramos del péptido correctamente plegado, lo que representa un rendimiento del 30 % del valor esperado teórico (a partir de la resina inicial).

Ejemplo 6: Comparación de secuencias de aminoácidos

60 Las secuencias de la SEQ NO: 1 y SEQ NO: 2 muestran cierta semejanza con otras toxinas del escorpión de cadena corta, clasificadas en la familia α -KTx [Tytgat *et al.*, 1999], como una cadena peptídica corta, rica en aminoácidos básicos y un patrón de cisteínas similar. Todos los miembros de esta familia están relacionados estructuralmente, y realizan funciones similares, como bloqueadores de los canales de potasio, sin embargo, muestran selectividad variable para ciertos tipos y subtipos de canales de potasio [Rodríguez de la Vega y Possani, 2004; Panyi *et al.*, 2006]. El criterio aplicado por el grupo internacional de expertos que propuso la clasificación fue que una subfamilia determinada puede ser identificada con un alto porcentaje de similitud entre sus miembros y bajo una identidad con los miembros de otras subfamilias [Tytgat *et al.*, 1999]. Más tarde, se demostró que esta distinción

refleja, en cierta medida, el espectro farmacológico de la mayoría de las subfamilias [Rodríguez de la Vega *et al.*, 2003, Zhu *et al.*, 2004]. Por lo tanto, tener en cuenta la variabilidad relativamente restringida de la familia - debido a su reducido tamaño -, es importante identificar las características moleculares y estructurales que confiere un amplio espectro funcional determinado. Este tipo de análisis se realiza generalmente por comparación de secuencias y la inferencia filogenética. La idea que subyace en estos se basa en comparaciones en el supuesto de que las proteínas que pertenecen al mismo linaje, deben estar relacionados con los acontecimientos de especiación seguidos o concomitantes a la duplicación y divergencia de el/los gen(es) ancestral(es), haciendo posible la reconstrucción de su historia evolutiva por análisis bioinformático y ayudando a depurar el "paisaje de idoneidad" en un espacio de secuencia dada [Thornton y DeSalle, 2000; Orengo y Thornton, 2005].

Usando programas que realizan búsquedas heurísticas en los alineamientos locales (BLAST [Altschul *et al.*, 1990] y FASTA 3 [Pearson y Lipman, 1988]) para la identificación de las similitudes de secuencia de Vm24 y Vm23, algunos parientes fueron identificados con los valores de expectativa bastante baja (valor $E > 10^{-5}$). Una inspección más detallada en contra de todas las toxinas de cadena corta notificadas hasta la fecha sugiere que Vm24 y Vm23 son posiblemente nuevos miembros de la subfamilia 6 de α -KTx (siguiendo la propuesta de [Tytgat *et al.*, 1999]). De la comparación por pares, sin embargo, revela baja identidad con otros miembros de la subfamilia (Figura 8). La diversificación de la extensa secuencia de la familia α -KTx hace muy difícil de resolver si Vm24 y Vm23 pertenecen o no a cualquiera de las 20 subfamilias α -KTx caracterizadas previamente. Con el fin de aclarar la relación con la familia α -KTx, se realizó un análisis de inferencia filogenética bayesiana tal como se describió previamente [Bagdany *et al.*, 2005] con MrBayes 3.04b [Huelsenbeck y Ronquist, 2001; Ronquist y Huelsenbeck, 2003], utilizando el alineamiento múltiple de secuencias de 92 secuencias pertenecientes a la familia de α -KTx. Inferencia filogenética bayesiana estima la probabilidad posterior de una topología de árbol dado por un procedimiento de muestreo basado en cadena de Markov Montecarlo (MCMC) sobre $n-1$ árboles estocásticamente generados. Una cadena de Markov sigue buscando heurísticamente dentro de la topología de árbol, con una probabilidad posterior mejor en un paso determinado del procedimiento de muestreo; evaluado en virtud de un determinado modelo de aminoácido de sustitución (el proceso en general se llama cadena de Markov y Monte Carlo de acoplamiento Metrópolis o MC³). Para este análisis, cuatro cadenas con 250.000 árboles cada uno, fueron generados en el marco del modelo de sustitución de aminoácido JTT y muestra cada 250^a iteración. Coalescencia se obtuvo aproximadamente en la 175.000^a iteración y los 250 restantes árboles con mejores probabilidades posteriores se fusionaron para calcular un árbol de consenso de la regla de la mayoría del 50 %. Este árbol muestra claramente que la subfamilia 6 de α -KTx segrega, en el 92 % del conjunto de árboles final, como un grupo monofilético incluyendo a todos sus miembros y dos estrechamente relacionados con las toxinas de la subfamilia 7. El análisis también pone Vm24 y Vm23 como un grupo hermano de este clado (la partición específica prevalece en el 81 % de los árboles definitivos, véase la Figura 8), que apoya firmemente que Vm24 y Vm23 constituyen una nueva- subfamilia α -KTx. En base a estos análisis, y teniendo en cuenta criterios de las directrices propuestas por el panel internacional de expertos que clasifican las toxinas del alacrán específicas para los canales de K [Tytgat *et al.*, 1999] es cierto que Vm23 y Vm24 constituyen una nueva sub-familia de las toxinas de alacrán que reconocen los canales de K. La identidad de secuencia más alta entre estas toxinas se encuentra en la parte C-terminal, al igual que otras sub-familias de bloqueadores del canal de K. El segmento N-terminal es la región más variable de esta sub-familia y solamente Vm24 y Vm23 presentan un raro segmento continuo de triple Alanina al comienzo de la secuencia.

Ejemplo 7: Vm24 bloquea de forma selectiva el canal hKv1.3 activado por voltaje sobre el canal de K hKCa1 activado por Ca²⁺ de las células T.

Bloqueo de alta afinidad de los canales h.Kv1.3 por Vm24

El bloqueo de los canales hKv1.3 por Vm24 se caracterizó en los canales expresadas endógenamente en las células T de sangre periférica [Peter *et al.*, 2001; Bagdany *et al.*, 2005]. La breve descripción del procedimiento para la obtención de las células T para los experimentos electrofisiológicos es la siguiente. Se obtuvo sangre venosa periférica heparinizada de voluntarios sanos. Las células mononucleares fueron separadas por centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll-Hypaque. Las células recogidas se lavaron dos veces con solución de Hank libre de Ca²⁺ y Mg²⁺ que contiene 25 mM de amortiguador HEPES (pH 7,4). Las células fueron cultivadas en incubadora con 5 % de CO₂ a 37°C y en placas de cultivo de 24 pozos con medio RPMI-1640 suplementado con 10 % de FCS (Hyclone, Logan, Utah, EE.UU.), 100 microgramos/ ml de penicilina, 100 microgramos/ ml de estreptomina y 2 mM L-glutamina a una densidad de 0,5 x 10⁶ células/ml de 3-4 días. El medio de cultivo también contiene de 6 u 8 microgramos/ ml de una fitohemaglutinina (PHA- P, Sigma-Aldrich Kft., Hungría) para aumentar la expresión de canales K [Deutsch *et al.*, 1986]. Los linfocitos T se han seleccionado para registros de corriente por la incubación con anticuerpos de ratón anti-CD2 humano (Becton-Dickinson, San José, CA, EE.UU.), seguido de adhesión selectiva a las cajas Petri recubiertas con anticuerpos de cabra anti-IgG de ratón (Biosource, Camarillo, CA, EE.UU.), tal como se describe por Matteson y Deutsch (Matteson *et al.*, 1984). Las cajas se lavaron cuidadosamente cinco veces con 1 ml de medio extracelular normal (véase posteriormente) para los experimentos de registro electrofisiológico de fijación de voltaje.

Las corrientes de célula completa de las células T se midieron en "fijación de voltaje" utilizando amplificadores 200 A o Multiclamp 700B Axopatch conectados a las computadoras personales utilizando el hardware de adquisición de datos Axon Digidata 1200 o Digidata 1322A. La compensación de resistencia de la serie hasta el 85 % se utilizó para

minimizar los errores de voltaje y lograr buenas condiciones de “fijación de voltaje” Para la adquisición y análisis de datos se usó el paquete de software pClamp8 o pClamp9 (Molecular Devices Inc., Sunnyvale, CA). Antes del análisis de la corriente de célula completa los trazos fueron corregidos para la fuga óhmica y digitalmente filtrados (3 *point boxcar smoothing*). La determinación de las corrientes de pico en alto grado de bloqueo de la corriente se hizo mediante el ajuste de los trazos de los datos a una función exponencial [modelo de Hodgkin-Huxley] con constantes de tiempo fijada a los determinados en la ausencia de la toxina para aislar la amplitud del componente de aumento.

Las pipetas se extrajeron de capilares de vidrio borosilicato de Clark GC 150 F-15, en cinco etapas y pulidas a fuego los electrodos resultantes tienen 2,3 mega ohmios de resistencia en el baño. La solución de baño consistió (en mM): 145 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 2,5 CaCl₂, 5,5 de glucosa, 10 HEPES (pH 7,35) suplementado con 0,1 mg/ml de albúmina de suero bovino (Sigma). La osmolaridad medida de la solución externa era de entre 302 y 308 miliosmoles (mOsm). La solución de llenado de la pipeta (solución interna) se componía de (mM): 140 KF, 2 MgCl₂, 1 CaCl₂, 10 HEPES, 11 EGTA (pH 7,22). La osmolaridad medida de las soluciones internas fue de aproximadamente 295 mOsm. El baño de perfusión alrededor de la célula con diferentes soluciones de ensayo se logra utilizando una configuración de gravedad flujo de perfusión con 6 líneas de entrada y una punta de salida de tubo de polietileno PE10 con la apertura disminuida para reducir la turbulencia del flujo. El exceso de líquido se eliminó de forma continua.

El protocolo estándar de voltaje para provocar corrientes de K⁺ en las células T consistía en una serie de despolarizaciones de 14 ms. de largo a +50 mV de un potencial sostenido de -120 mV. El tiempo entre los pulsos de voltaje se establece en 15 s, a fin de evitar la inactivación acumulativa de los canales hKv1.3 Trazos representativos de las corrientes en la solución normal del baño se muestran en la Figura 9A (control). Bajo las condiciones experimentales aplicadas (la falta de Ca²⁺ en la solución de llenado de la pipeta y la naturaleza del protocolo de voltaje) el conjunto de corrientes de la célula completa se llevaron a cabo exclusivamente por canales hKv1.3 [Peter *et al.*, 2001]. La Figura 9A muestra corrientes macroscópicas de K⁺ a través de canales hKv1.3 registrados secuencialmente en la misma célula, antes (trazos de control) y después de la adición de 1 nM de Vm24 a la solución externa por perfusión. La corriente Kv1.3 desaparece por completo en el duodécimo pulso (correspondiente a 3 min.) en presencia de Vm24 1 nM.

La cinética del desarrollo del bloqueo Vm24 a concentraciones de 1 nM (círculos llenos) y 0,3 nM (círculos vacíos) se muestran en la Figura 9B. Tras el 4º pulso la solución de perfusión extracelular control fue cambiada a una solución que contiene toxina y los pulsos despolarizantes continuaron cada 15 s. Se determinaron las corrientes de pico y se normalizó la corriente de pico en la solución de control y se representó como una función del tiempo. La figura muestra que a mayor concentración de toxina, la cinética de la evolución del bloque es más rápida de lo que se esperaba de una reacción de pseudo-primer orden entre la toxina y los canales, sin embargo, en ambas concentraciones de toxinas un bloqueo completo de las corrientes -KV 1,3 es alcanzado. Datos para la concentración Vm24 1 nM son del experimento que se muestra en la Figura 9A. Perfusión de la cámara de registro con solución de control libre de toxina dio lugar a una liberación muy pequeña del bloque dentro de los primeros 8 minutos (no mostrado). Durante un periodo de 10,5 minutos de la aplicación de la toxina en concentraciones 3 pM (Figura 9C) la pérdida de la corriente parece que satura a -36 % del máximo registrado en la solución de control. Este periodo fue seguido por un periodo de 30 minutos de lavado (la flecha indica el inicio de la perfusión con la solución libre de toxina) durante el cual una tercera parte del bloqueo de la corriente recupera con una cinética muy lenta (constante de tiempo de lavado estimada es ~3800 s correspondientes a una tasa de despegado de ~2,6 x 10⁻⁴ s⁻¹).

El mecanismo general por el que las toxinas del escorpión bloquean los canales de K es la obstrucción de la vía de conducción de iones por unión al vestíbulo extracelular del canal [Goldstein y Miller, 1993]. La reversibilidad lenta e incompleta de la reducción de las corrientes en la presencia de Vm24, sin embargo, podría indicar un efecto inespecífico del péptido en la membrana en lugar de un bloqueo de hKv1.3. Se argumenta en contra de este escenario de la siguiente manera: 1) la tasa para el desarrollo de la pérdida de la corriente (a altas concentraciones de toxinas) depende de la concentración de Vm24, siendo más rápida con mayores concentraciones de la toxina (Figura 9B), 2) la corriente de fuga no aumenta en presencia de la toxina, lo que indica la falta de daños generales de la membrana por Vm24, 3) Vm24 no inhibió otras varias corrientes de K⁺ o se inhibe de forma rápida y reversible (véase más adelante en el perfil de selectividad de la toxina), lo que argumenta muy fuertemente en contra de una acción no específica de la toxina en la estructura de la membrana plasmática o una toxina que induce la pérdida de la función de las proteínas de membrana en general; 4) la aplicación simultánea de ChTx, un conocido bloqueador del poro de Kv1.3 y Vm24 mostró la competencia entre las dos toxinas en el mismo lugar de unión que quedó reflejado por la ralentización de la cinética de bloqueo de Vm24 con concentraciones crecientes de ChTx (datos no mostrados).

Las velocidades de asociación y disociación muy lentas de la toxina impusieron limitaciones en la generación de la relación dosis-respuesta que se presentan en el inciso D de la Figura 9. En general, para el equilibrio del bloqueo de los canales a diferentes concentraciones de péptido de la fracción de corriente restante (RCF) se calcula como I/I_0 en la que I e I_0 son las corrientes máximas registradas en la presencia y la ausencia de la toxina, respectivamente. Debido a la muy lenta velocidad de asociación a bajas concentraciones de péptidos la determinación de la I fue problemática, ya que la caída en el pico de corriente de episodio a episodio fue tan pequeña que una saturación

aparente fue observada durante la recolección de datos, aunque el bloqueo no podría haber llegado de su valor de equilibrio todavía. El uso de aplicaciones más largas de la toxina se vio limitada por la estabilidad de las corrientes de pico en los registros de "registro electrofisiológico de fijación de voltaje" en célula completa. Además, el resumen de los picos no se pudo determinar de forma independiente, debido a los muy largos tiempos de lavado del péptido.

5 Así, los datos presentados en la Figura 9D representan los límites superiores para los valores de I/I_0 en las diferentes concentraciones de toxinas, por lo tanto, la K_d estimada a partir de la relación dosis-respuesta es también una sobreestimación de la K_d real. La relación dosis-respuesta en la Figura 9D se representó con la función RCF = $K_d^n / (K_d^n + [Tx]^n)$ en la que $[Tx]$ indica la concentración de toxinas, K_d es la constante de disociación, y n es el coeficiente de Hill. La línea sólida superpuesta muestra el mejor ajuste con los parámetros de $K_d = 2,9$ pM, y un

10 coeficiente de Hill ~ 1 . Las barras de error indican SEM ($n = 3-6$). El valor de $n \sim 1$ para el coeficiente de Hill indica que una sola molécula de la toxina interactúa con el canal (estequiometría 1:1). A nuestro leal saber, Vm24 tiene la mayor afinidad como un bloqueador de hKv1.3 en ensayos electrofisiológicos.

Vm24 es un bloqueador de baja afinidad de los canales hKCa1

15 Tal como se indica en la introducción al ejemplo 7, uno de los requisitos más importantes para que un péptido sea un inmunosupresor selectivo es su selectividad para Kv1.3 sobre IKCa1. Los canales IKCa1 también se expresan de forma endógena en las células T [Grissmer *et al.*, 1993]. La corriente transportada por canales IKCa1 se puede medir con una pipeta con solución de llenado con una concentración de $1 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} libre, lo cual es suficiente para

20 activar plenamente estos canales [Grissmer *et al.*, 1993]. Sin embargo, la presencia simultánea de los canales Kv1.3 en las mismas células hace que la caracterización farmacológica de los canales de IKCa1 sea difícil y limita el estudio a potenciales de membrana en los que los canales Kv1.3 no se activan [Grissmer *et al.*, 1993; Bagdany *et al.*, 2005]. Esto y el número relativamente pequeño de los canales IKCa1 incluso en las células T estimuladas nos motivaron a estudiar la farmacología IKCa1 utilizando los canales recombinantes.

25 El gen humano del canal KCa1 (AF033021) marcado con EGFP fue transfectado en células Cos-7 utilizando Lipofectamina 2000 de acuerdo al protocolo del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.). El clon EGFP-hKCa1 ha demostrado anteriormente tener las mismas propiedades biofísicas y farmacológicas para el IKCa1 nativo en las células T, y por lo tanto, se ha utilizado ampliamente en los estudios farmacológicos [Wulff *et al.*, 2001]. Las

30 células Cos-7 se mantuvieron en condiciones de cultivo celular estándar [Bagdany *et al.*, 2005]. Se registraron corrientes 2-3 días después de la transfección. Las transfectantes GFP positivas fueron identificados en un microscopio de fluorescencia TE2000U Nikon y utilizados para el registro de corrientes. La solución extracelular nonnal es la misma que la descrita anteriormente. La composición de la solución de llenado de la pipeta fue (en mM) 150 K-aspartato, 5 HEPES, 10 EGTA, 8,7 CaCl_2 , 2 MgCl_2 , (pH 7,2). Esta solución contiene una concentración $1 \mu\text{M}$

35 de Ca^{2+} libre para activar completamente la corriente hKCa1. Todas las condiciones de registro (adquisición de datos, perfusión etc.) fueron idénticos a los descritos anteriormente para los canales Kv1.3.

Pendientes de voltaje de doscientos milisegundos de largo de -120 mV a $+50$ mV desde un potencial sostenido de -120 mV se utilizaron para obtener las corrientes hKCa1 en células Cos-7 (velocidad de la pendiente $0,85$ mV/ ms.).

40 Las pendientes de voltaje se ejecutaron cada 10 s. Los trazos de corriente registrados en la ausencia de Vm24 (control) en la Figura 9E muestra que no fueron evocadas corrientes puras dependientes de voltaje en hKCa1 por el protocolo de voltaje aplicado. El potencial de inversión de la corriente es de -75 mV, que es característica de la conductancia de K^+ basada en la composición iónica de las soluciones de registro. Para corrientes IKCa1 la pendiente (s) de la relación lineal de corriente-voltaje puede ser usado para caracterizar la corriente de bloqueo [Grissmer *et al.*, 1993]. El valor de s se reduce a ~ 52 % del control en la presencia de 10 nM Vm24 durante los experimentos mostrados en la Figura 9E, el equilibrio de bloqueo se alcanza en $4,5$ min. (27 episodios). El bloqueo de la corriente es totalmente reversible en $2,5$ minutos después del cambio de la solución de perfusión de solución extracelular libre de toxina (Figura 9E, lavado). Las fracciones de corriente restante a concentraciones 1 nM y 10 nM

50 Vm24 se calcularon como s/s_0 en la que s y s_0 son las pendientes de las relaciones I-V evocados por las pendientes de voltaje en la presencia y la ausencia de Vm24, respectivamente, y presentados en la Figura 9F. Las barras de error indican SEM para $n = 3$ experimentos independientes. A una concentración de 1 nM de Vm24 prácticamente no se obstruyen los canales hKCa1 (Figura 9F), mientras que en la misma concentración el péptido bloquea los canales hKv1.3 por completo (Figura 9D). La K_d de Vm24 para hKCa1 puede estimarse a partir de un modelo en el que 1 molécula de la toxina interactúa con 1 canal para dar una K_d de ~ 14 nM. Teniendo en cuenta la K_d

55 determinada para hKv1.3 ($2,9$ pM), la selectividad de Vm24 para hKv1.3 sobre hKCa1 es al menos ~ 4.500 veces.

Ejemplo 8. Perfil de selectividad de Vm24

60 Todas las construcciones de los canales utilizados en este estudio se utilizan habitualmente en los ensayos farmacológicos y biofísicos y su aplicabilidad se confirma en las referencias citadas.

Transfecciones transitorias: Las células Cos-7 se utilizan para expresar los canales: Kv2.1 de rata (rKv2.1, donado por Dr. S. Korn, U. de Connecticut) [Immke *et al.*, 1999]; Kv1.2 de humano (hKv1. 2, vector pcDNA3/Hygro conteniendo la secuencia de codificación completa de Kv1.2, donado por Dr. S. Grissmer, U. de la Ulm, Alemania) [Visan *et al.*, 2004]; Kv1.4 humanos (hKv1.4ΔN: la eliminación de bolas de inactivación mutante de Kv1.4, un regalo de D. Fedida, Universidad de British Columbia, Vancouver, Canadá) [Kurata *et al.*, 2004], y $\text{Na}_v1.5$ humanos (una donación de R. Horn, Thomas Jefferson University, Filadelfia, PA, EE.UU.) [O'Leary *et al.*, 1995; Ahem *et al.*, 2005].

Las células tsA-201 fueron usadas para expresar los canales de hBK (gen hSlol (UI 1058), en PCI-plásmido neo, regalo de Toshinori Hoshi, Universidad de Pennsylvania, Philadelphia, PA) [Avdonin *et al.*, 2003]. Todos estos clones de canales fueron transitoriamente co-transfectados con un plásmido que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) en relaciones molares de 1:5 utilizando Lipofectamine 2000 de acuerdo al protocolo del fabricante (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE.UU.), y se cultivaron en condiciones estándar. Se registraron corrientes 2-3 días después de la transfección. Las transfectantes GFP positivas fueron identificadas en un microscopio de fluorescencia TE2000U Nikon y utilizadas para los registros de corriente (> 70 % de éxito para la co-transfección).

Líneas celulares estables: Se ha descrito anteriormente que las células L929 expresan de forma estable los canales mKv1.1 y las células MEL expresan establemente los canales hKv1.5 [Grissmer *et al.*, 1994] y fueron donativos del Dr. Heike Wulff (UC Davis, California, EE.UU.). Los canales hERG se expresaron de manera estable en una línea celular HEK-293.

Las corrientes de células completas se registraron tal como se describe en el ejemplo 7. En todos los casos las soluciones estándar extracelular y llenado de la pipeta fueron usadas (véase el ejemplo 7), excepto para el registro de las corrientes de hBK en las que la composición de la solución de llenado de la pipeta fue (en mM) 140 KCl, 10 EGTA, 9,69 CaCl₂, 5 HEPES (pH 7,2). La concentración de Ca²⁺ de esta última solución es [Ca²⁺]_{int} = 5 micromolar, que permite el registro de las corrientes de BK a moderado potencial de despolarización [Avdonin *et al.*, 2003]. Todas las demás condiciones experimentales (adquisición de datos, los principios de análisis, la perfusión) fueron las mismas que se describen en el ejemplo 7.

Trazos de corrientes obtenidos para los miembros de la familia Kv1 (mKv1.1, hKv1.2, hKv1.3, hKv1.4ΔN, hKv1.5) en la solución extracelular estándar (de control) se muestran en las Figuras 10A a 10E. En todos los casos, las células se mantuvieron a un potencial sostenido de -120 mV y repetidamente despolariza a +50 mV para obtener las corrientes. La duración de los pulsos despolarizantes (indicado por separado en cada inciso de la Figura 10) se estableció para permitir la activación completa de las corrientes y reducir al mínimo la inactivación. En todos los casos se permitió tiempo suficiente entre los pulsos a un potencial sostenido (-120 mV) para la completa recuperación de los canales de alguna inactivación residual (los intervalos entre los pulsos variaron de 15 a 30 segundos). La versión de hKv1.4 con la inactivación rápida (tipo N) removida se utilizó en este estudio (hKv1.4 ΔN, se eliminaron los 147 aminoácidos de N-terminal). En ausencia de inactivación de tipo-N, la determinación del bloqueo de la corriente es más fácil y más exacta, ya que las corrientes de pico en este clon no están influidos por el proceso de inactivación muy rápida (constantes de tiempo: 15-20 ms., [Kurata *et al.* 2004]). En el canal de tipo salvaje debido a la competencia entre la activación y la inactivación de las corrientes dependientes del tiempo, las corrientes de pico se subestiman, lo que complica el análisis del bloqueo de la corriente.

La Figura 10 muestra los trazos de corrientes registradas antes de la aplicación de la toxina (control), tras el equilibrio del bloqueo por 10 nM de Vm24 y seguido del lavado (lavado) de la toxina. El análisis de los grupos indica que los canales hKv1.4 y hKv1.5 son prácticamente insensibles a Vm24 (véase también el gráfico de barras en la Figura 12B). Sin embargo, Vm24 en la concentración de 10 nM, que es ~3500 veces la K_d para hKv1.3, bloquea los canales de mKv1.1 (RCF = 0,80 ± 0,02, n = 3) y los canales hKv1.2 (RCF = 0,54 ± 0,08, n = 3) de manera significativa. Además, el bloqueo de hKv1.2 es completamente reversible. El bloqueo de la corriente hKv1.3 a la concentración de 10 nM de Vm24 (registrado en las células T humanas) se muestra en la Figura 10-C, para facilitar la comparación de la potencia de Vm24 como un bloqueador de los canales de Kv1 (RCF = 0,01 ± 0,01, n = 3). Debido al bloqueo significativo de las corrientes mKv1.1 y hKv1.2, Vm24 también fue probado en menor concentración (1 nM) (Figura 12A). A una concentración de 1 nM los valores de RCF fueron 0,97 ± 0,02 (n = 3) y 0,81 ± 0,015 (n = 3) para las corrientes mKv1.1 y hKv1.2, respectivamente. De los valores de RCF la afinidad de Vm24 por estos canales se puede estimar a partir de un modelo en el que 1 molécula de la toxina interactúa con 1 canal para dar valores de K_d entre 30-40 nM para mKv1.1 y entre 5-10 nM para hKv1.2. Teniendo en cuenta la K_d determinada para hKv1.3 (2,9 pM), la selectividad de Vm24 para hKv1.3 sobre mKv1.1 y hKv1.2 es al menos ~ 10.000 veces y 1.500 veces, respectivamente.

La potencia de Vm24 inhibiendo la actividad de otros canales iónicos de efecto biológico significativo y la susceptibilidad al bloqueo por toxinas animales también se determinó. Estos incluyen los canales de K activados por voltaje el rKv2.1 y el hERG (KVI 1,1) canales de K, el canal hBK activados por Ca²⁺ (KCa1.1) y el canal de sodio activado por voltaje cardíaco Na_v1.5. La Figura 11 muestra corrientes representativas de célula entera evocada con los protocolos adecuados de voltaje para un canal determinado en la solución extracelular estándar (control). Las corrientes de pico de Kv2.1 y Na_v1.5 se determinaron a partir de registros obtenidos en respuesta a la despolarización a +50 mV y 0 mV, respectivamente, de un potencial sostenido de -120 mV (Figura 11 A y 11D). Células HEK293 que expresan canales hERG se mantuvieron a -8,0 mV, despolarizadas a +20 mV durante 2,5 s para activar e inactivar los canales (Figura 11B). Esto fue seguido por un paso a -40 mV en el que los canales inactivados se recuperan rápidamente y el pico de corriente hERG se puede determinar. Este complicado protocolo de voltajes es el estándar para el registro de las corrientes de hERG. Los canales BK son activados por la despolarización de la membrana (Figura 11B), sin embargo, la dependencia de voltaje de la probabilidad de apertura depende de la concentración intracelular de Ca²⁺. En una concentración de 5 micromolar de [Ca²⁺] libre aplicado en este estudio, más del 50 % de los canales se activan a +50 mV, por lo tanto, la comparación de los efectos de Vm24 en los potenciales de membrana idénticos a los utilizados para otros canales Kv es posible. La activación completa de los canales BK a +50 mV requeriría [Ca²⁺] incompatible con el registro de célula completa, por el contrario, la

activación total de los canales BK a 5 micromolar de $[Ca^{2+}]$ libre requeriría despolarizaciones a $>+ 100$ mV. Así, la combinación de 5 micromolar $[Ca^{2+}]$ y +50 mV de potencial de prueba fue un compromiso razonable para estudiar el efecto de Vm24. El pulso a -120 mV anterior al pulso de prueba fue utilizado para la evaluación de fuga no específica. El potencial sostenido entre los protocolos de pulso fue de 0 mV en la que todos los canales Kv inactivan totalmente reduciendo así la posibilidad de la contaminación de los registros por las corrientes endógenas Kv esporádicamente encontradas en las células tsA-201. En este potencial de membrana los canales BK ya son activos, lo que queda demostrado por la significativa corriente sostenida en el inicio del pulso.

Para ensayar los efectos de la Vm24 en los diferentes canales mostrados en la Figura 11 las células fueron repetidamente despolarizadas para obtener las corrientes en diferentes soluciones extracelulares. La Figura 11 muestra los trazos representativos de las corrientes registradas antes de la aplicación de la toxina (control), después de la aplicación de 10 nM de Vm24 por 4-7 min., y después del lavado de la toxina (lavado). Todos los incisos de la Figura 11 muestran que las corrientes registradas en la presencia de Vm24 son indistinguibles de los obtenidos en la solución de control y después del lavado, lo que indica la falta de bloqueo de estos canales. El análisis estadístico se presenta en la Figura 12B, en la que la media y la SEM de las fracciones de corriente restante se muestran en la presencia de 10 nM de Vm24 ($n \geq 3$).

Los datos presentados en la Figura 12 indican que el orden de la potencia de bloqueo de Vm24 sobre diversos canales de K es $hKv1.3 \gg hKv1.2 > hKCa1 > mKv1.1 \gg hKv1.4 \approx hKv1.5 \approx hERG \approx rKv2.1 \approx hBK \approx hNav1.5$. Basado en el valor de K_d obtenido para hKv1.3 de la relación dosis-respuesta y el único punto estimado de los valores de K_d para los otros canales (es decir, calculado a partir de datos a 10 nM de Vm24, y la fracción restante de la corriente asumiendo una estequiometría 1:1 de toxinas-canal) la selectividad de Vm24 para hKv1.3 sobre los otros canales sometidos a ensayo en este estudio es > 1.500 veces. Este valor está muy por encima de los criterios comúnmente aceptados para la selectividad [Giangiacomo *et al.*, 2004], que se define como 100 veces la diferencia en la constante de equilibrio de disociación o una diferencia de la energía libre de unión para la unión de un α -KTx a dos canales de potasio diferentes, Ch1 y Ch2 de $\Delta\Delta G_{Ch1; Ch2} > 2,72$ kcal/ mol.

Ejemplo 9: Vm24 sintética es un bloqueador de hKv1.3 igualmente potente que la toxina natural

Tal como se describe en el ejemplo 5, consideraciones teóricas y prácticas condujeron a la síntesis química de Vm24. Tal como se ha descrito, la estructura y la pureza de la toxina sintética fueron confirmadas por HPLC analítico, la secuencia de aminoácidos y la determinación de la espectrometría de masas. Todos estos enfoques indican que la secuencia primaria de Vm24 sintéticas (sVm24) es idéntica a la del péptido natural. Por otra parte, el protocolo para la generación de sVm24 utilizan los distintos grupos para la protección de los grupos tiol diseñado para asegurar que el plegado se limita a la formación de los mismos pares de disulfuro como en el péptido nativo. Estos datos, sin embargo, no garantizan que se mantenga la actividad biológica del péptido. Las superficies complementarias del canal y el péptido que median en la alta afinidad de bloqueo son muy complicadas y mínimas desviaciones de la estructura de la del péptido nativo podrían comprometer la eficacia de sVm24 en el bloqueo de Kv1.3 [Giangiacomo *et al.*, 2004].

La actividad biológica de sVm24 se ensayó en los canales Kv 1,3 de las células T humanas. Las condiciones experimentales de este estudio fueron exactamente las mismas que se describe en el Ejemplo 7. Por "registro electrofisiológico de fijación de voltaje" de célula completa se despolarizaron linfocitos T en repetidas ocasiones a +50 mV de un potencial sostenido de -120 mV cada 30 s en presencia de diferentes soluciones (Figura 13A). La corriente hKv1.3 medida en la ausencia de sVm24 (control) gradualmente, y casi desaparece por completo con la administración de 100 pM de sVm24 a través de los aparatos de perfusión. Después del 16° pulso la cámara de registro fue perfundida con solución extracelular libre de toxina. La eliminación de la toxina de la solución de perfusión no se tradujo en una liberación significativa del bloqueo de hKv1.3 en 5 minutos. Esto se demuestra más claramente en la Figura 13-B, en la que los picos de corriente, normalizados a los obtenidos en la solución de control antes de la aplicación sVm24 (pico normalizado), se muestran como una función del tiempo. Las flechas indican el inicio de la perfusión con sVm24 (100 pM sVm24) y el cambio de la perfusión a solución libre de toxina I (lavado). Las fracciones de corriente residual (RCF), medidas tras el equilibrio del bloqueo con 100 pM de sVm24 o Vm24 se comparan en la Figura 13-C ($n = 6$ y $n = 4$, respectivamente, barras indican SEM). La comparación estadística (t-test) indicó que los RCF no son estadísticamente diferentes entre los dos grupos ($p = 0,57$). La conclusión de los inventores de la presente invención es que sVm24 es tan potente como la toxina natural en el bloqueo de los canales hKv1.3.

Ejemplo 10: Análisis de la actividad biológica de Vm23 en diferentes canales iónicos

Los venenos de alacrán contienen una gran cantidad de péptidos biológicamente activos. El veneno de una especie a menudo contiene péptidos con alto grado de identidad de secuencia, como en el caso de Vm23 y Vm24 de *V. mexicanus* (véase el ejemplo 1). Un alto grado de identidad de la secuencia de los péptidos usualmente confiere actividad biológica idéntica a las moléculas individuales. Esto se origina en el hecho de que la interacción de las toxinas peptídicas con el receptor de la toxina situado en el vestíbulo exterior de los canales iónicos está determinada por múltiples mecanismos, incluyendo interacciones electrostáticas de largo y corto alcance e interacciones de contacto cercano, y el efecto neto de estos factores determina la afinidad de unión y la selectividad

[Park y Miller, 1992; Peter *et al.*, 2001; Giangiacomo *et al.*, 2004]. Se ha demostrado previamente que dos péptidos del mismo alacrán (Pi2 y Pi3 de *P. imperator*), que difieren sólo en un único aminoácido, ambos bloquean Kv1.3 en concentraciones sub-nanomolar [Peter *et al.*, 2001]. Desde el trabajo pionero de Miller y colaboradores [Goldstein *et al.*, 1994], también es evidente que incluso las sustituciones no-conservativas de aminoácidos en varias posiciones de Caribdotoxina son bien tolerados y la toxina conserva su afinidad por el canal de potasio *Shaker* por ejemplo, T9K y N22K). A fin de comprobar que las diferencias entre Vm23 y Vm24 no fueron significativas para cambiar su afinidad y especificidad hacia Kv 1.3 el perfil farmacológico de Vm23, también fue examinado en detalle tal como se muestra a continuación.

10 La potencia de Vm23 para bloquear canales iónicos se ensayó para los canales Kv1.3 de los linfocitos T humanos, y para los canales mKv1.1, hKv1.2 y hKCa1. Estos canales fueron incluidos en el estudio basado en la baja afinidad (mKv1.1, hKv1.2 y hKCa1) o alta afinidad (hKv1.3) de bloqueo de estos canales por el péptido relacionado, Vm24, que comparte el 83 % de identidad de secuencia con Vm23. Las condiciones experimentales fueron exactamente las mismas que las descritas para los canales correspondientes en el ejemplo 7 y el Ejemplo 8.

15 Mediante “registro electrofisiológico de fijación de voltaje” en célula completa se despolarizaron linfocitos T en repetidas ocasiones a +50 mV de un potencial sostenido de -120 mV cada 15 s en la presencia de diferentes soluciones (Figura 14A). Las corrientes hKv1.3 medidas en la ausencia de Vm23 (control) desaparecen casi por completo en 3,5 minutos con la administración a través de los aparatos de perfusión de 10 nM de Vm23. Los trazos indicados como “10 nM Vm23” se registraron después del equilibrio del bloqueo. Después del 19º pulso la cámara de registro fue perfundida con la solución extracelular libre de toxina (lavado). La eliminación de la toxina de la solución de perfusión no se tradujo en un alivio significativo del bloqueo de hKv1.3 en 2 minutos. La fracción de la corriente residual (RCF), medida tras el equilibrio del bloqueo con 10 nM de Vm23 se muestra en la Figura 15 (n = 3, barras indican SEM). Estos resultados indican que las características de bloqueo de los canales hKv1.3 mediado por Vm23 son muy similares a los de bloqueo mediado por Vm24: el bloqueo es de alta afinidad y la velocidad de disociación de la toxina es extremadamente lenta, más allá de los límites de tiempo utilizado en este ensayo. La cantidad limitada de Vm23 (menos del 0,5 % del veneno es Vm23) impide la determinación de la relación dosis-respuesta del bloqueo hKv1.3 y la comparación estadística adecuada de la constante de disociación con la de Vm24.

30 La comparación de los registrados de las corrientes antes (control), y 3,5 minutos después de la adición de 10 nM de Vm23, y siguiendo del lavado de la toxina (2 min.) muestran que 10 nM de Vm23 prácticamente no bloquea tanto a los canales hKCa1 (Figura 14B) o a los canales mKv1.1 (Figura 14C) (véanse los detalles experimentales en las secciones correspondientes de Ejemplo 7 y Ejemplo 8). La absoluta falta de bloqueo hKCa1 por Vm23 es diferente del efecto de Vm24, que bloquea -40 % de los canales en la misma concentración (véase la Figura 9F). Por otra parte, los canales hKv1.2 fueron ligeramente bloqueados por el 10 nM de Vm23 (Figura 14D) para dar un valor de RCF de $0,91 \pm 0,02$ (n = 3, SEM, Figura 15), y el bloqueo no era fácilmente reversible en un plazo 2 min. La misma concentración de Vm24 bloquea ~ 46 % de los canales (véase el ejemplo 8).

40 La comparación de las fracciones de corriente residual para hKv1.3, hKCa1, mKv1.1 y hKv1.2 en la presencia de 10 nM de Vm23 (Figura 15) con los datos obtenidos para Vm24 (Figura 12 A y B) indican que el perfil de selectividad de Vm23 para hKv1.3 es ligeramente mejor para los canales probados. También se puede concluir de la comparación que a pesar de las diferencias en la estructura primaria de Vm23 y Vm24, el bloqueo de alta afinidad de hKv1.3 con notable selectividad se mantiene.

45 **Ejemplo 11: efectos inmunológicos de Vm24 *in vivo***

Millones de personas en todo el mundo están afectados por enfermedades autoinmunes, tales como, pero sin limitarse a la esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diabetes tipo I, psoriasis autoinmunes, lupus eritematoso sistémico, colitis ulcerosa, oftalmía simpática, la enfermedad de la reabsorción del hueso peridontal, púrpura trombocitopénica inmunológica y síndrome linfoproliferativo autoinmune, entre otros. Actualmente se cree que la aparición de estas enfermedades implica la activación de células T auto reactivas específicas de la enfermedad latente, que se transforman en células T efectoras de memoria (T_{EM}) - Las células T auto reactivas puede diferenciarse de un estado naïve a células T de memoria activadas continuamente debido a la estimulación repetida por el autoantígeno y contribuir al daño inflamatorio por migración a los tejidos, secretando citosinas inflamatorias, y mostrando funciones efectoras inmediatas [Sallusto *et al.*, 1999]. El mecanismo involucrado en la hipersensibilidad tardía (DTH) es otro ejemplo de la lesión de la piel causada por células T_{EM} [Soler *et al.*, 2003]. La patogénesis de muchas enfermedades autoinmunes también podría deberse a las células B de memoria, especialmente los pertenecientes al subconjunto “class-switched” CD27⁺ IgD⁺ [Iglesias *et al.*, 2001; O’Connor *et al.*, 2001; Corcione *et al.*, 2004]. Por estas razones, es deseable desarrollar agentes terapéuticos que podrían apuntar selectivamente células T_{EM} y células B de memoria “class-switched”, sin perjudicar la actividad de otros tipos de linfocitos, evitando de esta manera el compromiso de la respuesta inmune aguda. Tal como se mencionó anteriormente en los ejemplos 7 a 10 de la presente invención, los canales activados por voltaje Kv1.3 son nuevos blancos terapéuticos para la innrno modulación de las células T_{EM} y de células B de memoria “class-switched”. Las células T_{EM} regulan por incremento Kv1.3 tras la activación y su proliferación impulsada por el antígeno es muy sensible a las sustancias que se sabe que bloquean los canales Kv1.3 [Wulff *et al.*, 2003]. Por el contrario, naïve y T_{CM} son mucho menos sensibles a los bloqueadores Kv1.3 y rápidamente se vuelven resistentes a bloqueo de Kv1.3 por regulación por

incremento de los canales K activados por calcio Kca 3,1 [Wulff *et al.*, 2003; Chandy *et al.* 2004]. Durante el proceso de diferenciación las células B y las células T cambian su dependencia de los canales de potasio de Kca 3.1 a Kv1.3 [Wulff *et al.*, 2004]. Debido a este hecho, bloqueadores de los canales Kv 1,3 inhiben la proliferación de estas células, sin afectar a células de memoria naïve e IgD⁺ CD27⁺. Así, el uso de bloqueadores de los canales específicos para Kv1.3 afectaría preferentemente células T_{EM} y células B de memoria “class-switched”, sin poner en peligro la mayor parte de la respuesta inmune, sino mejorando las condiciones de salud desarrolladas como consecuencia de las enfermedades autoinmunes. El bloqueo de los canales Kv1.3 aminora la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), la reabsorción ósea en la enfermedad periodontal y la respuesta de DTH en modelos animales sin causar efectos secundarios evidentes [Koo *et al.*, 1997; Beeton *et al.*, 2001; Valverde *et al.*, 2004]. Dado que el bloqueo de los canales Kv1.3 por péptidos es rápidamente reversible, permite controlar el curso del tratamiento, que no es el caso cuando se utilizan agentes quimioterapéuticos o anticuerpos monoclonales, lo que tarda meses en desaparecer. Obviamente, un problema importante es encontrar péptidos altamente selectivos para este tratamiento terapéutico [Chandy *et al.*, 2004].

15 Tal como se muestra en los ejemplos 7-10 descritos anteriormente, ambos péptidos (Vm23 y Vm24), objeto de la presente invención, son potentes y muy específicas bloqueadores de los canales Kv1.3 *in vitro*. Los experimentos fueron realizados directamente en los linfocitos T humanos en cultivo, así como utilizando otras células que expresan varios canales de K dependientes de voltaje, a fin de verificar la selectividad de acción. A los efectos de la “prueba de concepto”, los experimentos *in vivo* se llevaron a cabo con ratas sensibilizadas con dinitrofluorobenceno (DNFB) como un agente capaz de levantar una importante respuesta de DTH.

Con el fin de realizar este tipo de experimento establecimos un protocolo para estudiar la respuesta de DTH en ratas. El sistema utilizado es básicamente el descrito por Phanuphak *et al.*, 1974. En resumen, dos grupos de ratas (3 o 5 animales cada uno) fueron sensibilizados por las aplicaciones de 40 microlitros de DNFB 0,7 % en una solución de acetona: aceite de oliva en una proporción 4:1, en dos días consecutivos (los días uno y dos), después de un afeitado suave de la región dorsal de los animales. Después de 7 días de la segunda aplicación de la solución de sensibilización, los animales fueron desafiados por una aplicación única de 20 microlitros de 0,4 % DNFB disuelto en la solución acetona: aceite de oliva descrita anteriormente. Esta solución fue distribuido por la superficie dorsal de la oreja derecha y se deja secar, mientras que en la oreja del lado izquierdo se distribuyo solamente solución del vehículo (acetona: aceite de oliva). El día ocho del protocolo, una inyección subcutánea de 100 microlitros de amortiguador de fosfato salino de pH 7,8 (PBS), se aplicó a cada uno de los animales utilizados como control, mientras que al grupo experimental de ratas, una cantidad de 10 microgramos de Vm24 pura en 100 microlitros de PBS se aplicó por vía subcutánea. El espesor de las dos orejas de todos los animales se midió 24 horas después de la aplicación de Vm24.

Los resultados de los experimentos se muestran en la Figura 16. Se puede ver claramente que los animales de control, que no recibieron una inyección de Vm24, tuvieron un valor promedio de inflamación de la oreja en el orden de 0,32 mm (marcados control) mientras que las ratas que fueron tratadas con una dosis de 10 microgramos de Vm24 tuvieron una inflamación reducida, no más de 0,10 mm de espesor. Estos valores corresponden a los procesos de inflamación real, ya que el espesor de las orejas no desafiadas (orejas del lado izquierdo), fue restado. Esto representa una disminución neta de más del 60 % del proceso de la inflamación. En conclusión, estos resultados apoyan la idea de que Vm24 es un agente inmunosupresor importante para la respuesta de DTH en ratas. Por lo tanto, es ciertamente un componente principal que merece ser analizado como un inhibidor de las enfermedades inmunológicas dependientes de la activación de los linfocitos T y B, en los que la contribución de los canales Kv1.3 es importante para provocar o mantener la enfermedad.

Referencias

- Aebersold R, Goodlett DR (2001). Mass Spectrometry in Proteomics. Chem. Rev. 101:269-95.
- 50 Ahem CA, Zhang, JF, Wookalis MJ, Horn R (2005). Modulation of the cardiac sodium channel NaV1.5 by Fyn, a Src family tyrosine kinase. Circ Res 96:991-8
- Aiyar J, Withka JM, Rizzi IP, Singleton DH, Andrews GC, Lin W, Boyd J, Hanson DC, Simon M, Dethlefs B, Lee C-L, Hell JE, Gutman GA, Chandy KG (1995). Topology of the pore-region of a K⁺ channel revealed by the NMR-derived structures of scorpion toxins. Neuron 15:1169-81.
- 55 Alessandri-Haber N, Lecoq A, Gasparini S, Grangier-Macmath G, Jacquet G, Harvey AL, de Medeiros C, Rowan EG, Gola M, Menez A, Crest M (1999). Mapping the functional anatomy of BgK on Kv1.1, Kv1.2, and Kv1.3. Clues to design analogs with enhanced selectivity. J Biol Chem 274:35653-61.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990). Basic local alignment search tool. J Mol Biol 215:403-10.
- 60 Aneiros A, Garcia I, Martinez JR, Harvey AL, Anderson AJ, Marshall DL, Engstrom A, Heliman U, Karlsson E (1993). A potassium channel toxin from the secretion of the sea anemone Bunodosoma granulifera. Isolation, amino acid sequence and biological activity. BiochimBiophys Acta 1157:86-92.
- Auguste P., Hugues M, Grave B, Gesquiere JC, Maes P, Tartar A, Romey G, Schweitz H, Lazdunski M (1990). Leiurotoxin I (scyllatoxin), a peptide ligand for Ca²⁺-activated K⁺ channels. Chemical synthesis, radiolabeling, and receptor characterization. J Biol Chem 265:4753-9.
- 65 Avdonin V, Tang XD, Hoshi T (2003). Stimulatory action of internal protons on Slol BK channels. Biophys J

84:2969-80

Bagdany M, Batista CV, Valdez-Cruz NA, Somodi S, Rodriguez de la Vega RC, Licea AF, Varga Z, Gaspar R, Possani LD, Panyi G (2005). Anuroctoxin, a new scorpion toxin of the α -KTx 6 subfamily, is highly selective for Kv1.3 over IKCaTion channels of human T lymphocytes. *Mol Pharmacol* 67:1034-44

Batista CV, Roman-Gonzalez SA, Salas-Castillo SP, Zamudio FZ, Gomez-Lagunas F, Possani LD (2007). Proteomic analysis of the venom from the scorpion *Tityus stigmurus*: Biochemical and physiological comparison with other *Tityus* species. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* (doi: 10.1016/j.cbpc.2006.12.004).

Beeton C, Wulff H, Barbaria J, Clot-Faybesse O, Pennington M, Bernard D, Cahalan MD, Chandy KG, Beraud E (2001). Selective blockade of T lymphocyte K(+) channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13942-7.

Beeton C, Chandy KG (2005). Potassium channels, memory T cells, and multiple sclerosis. *Neuroscientist* 11:550-62.

Beeton C, Pennington MW, Wulff H, Singh S, Nugent D, Crossley G, Khaytinl, Calabresi PA, Chen CY, Gutman GA, Chandy KG (2005). Targeting effector memory T cells with a selective peptide inhibitor of Kv1.3 channels for therapy of autoimmune diseases. *Mol Pharmacol* 67:1369-81.

Beeton C, Wulff H, Standifer NE, Azam P, Mullen KM, Pennington MW, Kolski-Andreaco A, Wei E, Grino A, Counts DR, Wang PH, Leehealey CJ, Andrews S, Sankaranarayanan A, Homerick D, Roeck WW, Tehranzadeh J, Stanhope KL, Zimin P, Havel PJ, Griffey S, Knaus HG, Nepom GT, Gutman GA, Calabresi PA, Chandy KG (2006). Kv1.3 channels are a therapeutic target for T cell-mediated autoimmune diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 17414-9

Carbone E, Wanlce E, Prestipino G, Possani LD, Maelicke A (1982). Selective blockage of voltage-dependent K⁺ channels by a novel scorpion toxin. *Nature* 296:90-1.

Castaneda O, Sotolongo V, Amor AM, Stocklin R, Anderson AJ, Harvey AL, Engstrom A, Wernstedt C, Karlsson E (1995). Characterization of a potassium channel toxin from the Caribbean Sea anemone *Stichodactyla helianthus*. *Toxicon* 33:603-13.

Castle NA, Haylett DG, Jenkinson DH (1989). Toxins in the characterization of potassium channels. *Trends Neurosci* 12:59-65.

Chandy KG, Wulff H, Beeton C, Pennington M, Gutman GA, Cahalan MD (2004). K⁺ channels as targets for specific immunomodulation. *Trends Pharmacol Sci* 25:280-9.

Cooper N, Bussel J (2006). The pathogenesis of immune thrombocytopenic purpura. *Br J Haematol* 133:364-74.

Corcione A, Casazza S, Ferretti E, Giunti D, Zappia E, Pistorio A, Gambini C, Mancardi GL, Uccelli A, Pistoia V. Recapitulation of B cell differentiation in the central nervous system of patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:11064-9.

Crest M, Jacquet G, Gola M, Zerrouk H, Benslimane A, Rochat H, Mansuelle P, Martin- Eauclaire MF (1992). Kaliotoxin, a novel peptidyl inhibitor of neuronal BK-type Ca(2+)- activated K⁺ channels characterized from *Androctonus mauretanicus mauretanicus* venom. *J Biol Chem* 267:1640-7.

Deutsch C, D Krause, SC Lee (1986). Voltage-gated potassium conductance in human T lymphocytes stimulated with phorbol ester. *J Physiol (Lond)* 372:405-23

Diego-Garcia E, Schwartz EF, D'Suze G, Gonzalez SA, Batista CV, Garcia BI, Rodriguez de la Vega RC, Possani LD (2007). Wide phylogenetic distribution of Scorpine and long-chain beta-KTx-like peptides in scorpion venoms: identification of "orphan" components. *Peptides* 28:31-7.

Doyle DA, CJ Morais, RA Pfuetzner, A Kuo, M Gulbis, SL Cohen, BT Chait, R MacKinnon (1998). The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280:69-77

Drakopoulou E, Cotton J, Virelizier H, Bernardi E, Schoofs AR, Partiseti M, Chpquet D, Gurrola G, Possani LD, Vita C (1995). Chemical synthesis, structural and functional characterisation of noxiustoxin, a powerful blocker of lymphocyte voltage- dependent K⁺ channels. *Biochem Biophys Res Commun* 213:901-7.

Fanger CM, H Rauer, Neben AL, Miller MJ, Wulff H, Rosa JC, Ganellin CR, Chandy KG, Cahalan MD (2001). Calcium-activated potassium channels sustain calcium signaling in T lymphocytes. Selective blockers and manipulated channel expression levels. *J Biol Chem* 276:12249-56

Feng J, Wible B, Li GR, Wang Z, Nattel S (1997). Antisense oligodeoxynucleotides directed against Kv1 5 mRNA specifically inhibit ultrarapid delayed rectifier K⁺ current in cultured adult human atrial myocytes. *Circ Res* 80:572-79

Galvez A, Gimenez-Gallego G, Reuben JP, Roy-Contancin L, Feigenbaum P, Kaczorowski GJ, Garcia ML (1990). Purification and characterization of a unique, potent, peptidyl probe for the high conductance calcium-activated potassium channel from venom of the scorpion *Buthus tamulus*. *J Biol Chem* 265:11083-90.

Garcia ML, Garcia-Calvo M, Hidalgo P, Lee A, MacKinnon R (1994). Purification and characterization of three inhibitors of voltage-dependent K⁺ channels from *Leiurus quinquestriatus var. hebraeus* venom. *Biochemistry* 33:6834-9.

Garcia ML, Gao Y, McManus OB, Kaczorowski GJ (2001). Potassium channels: from scorpion venoms to high-resolution structure. *Toxicon* 39:739-48.

Garcia-Calvo M, Leonard RJ, Novick J, Stevens SP, Schmalhofer W, Kaczorowski GJ, Garcia ML (1993). Purification, characterization, and biosynthesis of margatoxin, a component of *Centruroides margaritatus* venom that selectively inhibits voltage- dependent potassium channels. *J Biol Chem* 268:18866-74.

Giangiaco KM, Ceralde Y, Mullmann TJ (2004). Molecular basis of alpha-KTx specificity. *Toxicon* 43:877-

86.
Ghanshani S, Wulff H, Miller MJ, Rohm H, Neben A, Gutman GA, Cahalan MD, Chandy KG (2000). Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation. Molecular mechanism and functional consequences. *J Biol Chem* 275:37137-49.
- 5 Giangiacoimo KM, Ceralde Y, Mullmann TJ (2004). Molecular basis of alpha-KTx specificity. *Toxicon* 43:877-86.
- Goldstein SA, Miller C (1993). Mechanism of Charybdotoxin block of a voltage-gated K⁺ channel. *Biophys J* 65:1613-1619.
- 10 Goldstein SA, Pheasant DJ, Miller C (1994). The Charybdotoxin receptor of a Shaker K⁺ channel: peptide and channel residues mediating molecular recognition. *Neuron* 12:1377-88
- Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stuhmer W, Wang X (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 57:473-508.
- 15 Grissmer S, Dethlefs B, Wasmuth JJ, Goldin AL, Gutman GA, Cahalan MD, Chandy KG (1990). Expression and chromosomal localization of a lymphocyte K⁺ channel gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:9411-5.
- Grissmer S, Nguyen AN, Aiyar J, Hanson DC, Mather RJ, Gutman GA, Kamilowicz MJ, Auperin DD, Chandy KG (1994). Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol Pharmacol* 45: 1227-34
- 20 Grissmer S, Nguyen AN, Cahalan MD (1993). Calcium-activated potassium channels in resting and activated human T lymphocytes. Expression levels, calcium dependence, ion selectivity, pharmacology. *J Gen Physiol* 102:601-30
- Gutman GA, Chandy KG, Grissmer S, Lazdunski M, McKinnon D, Pardo LA, Robertson GA, Rudy B, Sanguinetti MC, Stuhmer W, Wang X (2005). International Union of Pharmacology. LIII. Nomenclature and molecular relationships of voltage-gated potassium channels. *Pharmacol Rev* 57:473-508
- 25 Harvey AL (1997). Recent studies on dendrotoxins and potassium ion channels. *GenPharmacol* 28:7-12.
- Hidalgo P, MacKinnon R (1995). Revealing the architecture of a K⁺ channel pore through mutant cycles with a peptide inhibitor. *Science* 268:307-10.
- Huelsbeck JP, Ronquist F (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17:754-5.
- 30 Iglesias A, Bauer J, Litzemberger T, Schubart A, Lington C (2001). T- and B-cell responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *GHa* 36:220-34.
- Immke D, Wood M, Kiss L, Korn SJ (1999). Potassium-dependent changes in the conformation of the Kv2.1 potassium channel pore. *J Gen Physiol* 113:819-36
- 35 Jameson BA, McDonnell JM, Marini JC, Korngold R (1994). A rationally designed CD4 analogue inhibits experimental allergic encephalomyelitis. *Nature* 368:744-6.
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ (2001). *Immunobiology*. 5 ed. Garland Publishing, New York. 187-220 pp
- Jouirou B, Mouhat S, Andreotti N, De Waard M, Sabatier JM (2004). Toxin determinants required for interaction with voltage-gated K⁺ channels. *Toxicon* 43:909-14.
- 40 Judge SI, Bever CT Jr (2006). Potassium channel blockers in multiple sclerosis: neuronal Kv channels and effects of symptomatic treatment. *Pharmacol Ther* 111:224-59.
- Juvvadi P, Vunnam S, Merrifield RB (1996). Synthetic melittin, its enantio, retro, and retroenantio isomers, and selected chimeric analogs: their antibacterial, hemolytic, and lipid bilayer action. *J Am Chem Soc* 118:8989-97.
- 45 Kalman K, Pennington MW, Lanigan MD, Nguyen A, Rauer H, Mahnir V, Paschetto K, Kern WR, Grissmer S, Gutman GA, Christian EP, Cahalan MD, Norton RS, Chandy KG (1998). ShK-Dap22, a potent Kv1.3-specific immunosuppressive polypeptide. *J Biol Chem* 273:32697-707
- Koch RO, Wanner SG, Koschak A, Hanner M, Schwarzer C, Kaczorowski GJ, Slaughter RS, Garcia ML, Knaus HG (1997). Complex subunit assembly of neuronal voltage-gated K⁺ channels. Basis for high-affinity toxin interactions and pharmacology. *J Biol Chem* 272:27577-81
- 50 Koo GC, Blake JT, Talento A, Nguyen M, Lin S, Sirotna A, Shah K, Mulvany K, Hora D Jr, Cunningham P, Wunderler DL, McManus OB, Slaughter R, Bugianesi R, Felix J, Garcia M, Williamson J, Kaczorowski G, Sigal NH, Springer MS, Feeney W (1997). Blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses *in vivo*. *J Immunol* 158:5120-8.
- 55 Krezel AM, Kasibhatla C, Hidalgo P, MacKinnon R, Wagner G (1995). Solution structure of the potassium channel inhibitor agitoxin 2: caliper for probing channel geometry. *Protein Sci* 4:1478-89.
- Kurata HT, Wang Z, Fedida D (2004). NH2-terminal inactivation peptide binding to C-type-inactivated Kv channels. *J Gen Physiol* 123:505-20
- 60 Lebrun B, Romi-Lebrun R, Martin-Eauclaire MF, Yasuda A, Ishiguro M, Oyama Y, Pongs O, Nakajima T (1997). A four-disulphide-bridged toxin, with high affinity towards voltage-gated K⁺ channels, isolated from *Heterometrus spinnifer* (Scorpionidae) venom. *Biochem J* 328:321-7.
- Lee SY, Lee A, Chen J, MacKinnon R (2005). Structure of the KvAP voltage-dependent K⁺ channel and its dependence on the lipid membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 15441-6.
- 65 Lerner EC, Qian Y, Blaskovich MA, Fossum RD, Vogt A, Sun J, Cox AD, Der CJ, Hamilton AD, Sefti SM (1995). Ras CAAX peptidomimetic FTI-277 selectively blocks oncogenic Ras signaling by inducing cytoplasmic accumulation of inactive Ras-Raf complexes. *J Biol Chem* 270:26802-6.

- Lewis RS, Cahalan MD (1995). Potassium and calcium channels in lymphocytes. *AnnuRev Immunol* 13:623-53.
- Lewis RS (2001). Calcium signaling mechanisms. in T lymphocytes. *Annu Rev Immunol* 9:497-521
- 5 Long SB, Campbell EB, Mackinnon R (2005). Crystal structure of a mammalian voltage-dependent Shaker family K⁺ channel. *Science* 3 09): 897-903.
- Matteson DR, Deutsch C (1984). K channels in T lymphocytes: a patch clamp study using monoclonal antibody adhesion. *Nature* 307:468-71
- Merrifield RB (1964). Solid-phase peptide synthesis. 2. An improved synthesis of bradykinin. *Biochemistry* 3:1385-90.
- 10 Miller C, Moczydlowski E, Latorre R, Phillips M (1985). Charybdotoxin, a protein inhibitor of single Ca²⁺-activated K⁺ channels from mammalian skeletal muscle. *Nature* 313:316-8.
- Mouhat S, Jouirou B, Mosbah A, De Waard M, Sabatier JM (2004). Diversity of folds in animal toxins acting on ion channels. *Biochem J* 378:717-26.
- Moczydlowski E (1998). Chemical basis for alkali cation selectivity in potassium- channel proteins. *Chem Biol* 5:R291-301.
- 15 O'Connor K, Bar-Or A, Hafler DA (2001). The neuroimmunology of multiple sclerosis: possible roles of T and B lymphocytes in immunopathogenesis. *J Clin Immunol* 21:81-92.
- O'Leary ME, Chen LQ, Kallen RG, Horn R (1995). A molecular link between activation and inactivation of sodium channels. *J Gen Physiol* 106:641-58
- 20 Oren H, Ozkal S, Gulen H, Duman M, Ucar C, Atabay B, Yilmaz S, Kargi A, Irken G (2002). Autoimmune lymphoproliferative syndrome: report of two cases and review of the literature. *Ann Hematol* 81:651-3.
- Orengo CA, Thornton JM (2005). Protein families and their evolution-a structural perspective. *Annu Rev Biochem* 74:867-900.
- Panyi G, Varga Z, Gaspar R (2004). Ion channels and lymphocyte activation. *Immunol Lett* 92:55-66
- 25 Panyi G, Possani LD, Rodriguez de la Vega RC y Vaiga Z (2006). K⁺ channel blockers: Novel. Took to Inhibit T cell Activation leading to specific immunosuppression. *Curr PharmDes* 12:2199-2220.
- Park CS, Miller C (1992). Mapping function to structure in a channel-blocking peptide: electrostatic mutants of charybdotoxin. *Biochemistry* 31:7749-55
- 30 Patel SP, Campbell DL (2005). Transient outward potassium current, 'I_{to}', phenotypes in the mammalian left ventricle: underlying molecular, cellular and biophysical mechanisms. *J Physiol* 569:7-39
- Pearson WR, Lipman DJ (1988). Improved tools for biological sequence comparison. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:2444-8.
- Pennington MW, Byrnes ME, Zaydenberg I, Khaytin I, de Chastonay J, Krafft DS, Hill R, Mahnir VM, Volberg WA, Gorczyca W, Kern WR (1995). Chemical synthesis and characterization of ShK toxin: a potent potassium channel inhibitor from a sea anemone. *Int J Pept Protein Res* 46:354-8.
- 35 Peter J, Varga Z, Hajdu P, Gaspar RJ, Damjanovich S, Horjales E, Possani LD, Panyi G (2001). Effects of toxins Pi2 and Pi3 on human T lymphocyte Kv1.3 channels: the role of Glu7 and Lys24. *J Membr Biol* 179:13-25
- Phanuphak P, Moorthead JW, Claman HN (1974) Tolerance and contact sensitivity to DNFB in mice. I. *In vivo* detection by ear swelling and correlation with *in vitro* cell stimulation. *J. Immunol.* 112:115-23.
- 40 Possani LD, Martin BM, Svendsen I, Rode GS, Erickson BW (1985). Scorpion toxins from *Centruroides noxius* and *Tityus serrulatus*. Primary structures and sequence comparison by metric analysis. *Biochem J* 229:739-50.
- Possani LD, Becerril B, Delepierre M, Tytgat J (1999). Scorpion toxins specific for Na⁺- channels. *Eur J Biochem* 264:287-300. Possani LD, Rodriguez de la Vega RC (2006).
- 45 Scorpion venom peptides. In: *Handbook of biologically active peptides* p. 339-354 (Kastin, A. editor). Academic Press, SanDiego CA, USA.
- Peter J, Varga Z, Hajdu P, Gaspar RJ, Damjanovich S, Horjales E, Possani LD, Panyi G(2001). Effects of toxins Pi2 and Pi3 on human T lymphocyte Kv1.3 channels: the role of Glu7 and Lys24. *J Membr Biol* 179: 13-25
- 50 Rogart RB, Cribbs L, Muglia LK, Kephart DD, Kaiser MW (1989). Molecular cloning of a putative tetrodotoxin-resistant rat heart Na⁺ channel isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:8170-4
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-4.
- 55 Rauer H, Lanigan MD, Pennington MW, Aiyar J, Ghanshani S, Cahalan MD, Norton RS, Chandy KG (2000). Structure-guided transformation of charybdotoxin yields an analog that selectively targets Ca(2⁺)-activated over voltage-gated K(+) channels. *J Biol Chem* 275:1201-8.
- Rodriguez de la Vega RC, Merino E, Becerril B, Possani LD (2003). Novel interactions between K⁺ channels and scorpion toxins. *Trends Pharmacol Sci* 24:222-7.
- 60 Rodriguez de la Vega RC, Possani LD (2004). Current views on scorpion toxins specific for K⁺-channels. *Toxicon* 43:865-75.
- Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A (1999). Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*401:708-12.
- 65 Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, maintenance. *Annu Rev Immunol* 22:745-63
- Sanguinetti MC, Tristani-Firouzi M (2006). hERG potassium channels and cardiac arrhythmia. *Nature*

- 440:463-9
 Sarin VK, Kent SBH, Tarn JP, Merrifield BR (1981). Quantitative monitoring of solid-phase peptide synthesis by the ninhydrin reaction. *Anal Biochem* 117:147-57
- 5 Soler D, Humphreys TL, Spinola SM, Campbell JJ (2003). CCR4 versus CCR10 in human cutaneous TH lymphocyte trafficking. *Blood* 101:1677-82.
- Stampe P, Kolmakova-Partensky L, Miller C (1994). Intimations of K⁺ channel structure from a complete functional map of the molecular surface of charybdotoxin. *Biochemistry* 33:443-50.
- Strong PN (1990). Potassium channel toxins. *Pharmacol Ther* 46: 137-62.
- 10 Sugg EE, Garcia ML, Reuben JP, Patchett AA, Kaczorowski GJ (1990). Synthesis and structural characterization of charybdotoxin, a potent peptidyl inhibitor of the high conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel. *J Biol Chem* 265:18745-8.
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25:4876-82.
- 15 Thornton JW, DeSalle R (2000). Gene family evolution and homology: genomics meets phylogenetics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 1:41-73.
- Tytgat J, Chandy KG, Garcia ML, Gutman GA, Martin-Eauclaire MF, van der Walt JJ, Possani LD (1999). A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: alpha-KTx molecular subfamilies. *Trends Pharmacol Sci* 20:444-7.
- 20 Valdez-Cruz NA, Batista CV, Possani LD (2004). Phaiodactylipin, a glycosylated heterodimeric phospholipase A from the venom of the scorpion *Anuroctonus phaiodactylus*. *Eur J Biochem* 271:1453-64.
- Valverde P, Kawai T, Taubman MA (2004). Selective blockade of voltage-gated potassium channels reduces inflammatory bone resorption in experimental periodontal disease. *J Bone Miner Res* 19:155-64.
- Vennekamp J, Wulff H, Beeton C, Calabresi PA, Grissmer S, Hansel W, Chandy KG (2004). Kv1.3-blocking 5-phenylalkoxy-psoralens: a new class of immunomodulators. *Mol Pharmacol* 65:1364-1374
- 25 Viglietta V, Kent SC, Orban T, Hafler DA (2002). GAD65-reactive T cells are activated in patients with autoimmune type 1a diabetes. *J Clin Invest* 109:895-903
- Visan V, Fajloun Z, Sabatier JM, Grissmer S (2004). Mapping of maurotoxin binding sites on hKv1.2, hKv1.3, hKCa1 channels. *Mol Pharmacol* 66:1103-12
- 30 Wei AD, Gutman GA, Aldrich R, Chandy KG, Grissmer S, Wulff H (2005). International Union of Pharmacology. LIT Nomenclature and molecular relationships of calcium-activated potassium channels. *Pharmacol Rev* 57:463-472
- Wulff H, Gutman GA, Cahalan MD, Chandy KG (2001). Delineation of the clotrimazole/TRAM-34 binding site on the intermediate conductance calcium-activated potassium channel, IKCa1. *J Biol Chem* 276:32040-5
- 35 Wulff H, Calabresi PA, Allie R, Yun S, Pennington M, Beeton C, Chandy KG (2003). The voltage-gated Kv 1.3 K(+) channel in effector memory T cells as new target for MS. *J Clin Invest* 111: 1703-13.
- Wulff H, Kiaius HG, Pennington M, Chandy KG (2004). K⁺ channel expression during B cell differentiation: implications for immunomodulation and autoimmunity. *J Immunol* 173:776-86.
- 40 Yamashita K, Choi U, Woltz PC, Foster S, Sneller MC, Hakim FT, Fowler DH (2004). Severe chronic graft-versus-host disease is characterized by a preponderance of CD4⁺ effector memory cells relative to central memory cells. *Blood* 103:3986-8
- Zamudio FZ, Saavedra R, Martin BM, Gurrola-Briones G, Herion P, Possani LD (1992). Amino acid sequence an immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Eur J Biochem* 204:281-92.
- 45 Zamudio FZ, Conde R, Arevalo C, Becerril B, Martin BM, Valdivia HH, Possani LD (1997). The mechanism of inhibition of ryanodine receptor channels by imperatoxin I, a heterodimeric protein from the scorpion *Pandinus imperator*. *J Biol Chem* 272:11886-94.
- Zhu S, Huys I, Dyason K, Verdonck F, Tytgat J (200). Evolutionary trace analysis of scorpion toxins specific for K-channels. *Proteins* 54:361-70.
- 50 Zweifach A, Lewis RS (1993). Mitogen-regulated Ca current of T lymphocytes is activated by depletion of intracellular Ca²⁺ stores. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6295-99.

Listado de Secuencias

- 55 <110> UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
 POSSANI POSTAY, Lourival Domingos
 GURROLA-BRIONES, Georgina
 SALAS-CASTILLO, Saida Patricia
 FERREIRA BATISTA, Cesar Vicente
- 60 VARGA, Zoltán S.
 PANYI, György
 GÁSPÁR Rezső
- <120> Vm23 y Vm24, dos péptidos de alacrán que bloquean con alta selectividad los canales de potasio (subtipo Kv1.3)
- 65 <130> Vm
 <160> 3

<170> PatentIn version 3.3
 <210> 1
 <211> 35
 <212> PRT
 <213> Vaejovis mexicanus smithi
 <400> 1

5

Ala Ala Ala Ile Ser Cys Val Gly Ser Lys Glu Cys Leu Pro Lys Cys
 1 5 10 15
 Lys Ala Gln Gly Cys Lys Ser Gly Lys Cys Met Asn Lys Lys Cys Lys
 20 25 30
 Cys Tyr Cys
 35

10

<210> 3
 <21.1> 36
 <212> PRT
 <213> Artificial
 <220>

15

<223> PUEDE AISLARSE a partir de Vaejovis mexicanus smithi O SINTETIZARSE ARTIFICIALMENTE
 <220>

20

<221> MISC_FEATURE
 <222> (10)..(10)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido a condición de que no perturbe el plegamiento tridimensional de la proteína o incluso mejor Lys o Pro
 <220>

25

<221> MISC_FEATURE
 <222> (13)..(13)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido a condición de que no perturbe el plegamiento tridimensional de la proteína o incluso mejor Leu o Pro
 <220>

30

<221> MISC_FEATURE
 <222> (17)..(17)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido a condición de que no perturbe el plegamiento tridimensional de la proteína o incluso mejor Lys o Arg
 <220>

35

<221> MISC_FEATURE
 <222> (23)..(23)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido a condición de que no perturbe el plegamiento tridimensional de la proteína o incluso mejor Ser o Asn
 <220>

40

<221> MISC_FEATURE
 <222> (29)..(29)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido a condición de que no perturbe el plegamiento tridimensional de la proteína o incluso mejor Lys o Arg
 <220>

45

<221> MISC_FEATURE
 <222> (35)..(35)
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido a condición de que no perturbe el plegamiento tridimensional de la proteína o incluso mejor Tyr o ninguno en absoluto
 <400> 3

Ala Ala Ala Ile Ser Cys Val Gly Ser Xaa Glu Cys Xaa Pro Lys Cys
 1 5 10 15
 Xaa Ala Gln Gly Cys Lys Xaa Gly Lys Cys Met Asn Xaa Lys Cys Lys
 20 25 30
 Cys Tyr Xaa Cys
 35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un péptido aislado y purificado que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 y análogos funcionales equivalentes de los mismos, compartiendo dichos análogos funcionales al menos un 83 % de identidad de secuencias por pares sobre las 36 posiciones alineadas de la SEQ ID NO: 3, siendo dicho péptido capaz de bloquear con gran afinidad y especificidad un canal de potasio Kv1.3.
- 10 2. Un péptido tal como se define en la reivindicación 1, para su uso en la atenuación de una vía de serialización de calcio en células de linfocito T de un mamífero, en el que el uso comprende poner en contacto una población de las células de linfocito T con el péptido, preferiblemente en el que dicho mamífero es un ser humano.
- 15 3. Un método *in vitro* para inhibir la actividad de los canales de potasio Kv1.3 en una célula de mamífero, que comprende poner en contacto la célula de mamífero con una cantidad efectiva de un péptido tal como se define en la reivindicación 1 o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, preferiblemente en el que la célula de mamífero es una célula de linfocito humano.
- 20 4. Un método *in vitro* de atenuación de una vía de señalización de calcio en una célula de linfocito T que comprende poner contacto la célula de linfocito T con una cantidad efectiva de un péptido tal como se define en la reivindicación 1.
- 25 5. Un péptido tal como se define en la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable para su uso en la supresión del proceso de activación de las células T en el sistema inmune de un mamífero, en el que el uso comprende poner en contacto una población de las células T con el péptido, preferiblemente en el que el mamífero es un ser humano.
- 30 6. El péptido de la reivindicación 5, en el que la activación de las células T es causada por una respuesta inmune en el mamífero, preferiblemente en el que la respuesta inmune es el resultado del rechazo de órganos heterólogos o preferiblemente en el que la respuesta inmune es el resultado de una enfermedad autoinmune.
- 35 7. Una composición que comprende un péptido tal como se define en la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en la supresión de una respuesta autoinmune en mamíferos, preferentemente en la que la respuesta inmune es el resultado del rechazo de órganos heterólogos o preferentemente en la que la respuesta inmune es el resultado de una enfermedad autoinmune.
- 40 8. Una composición que comprende un péptido tal como se define en la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo para su uso en el tratamiento terapéutico o profiláctico del rechazo de órganos heterólogos en un sujeto en necesidad del mismo, preferiblemente en la que el órgano rechazado es un corazón, un pulmón, un hígado, un riñón o un páncreas, o en la que el sujeto en necesidad de dicho tratamiento es un ser humano.
- 45 9. Una composición que comprende un péptido tal como se define en la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable de mismo para su uso en el tratamiento terapéutico o profiláctico de una enfermedad autoinmune asociada a linfocitos T_{EM} en un sujeto en necesidad del mismo, preferiblemente en la que el sujeto en necesidad de dicho tratamiento es un ser humano, o en la que la enfermedad autoinmune asociada a linfocitos T_{EM} se selecciona del grupo que consiste en esclerosis múltiple, artritis reumatoide, diabetes tipo I, psoriasis autoinmune, lupus eritematoso, colitis ulcerosa, oftalmia simpática, enfermedad periodontal y reabsorción ósea, púrpura trombocitopénica inmune y síndrome linfoproliferativo autoinmune.
- 50 10. La composición de la reivindicación 9, que además comprende al menos un agente inmunosupresor adicional adecuado para ser administrado al sujeto, preferiblemente en la que el agente inmunosupresor adicional se selecciona del grupo que consiste en ciclosporina, rapamicina, azatioprina, prednisona, toxina ShK, derivados de ShK y desoxispergualina, sus derivados, o una sal del mismo.
- 55 11. Una composición farmacéutica que comprende al menos un péptido tal como se define en la reivindicación 1, o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo, y un portador farmacéuticamente aceptable, y opcionalmente al menos un agente inmunosupresor adicional, preferiblemente en la que el agente inmunosupresor adicional opcional se selecciona del grupo que consiste en ciclosporina, rapamicina, azatioprina, prednisona, toxina ShK, derivados de ShK y desoxispergualina, sus derivados, o una sal del mismo.
- 60 12. La composición de la reivindicación 8 o la reivindicación 9, que es adecuada para ser administrada por vía tópica, sistémica, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, subcutánea, intranasal, transdérmica, oral, o mediante inyección intradérmica, instilación endobronquial, por vía gastrointestinal, o por vía transmucosa.
- 65 13. El péptido de la reivindicación 1, el cual además comprende un resto de marcado.

14. El péptido marcado de la reivindicación 13, en el que el resto de marcado se selecciona del grupo que consiste en un isótopo radiactivo, un resto fluorescente, un resto quimioluminiscente, un cromóforo, un ligando tal como biotina y una proteína, preferiblemente en el que la proteína de marcado es un anticuerpo o una proteína verde fluorescente o una proteína derivada de la proteína verde fluorescente con espectros de emisión diferentes.

5 15. Un método *in vitro* para la identificación de las células que expresan canales Kv1.3 que comprende las etapas de: a) poner en contacto una población de las células blanco con un péptido marcado tal como se define en la reivindicación 13 o la reivindicación 14; b) detectar el péptido marcado unido a los canales de potasio Kv1.3
10 presentes en dicha población de las células blanco por una técnica de detección, preferiblemente en el que las células son linfocitos humanos.

16. Un método *in vitro* para cuantificar el número de canales Kv1.3 expresados en una célula dada, que comprende las etapas de: a) poner en contacto dicha célula con el péptido marcado tal como se define en la reivindicación 13 o la reivindicación 14; b) detectar y cuantificar el péptido marcado unido a los canales de potasio Kv1.3 presentes en
15 dicha población de las células blanco por técnicas de detección cuantitativa, preferiblemente en el que las células son linfocitos humanos.

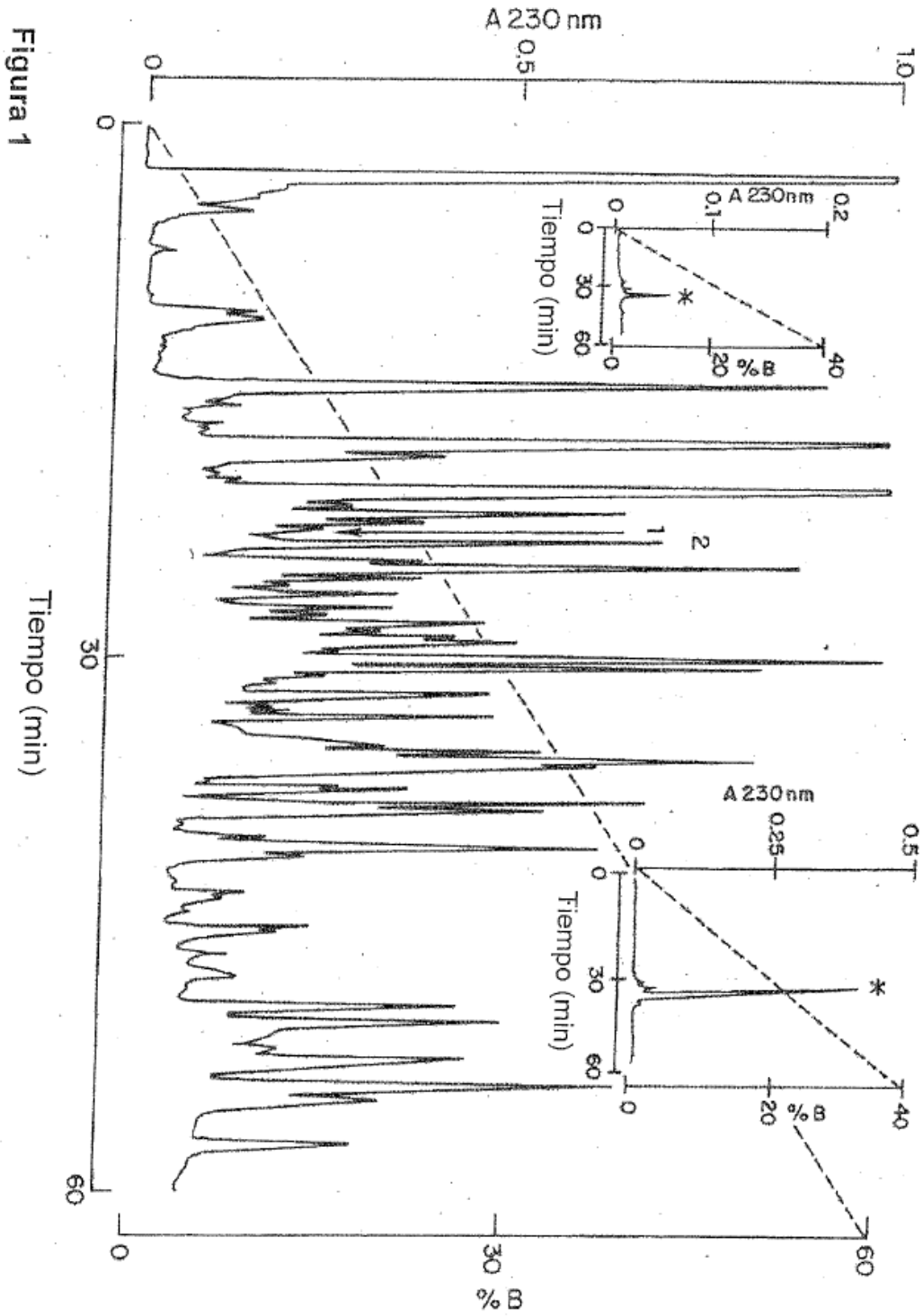


Figura 1

1/24

2/24

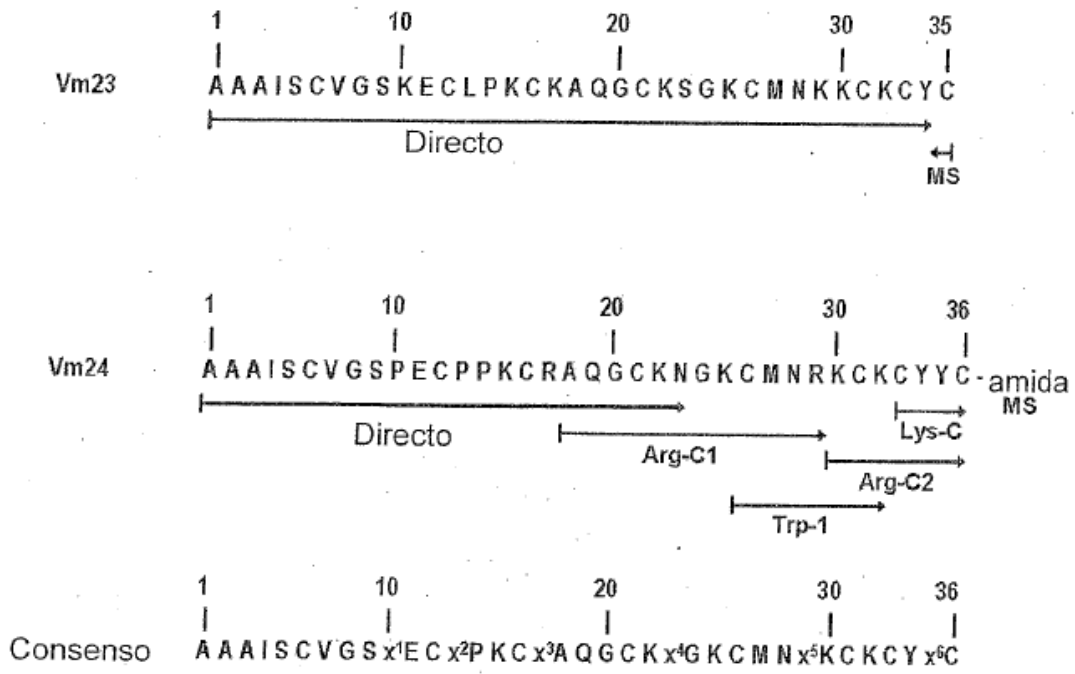


Figura 2

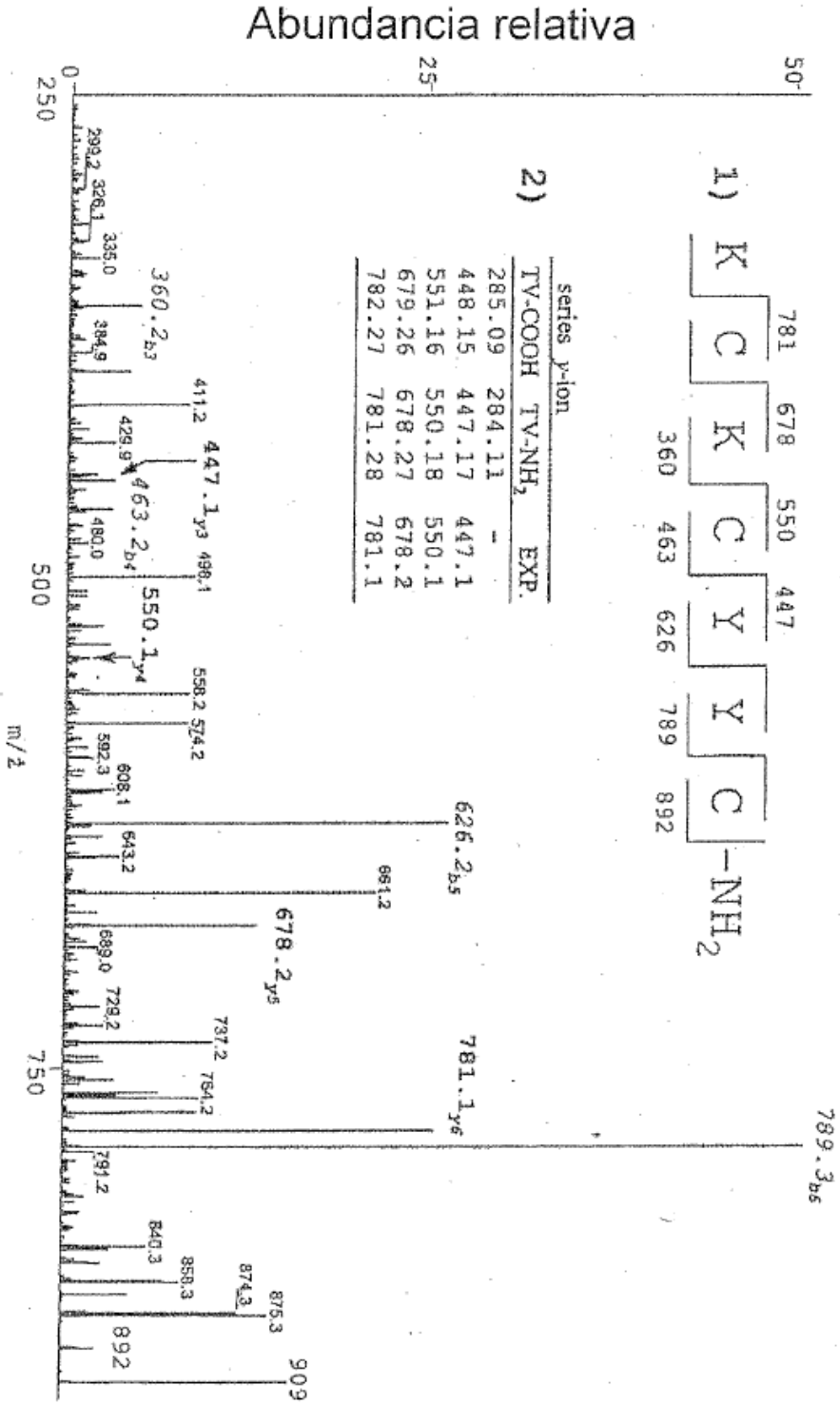


Figura 3

4/24

1) $[M + H]^+$ 788.0

A Q G C K

|
Y C

2) $[M + H]^+$ 560.4

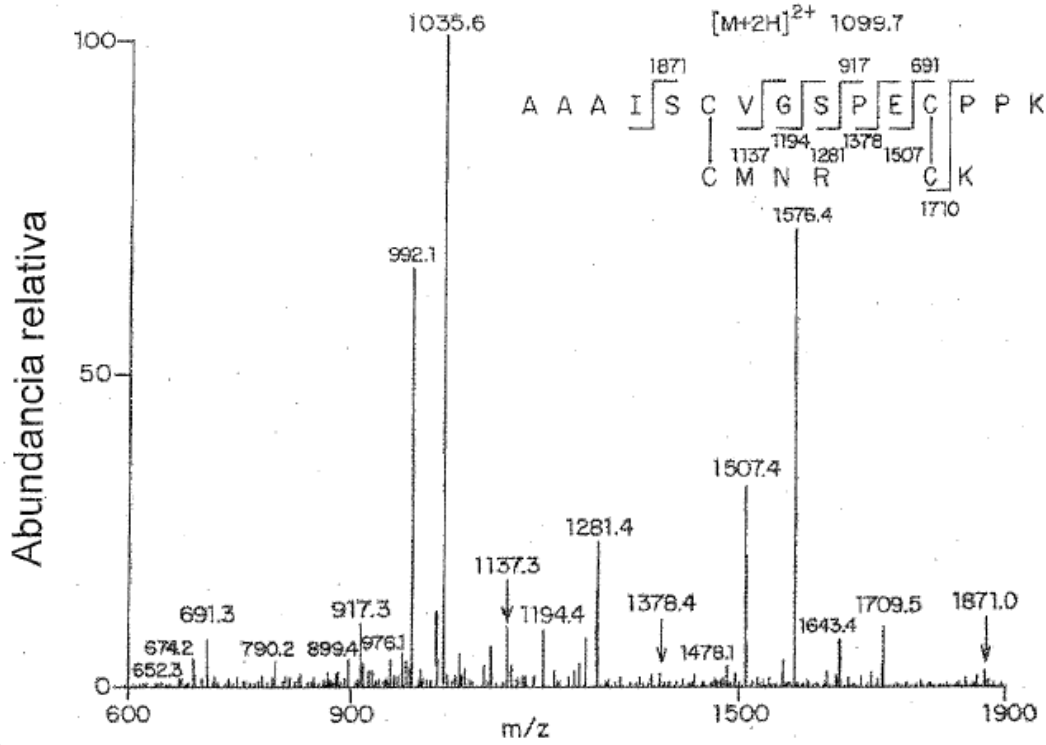
C R

|
C Y

Figura 4

5/24

A)



B)

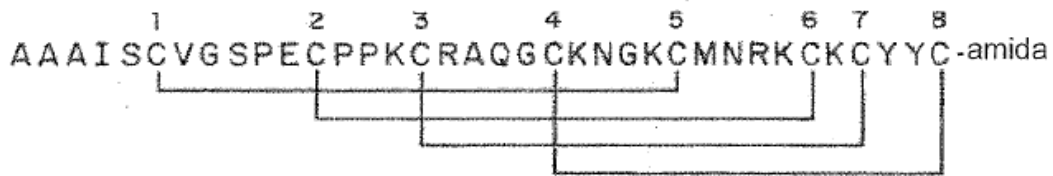


Figura 5

6/24

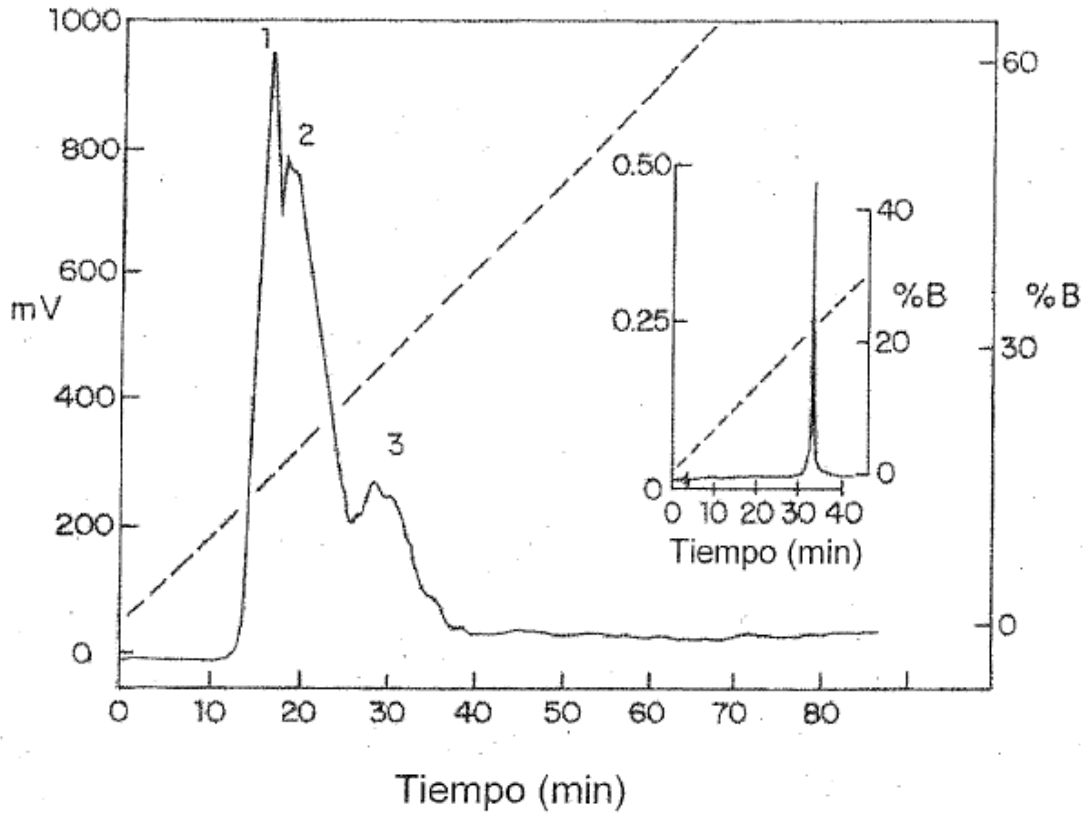


Figura 6

7/24

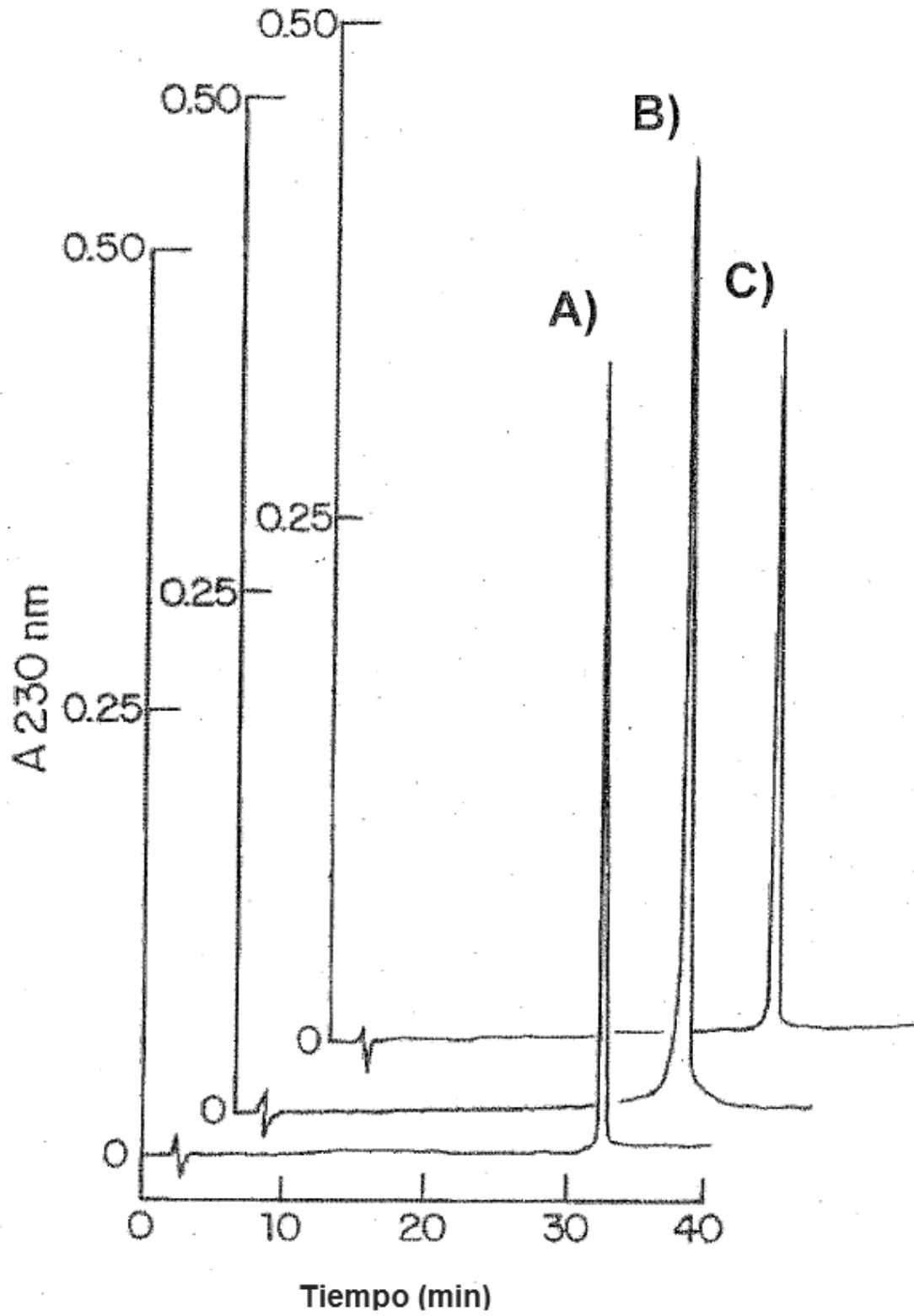


Figura 7

8/24

A)

ALINEAMIENTO MULTIPLE DE SECUENCIAS (CLUSTAL_X)

Nombre	Secuencias Alineadas	%I
Vm24	AAAI SCVGSPECPPKRAQG -CKNGKCMNRKCKCYC ---	100
Vm23	AAAI SCVGS KECLPKCKAQG-CKSGKCMNKKCKCY-C---	83
6.1 Pi1 Q10726	---VKCRGTSDCGRPCQQQTGCPNSKCI NRMCKCYGC ---	43
6.2 Maurotoxin P80719	---VSCTGSKDCYAPCRKQTGCPNA KCINKSCKCYGC ---	49
6.3 HsTx1 P59867	---ASCRTPKDCADPCRKETGCPYGKCMNRKCKCNRC ---	46
6.4 Pi4 P58498	IEAIRCGGSRDCYRCPQKRTGCPNAKCINKTCKCYGCS --	45
6.5 Pi7 P58490	DEAIRCTGTKDCYI PCRYITGCFNSRCINKSCKCYGCT --	42
6.6 OcKTx1 AAP73817	AEVIKCRTPKDCAGPCRKQTGCPHGKCMNRTCRCNRC ---	46
6.7 OcKTx2 AAP73818	AEVIKCRTPKDCADPCRKQTGCPHGKCMNRTCRCNRC ---	46
6.8 OcKTx3 AAP73819	AEVIKCRTPKDCAGPCRKQTGCPHAKCMNKTCRCHRC ---	41
6.9 OcKTx4 AAP73820	AEIIRCSGTRECYAPCQKLTGCLNAKCMNKACKCYGCV --	47
6.10 OcKTx5 AAP73821	AEVIRCSGSKQCYGPKQQTGCTNSKCMN --CKCYGC ---	51
6.12 Anuroctoxin P0C166	--QKECTGPQHCTNFCRKN -KCTHGKCMNRKCKCFNCK --	46
6.13 spinoxin lv56	---IRCSGSRDCYSPCMKQTGCPNAKCINKSCKCYGC ---	46
6.14 HgeTx1	-TGTSCISPKQCTEPCRAKG -CKHGKCMNRKCHCMLCL --	51

Figura 8

9/24

B)

Árbol Filogenético (MrBayes 3.0b4)

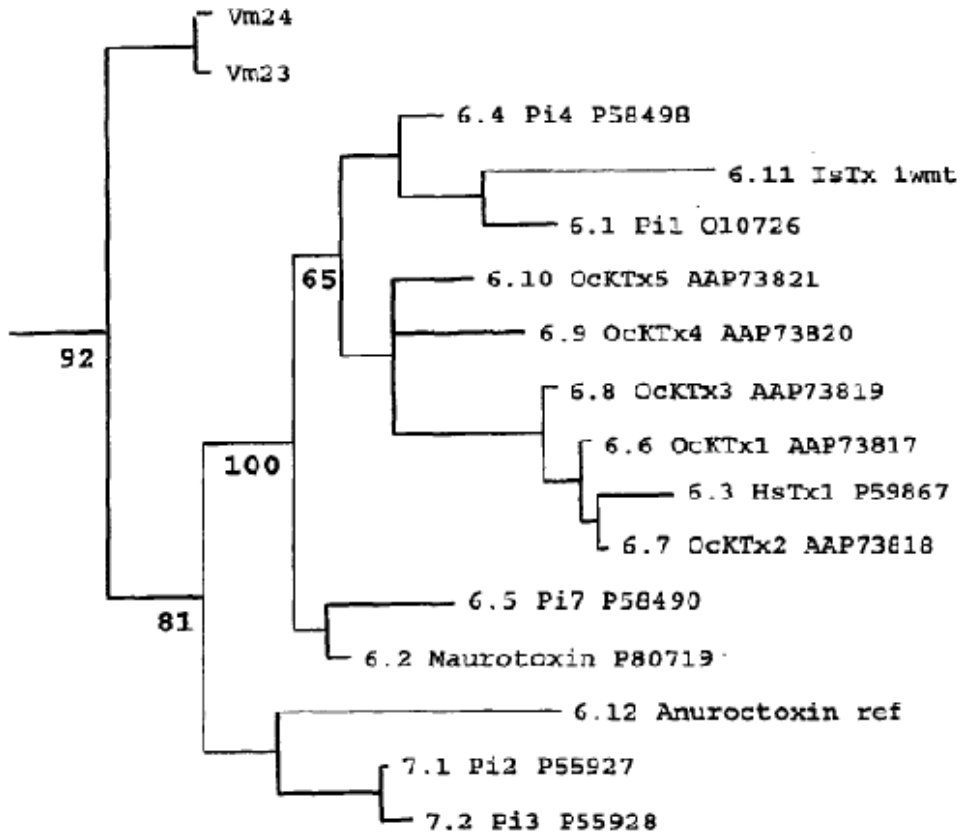


Figura 8

10/24

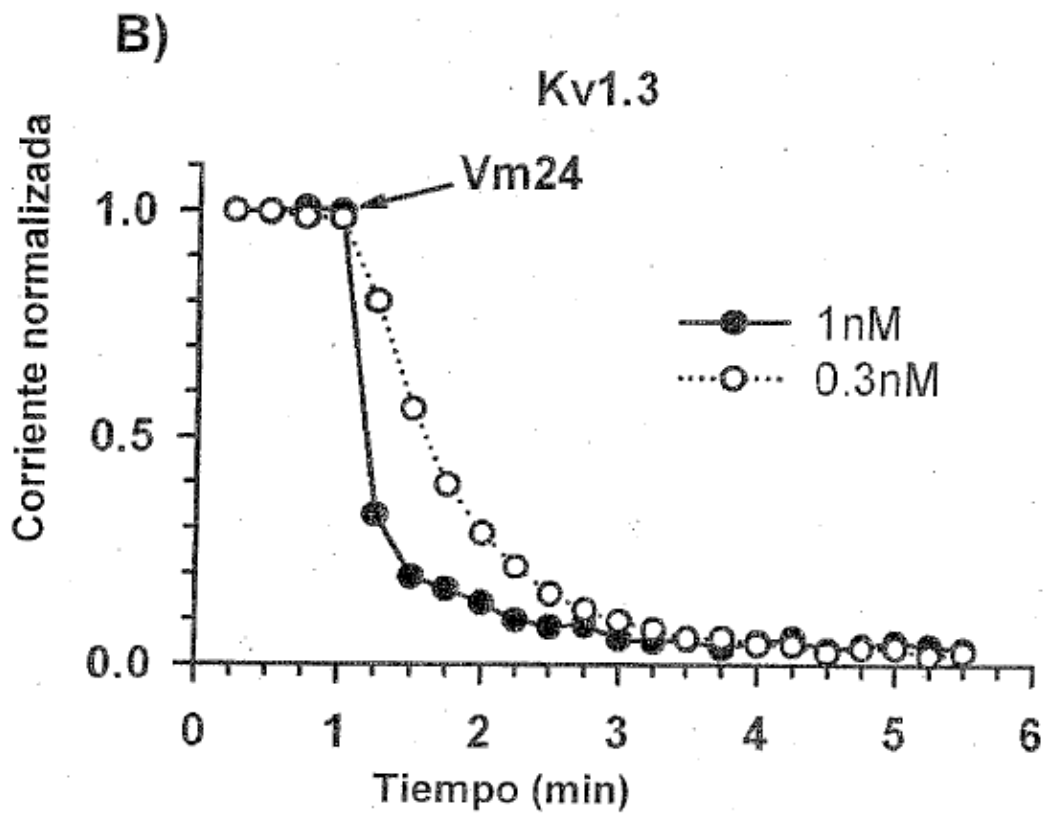
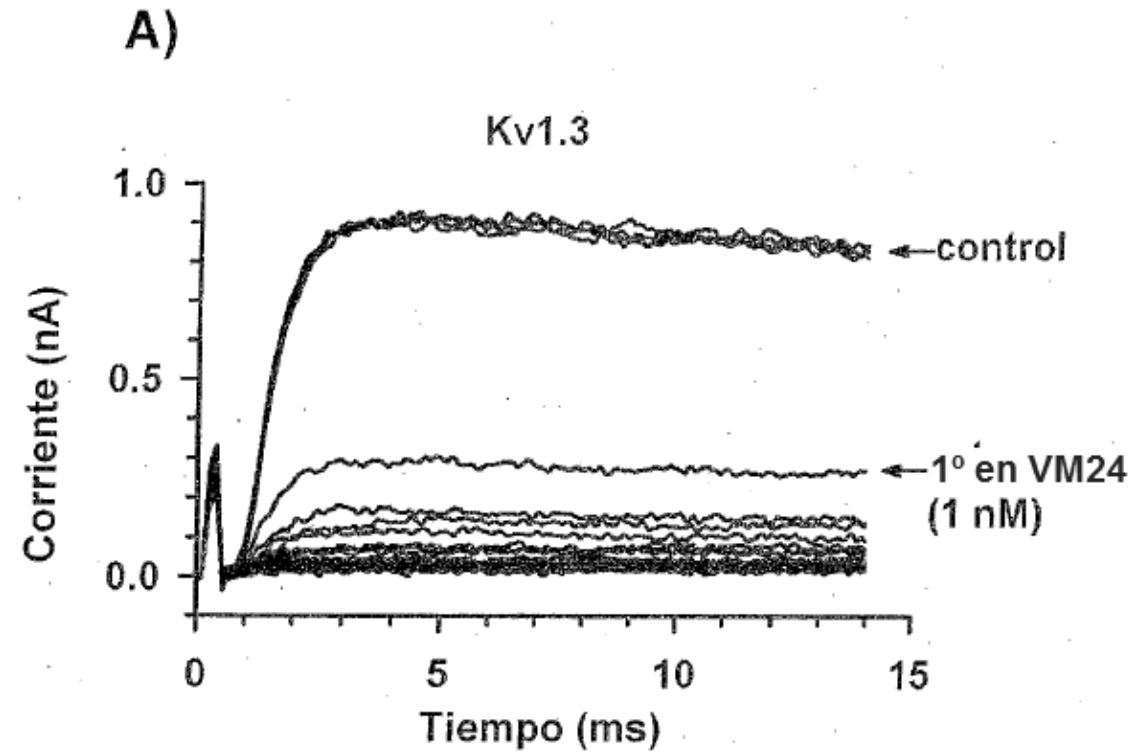
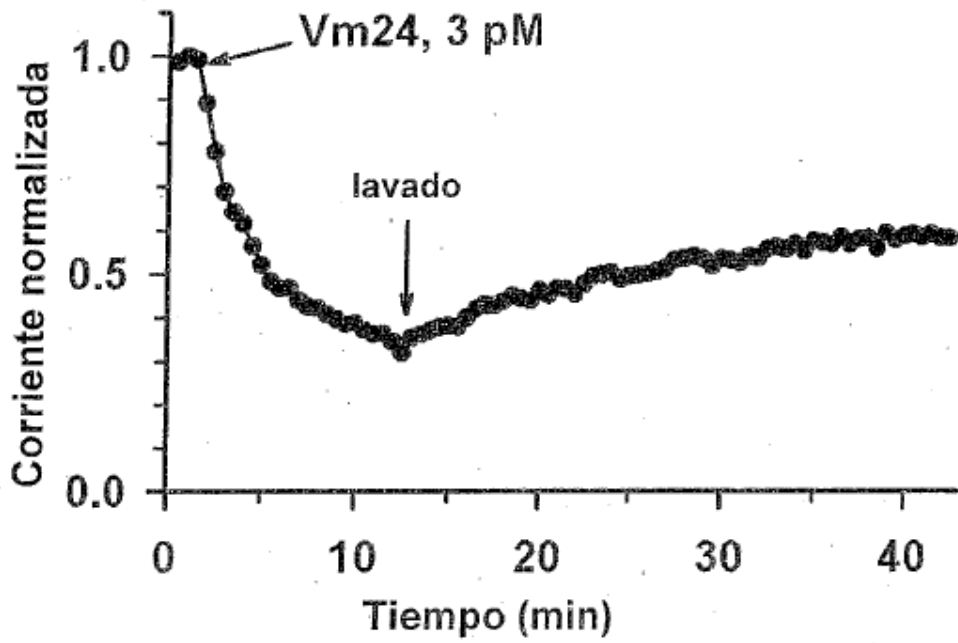


Figura 9

11/24

C)

Kv1.3



D)

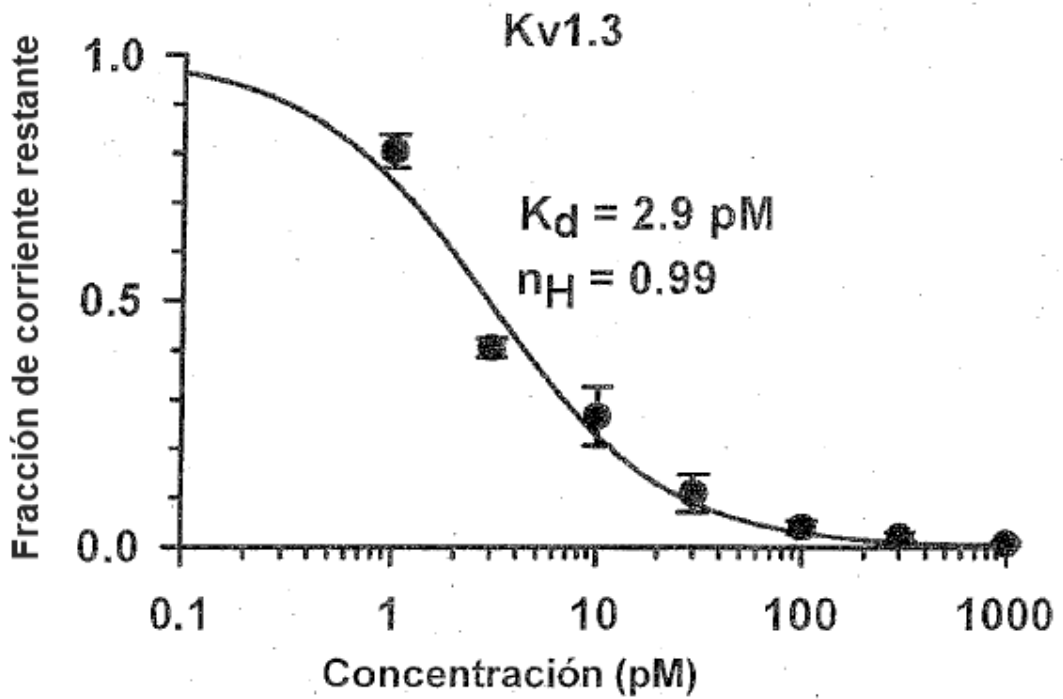


Figura 9

12/24

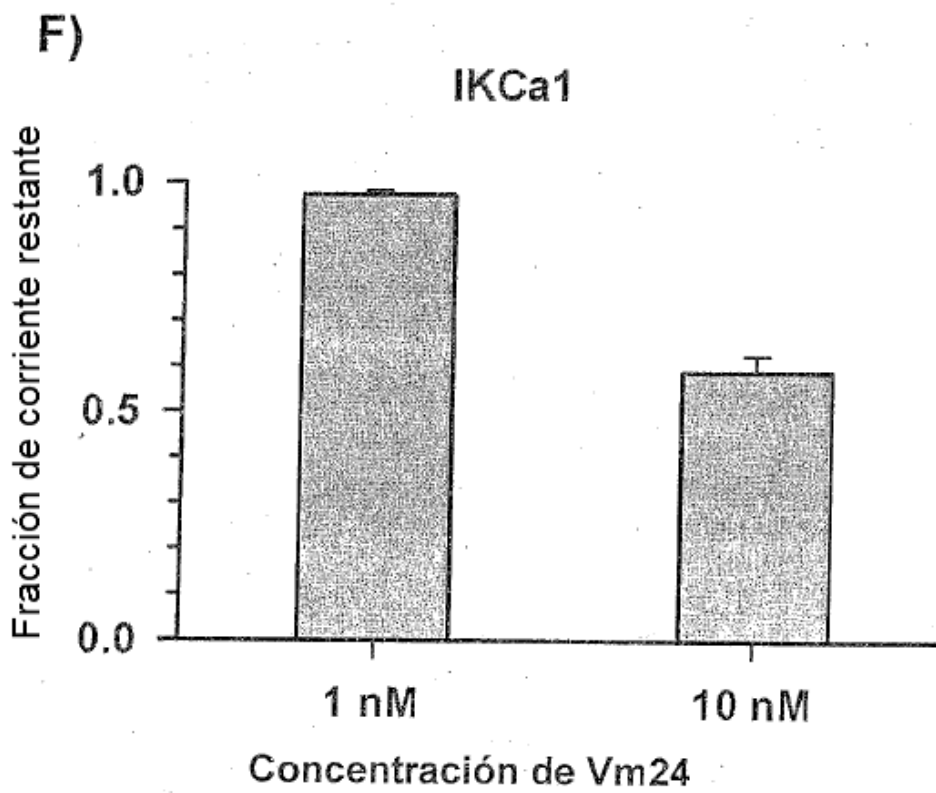
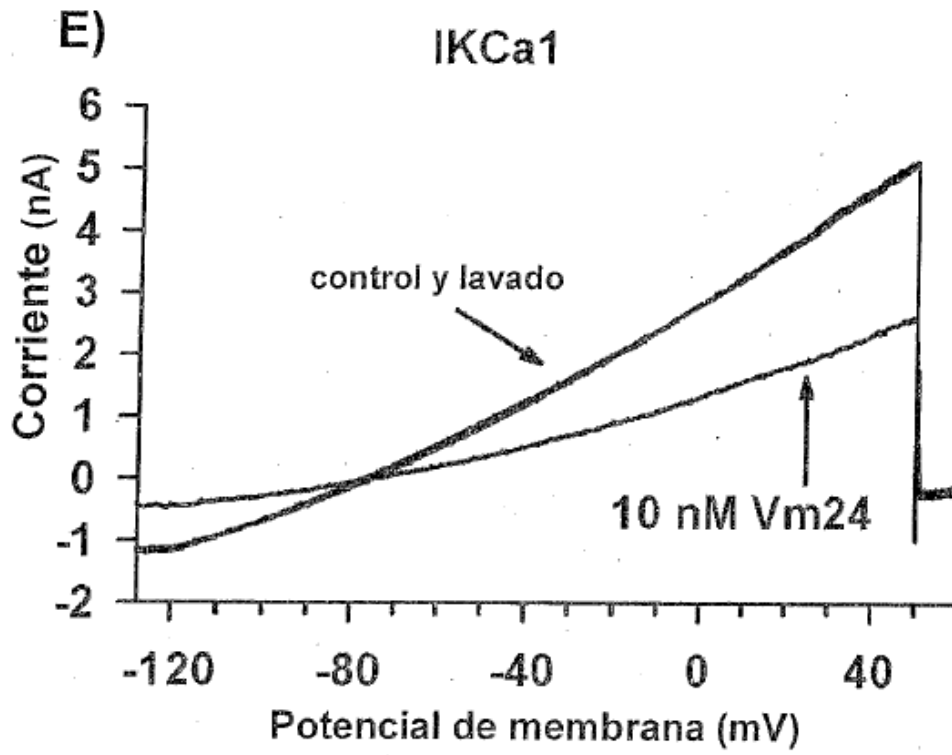


Figura 9

13/24

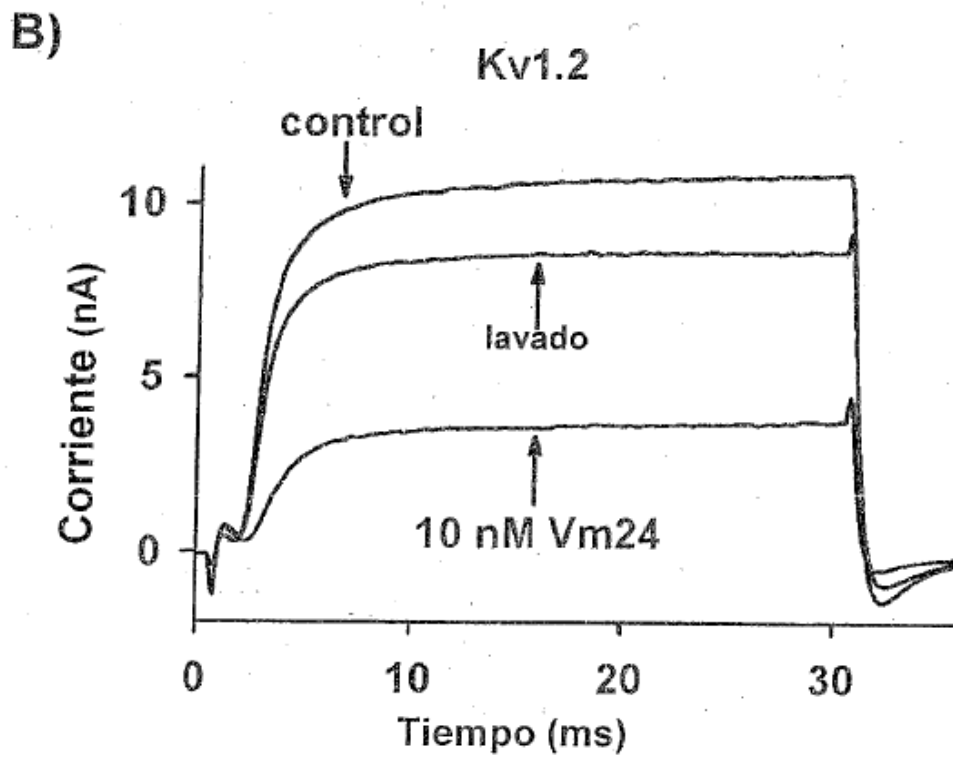
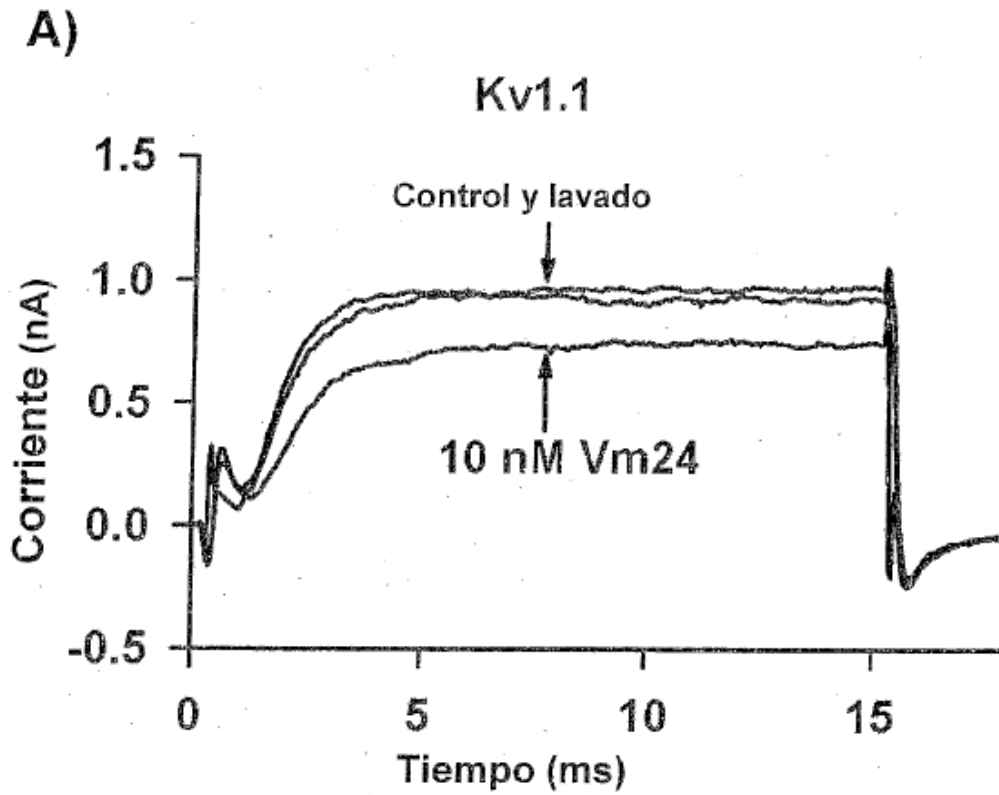


Figura 10

14/24

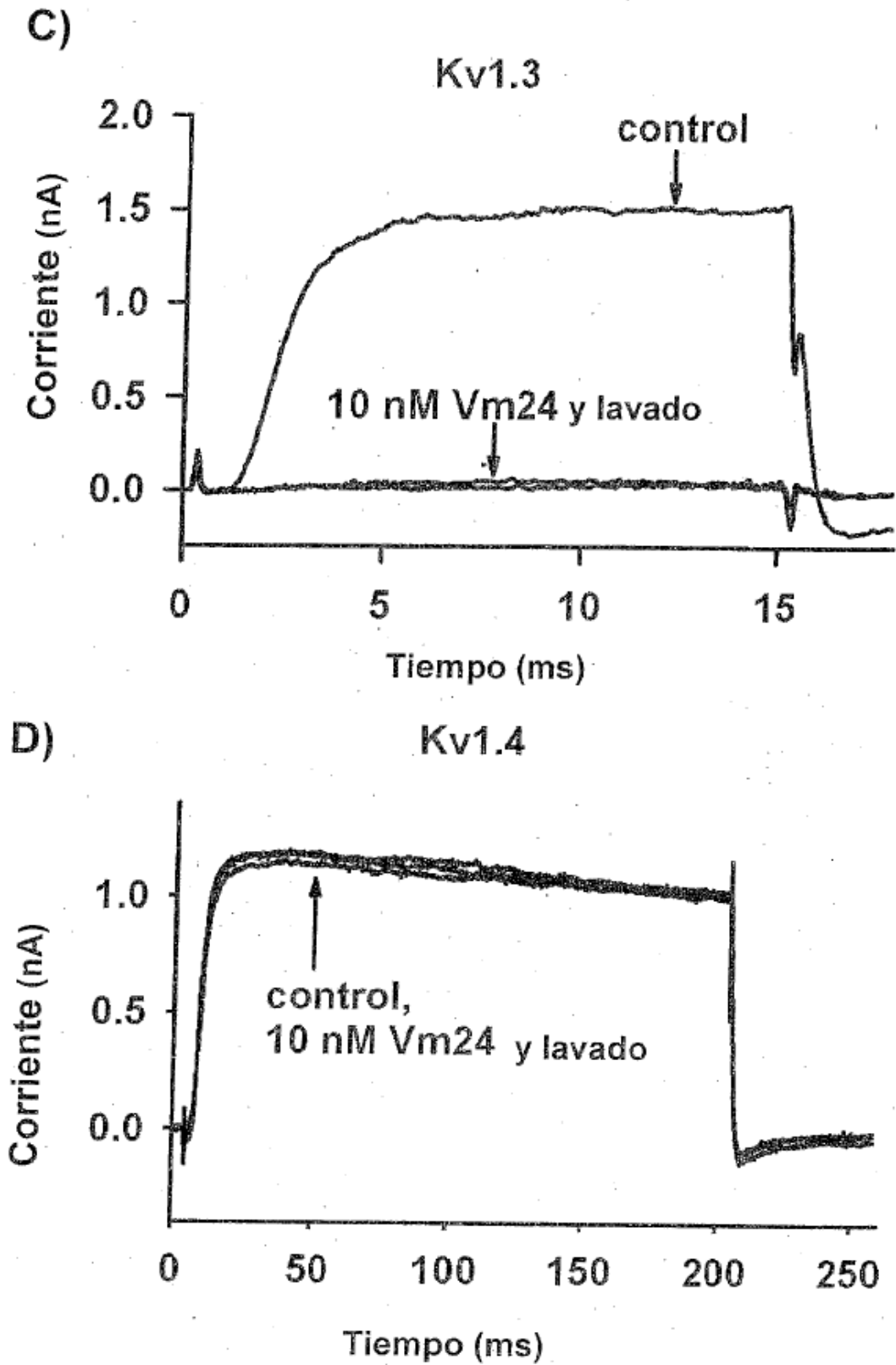


Figura 10

15/24

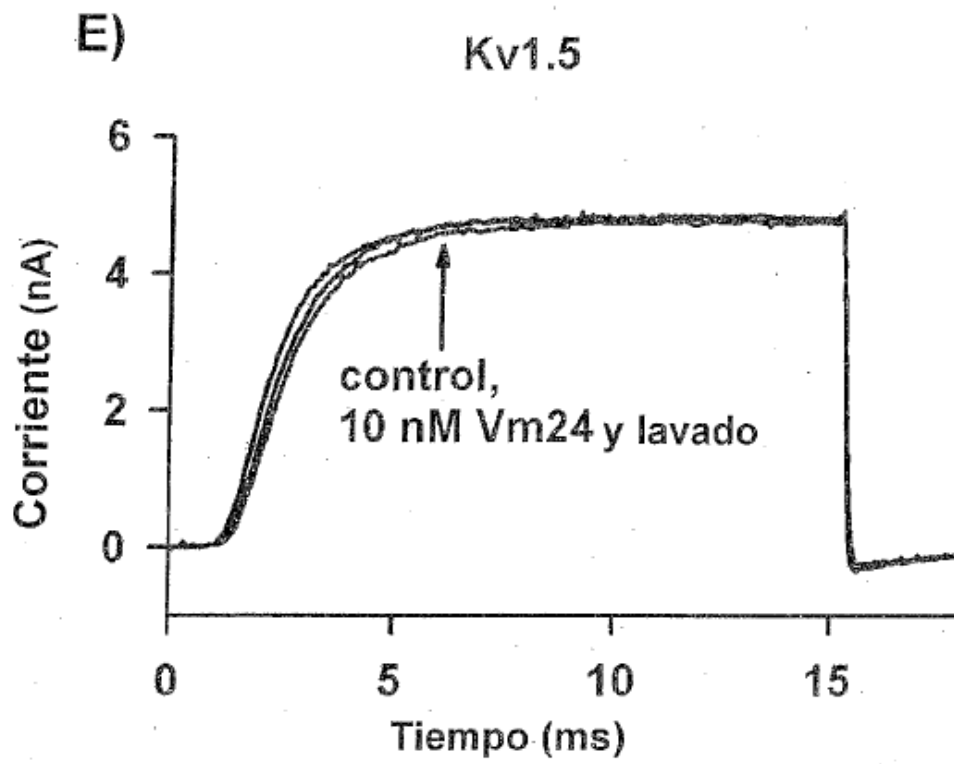


Figura 10

16/24

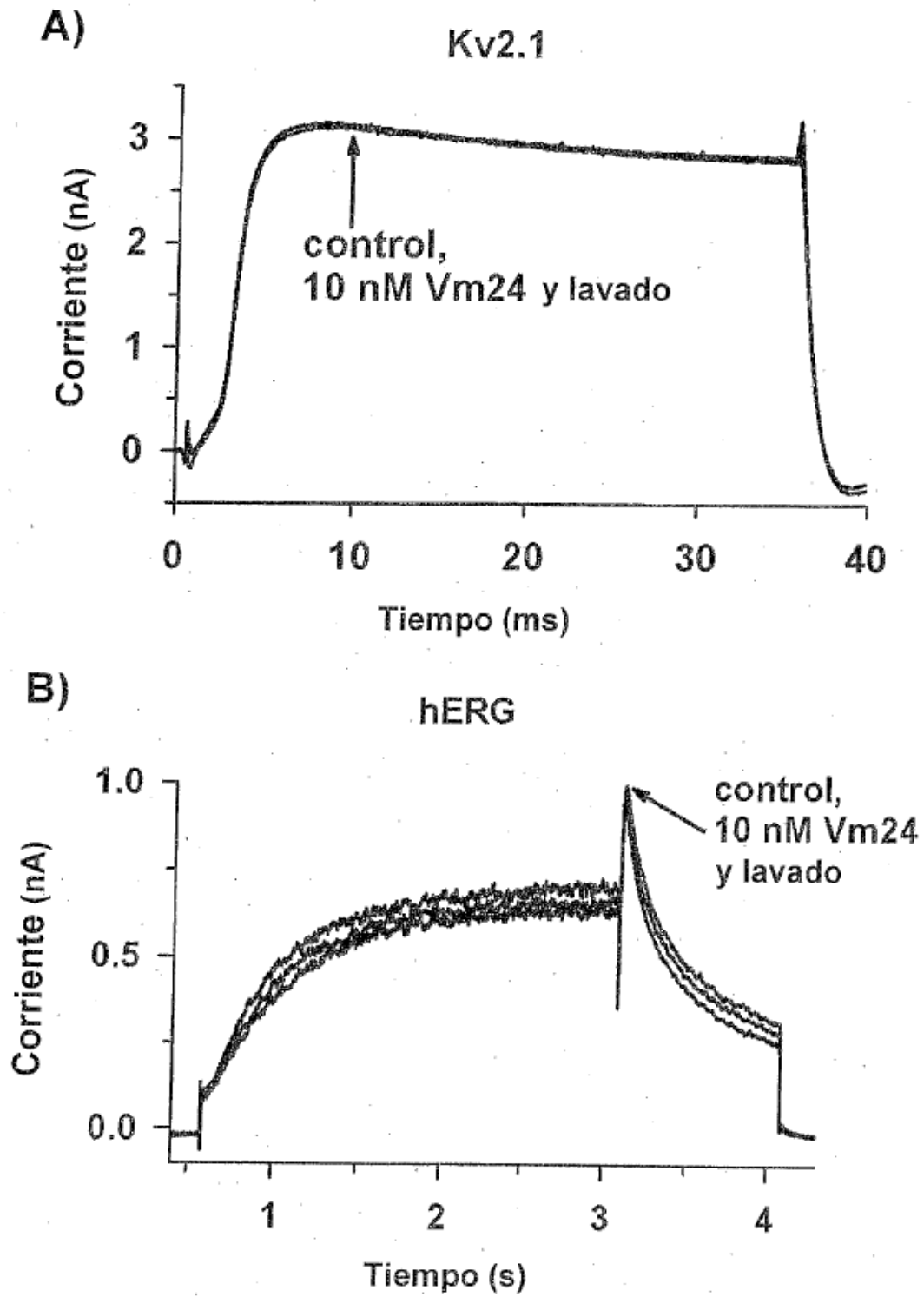
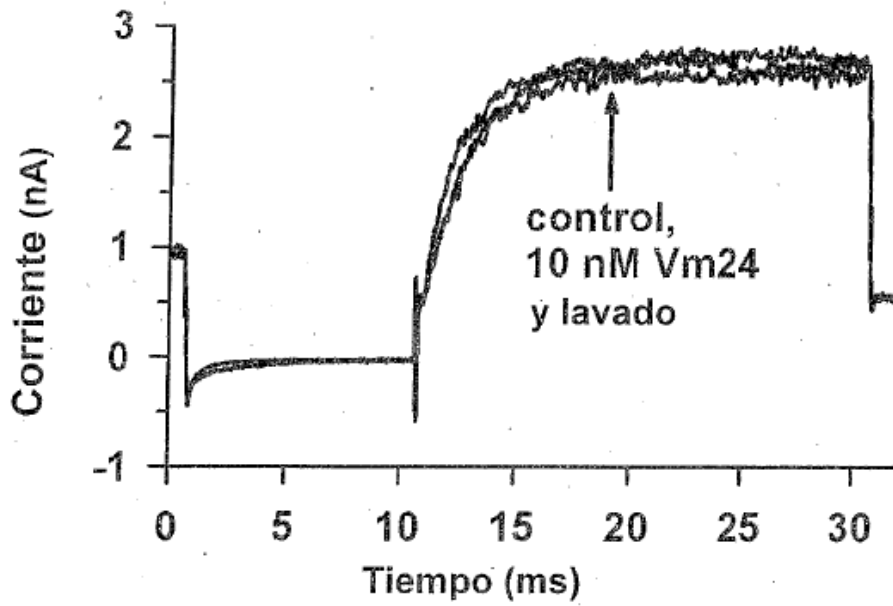


Figura 11

17/24

C)

KCa1.1



D)

Na_v1.5

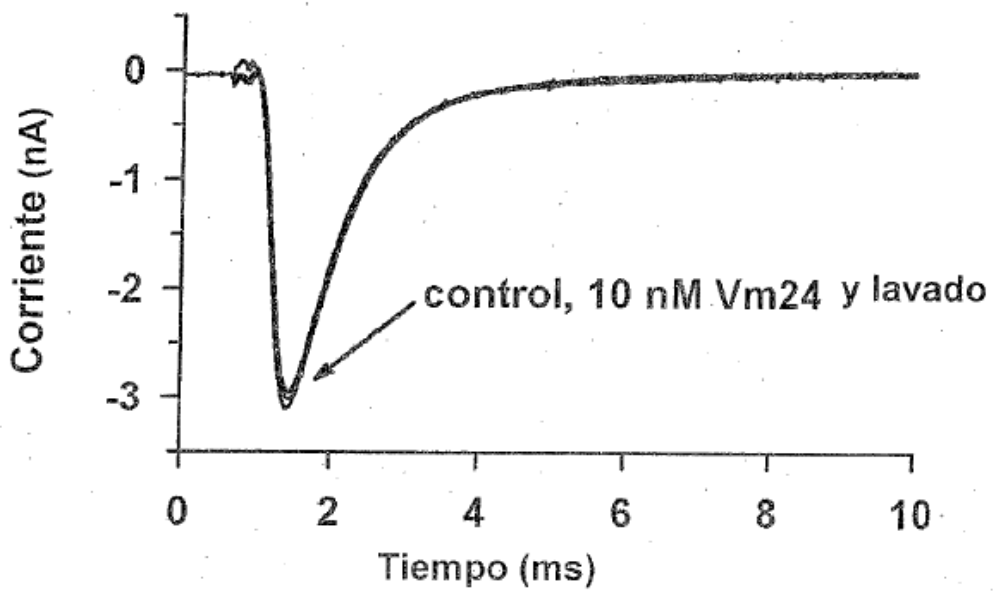


Figura 11

18/24

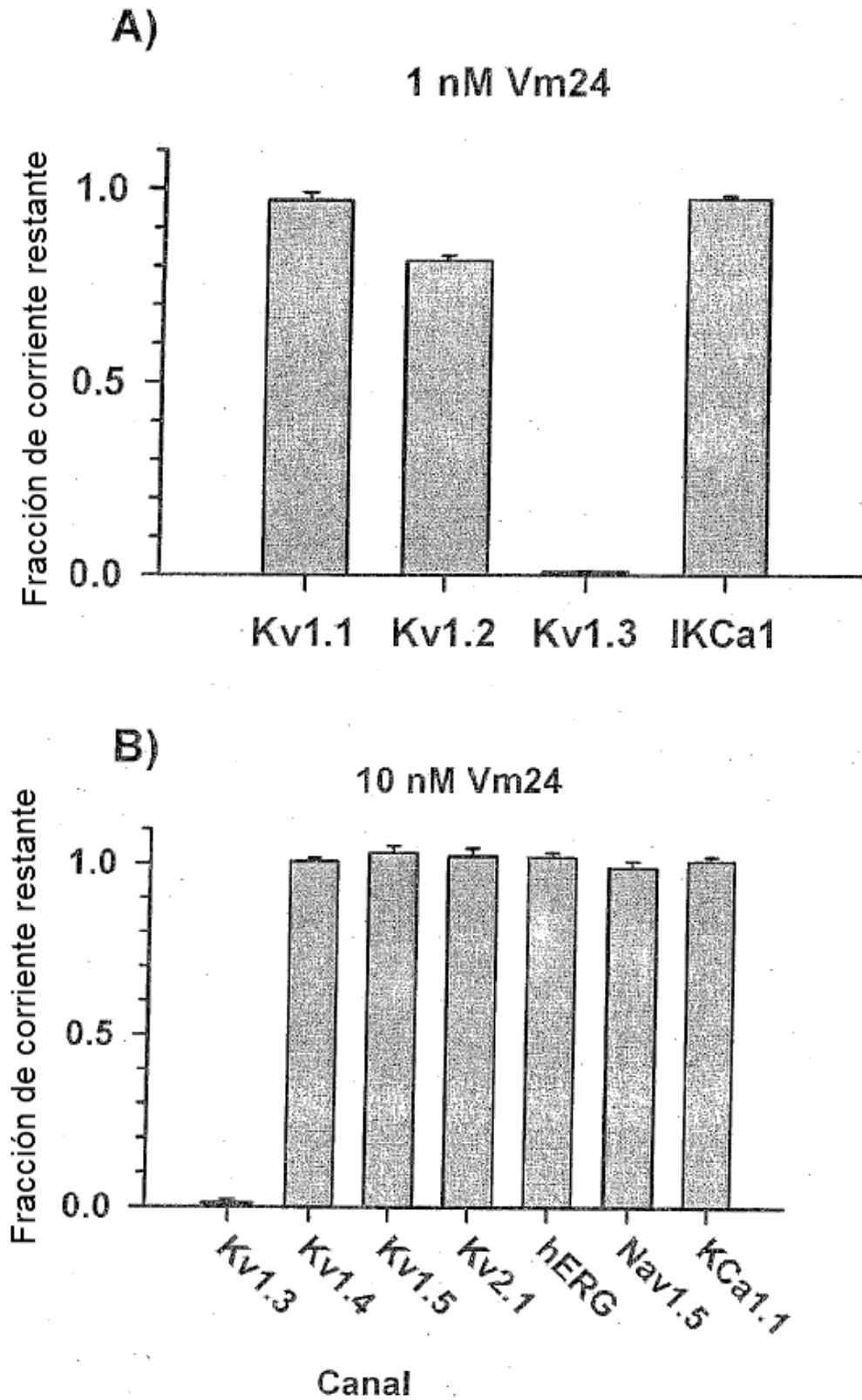


Figura 12

19/24

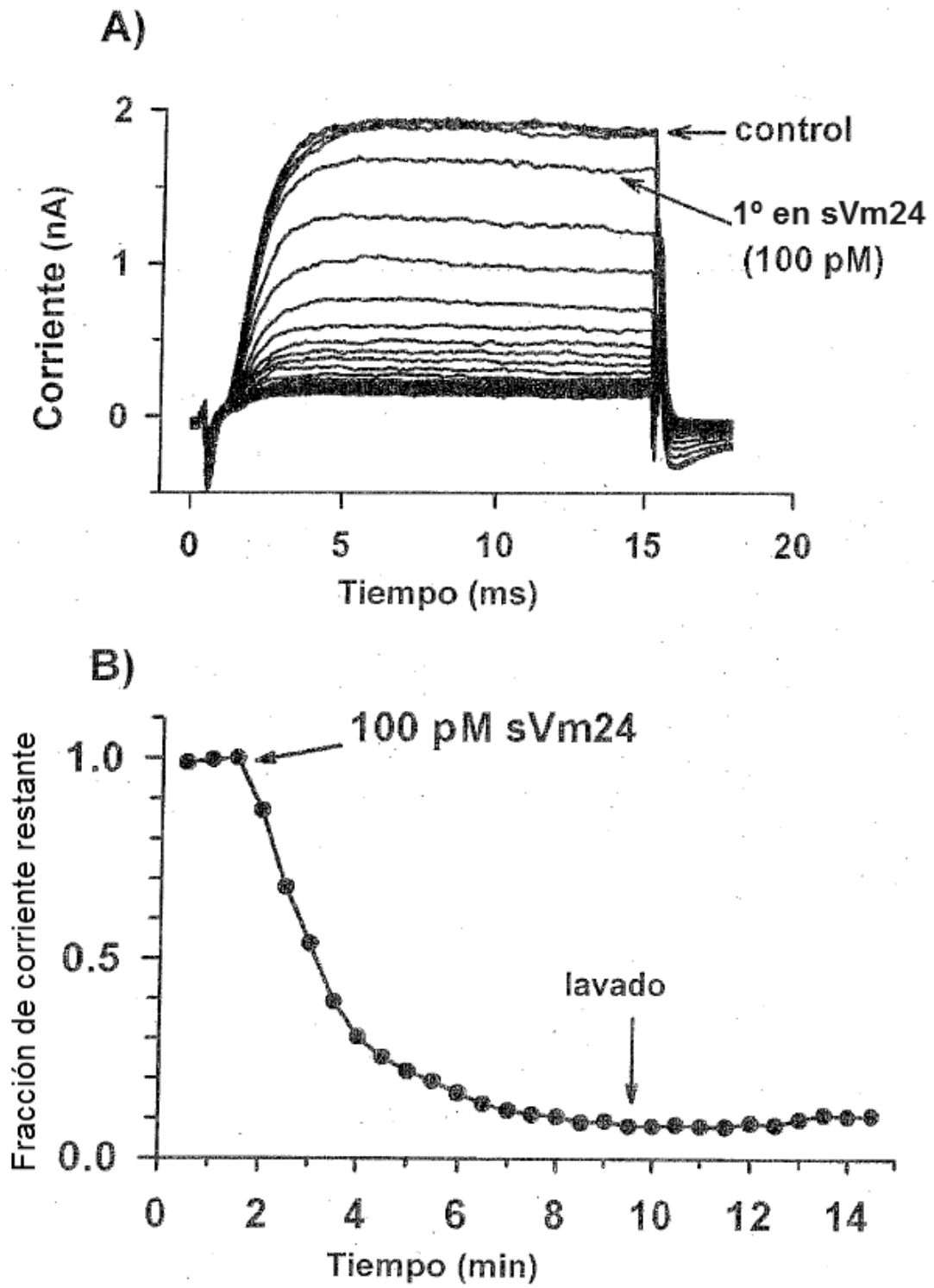


Figura 13

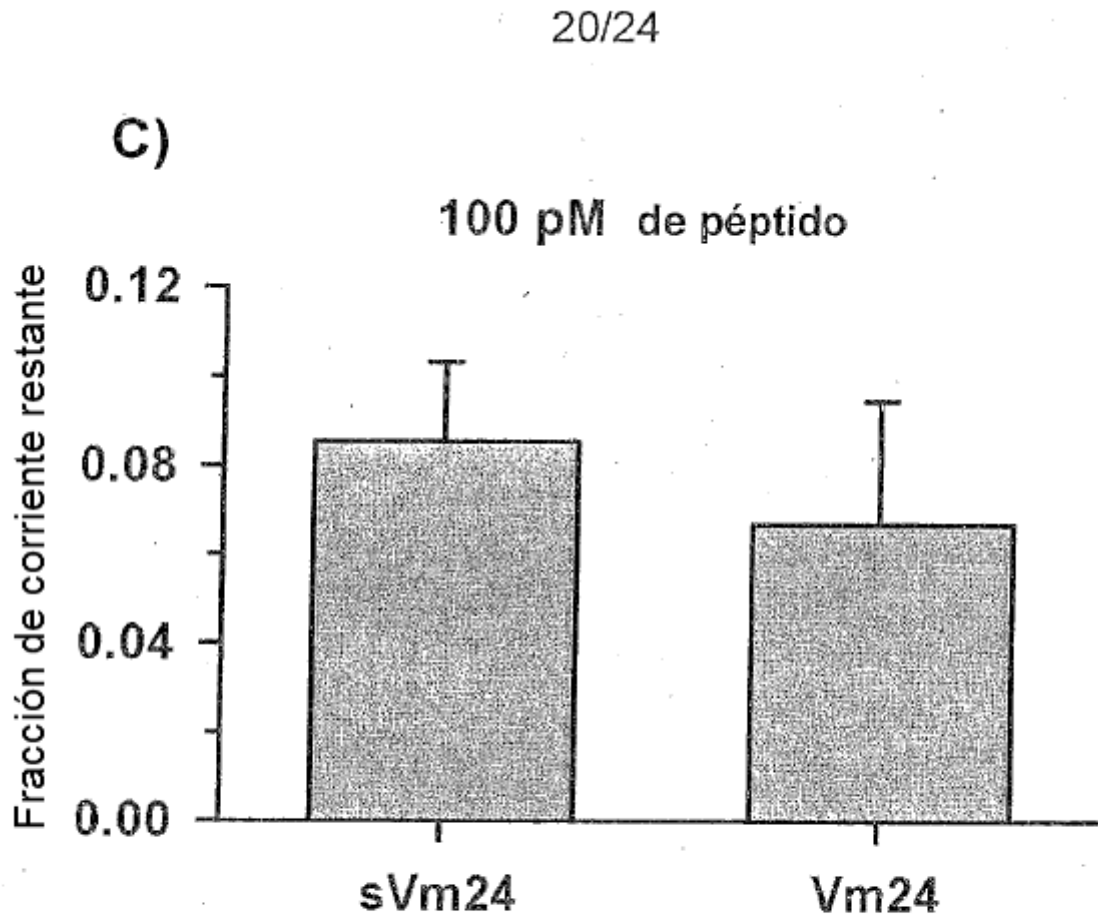


Figura 13

21/24

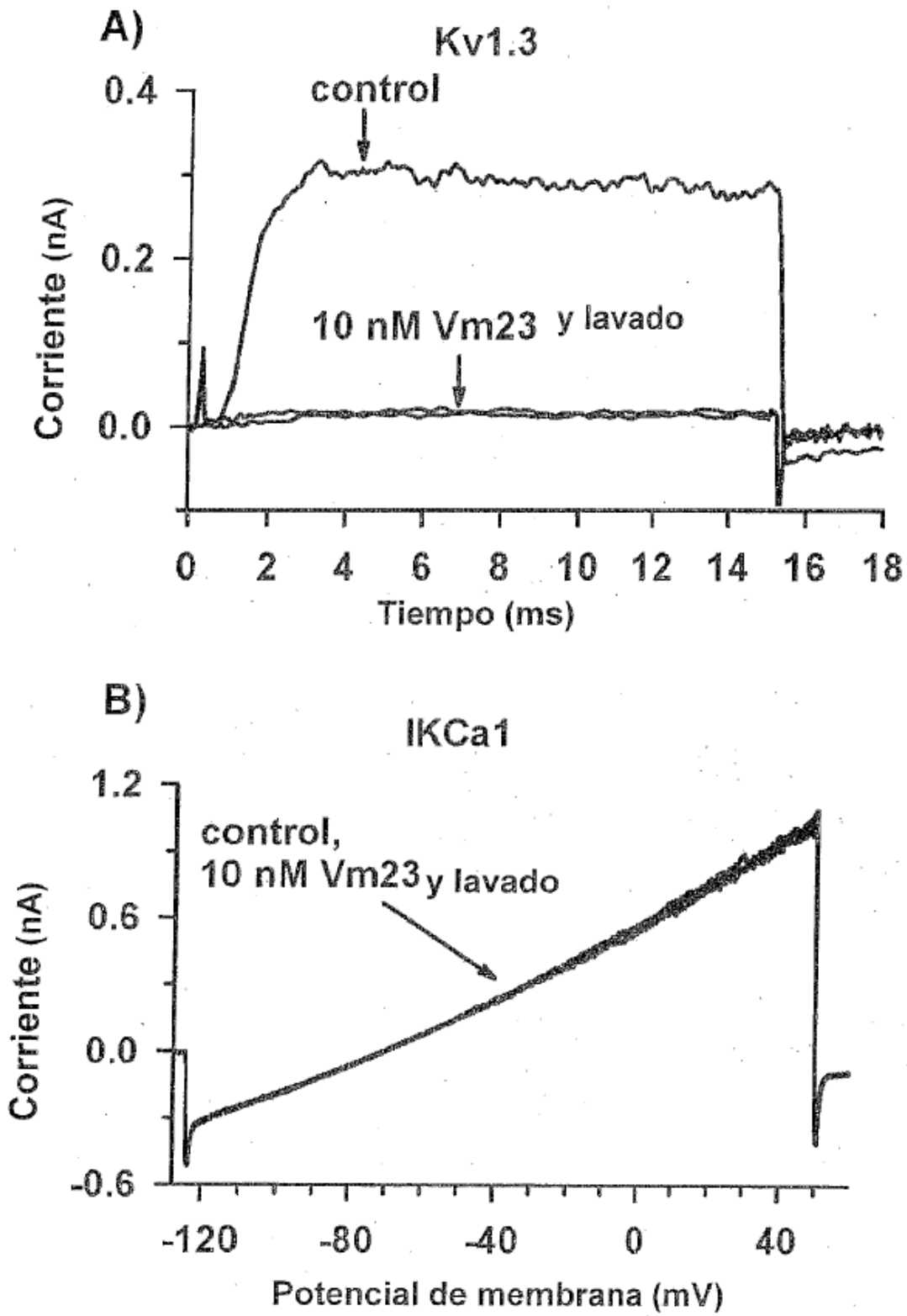


Figura 14

22/24

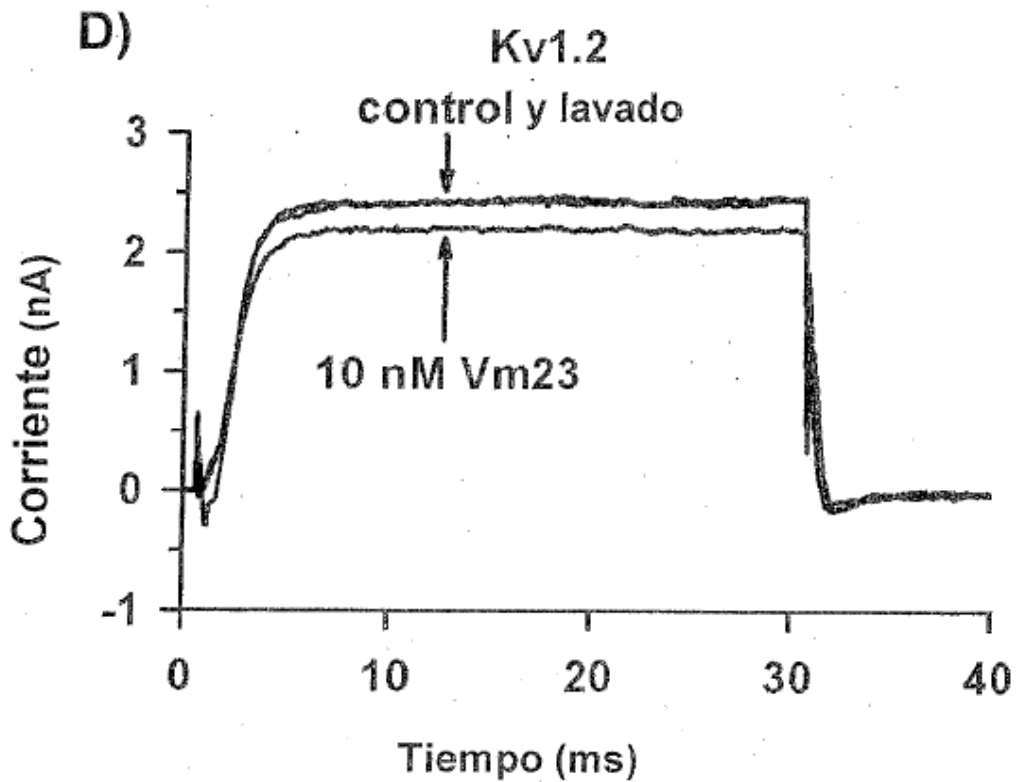
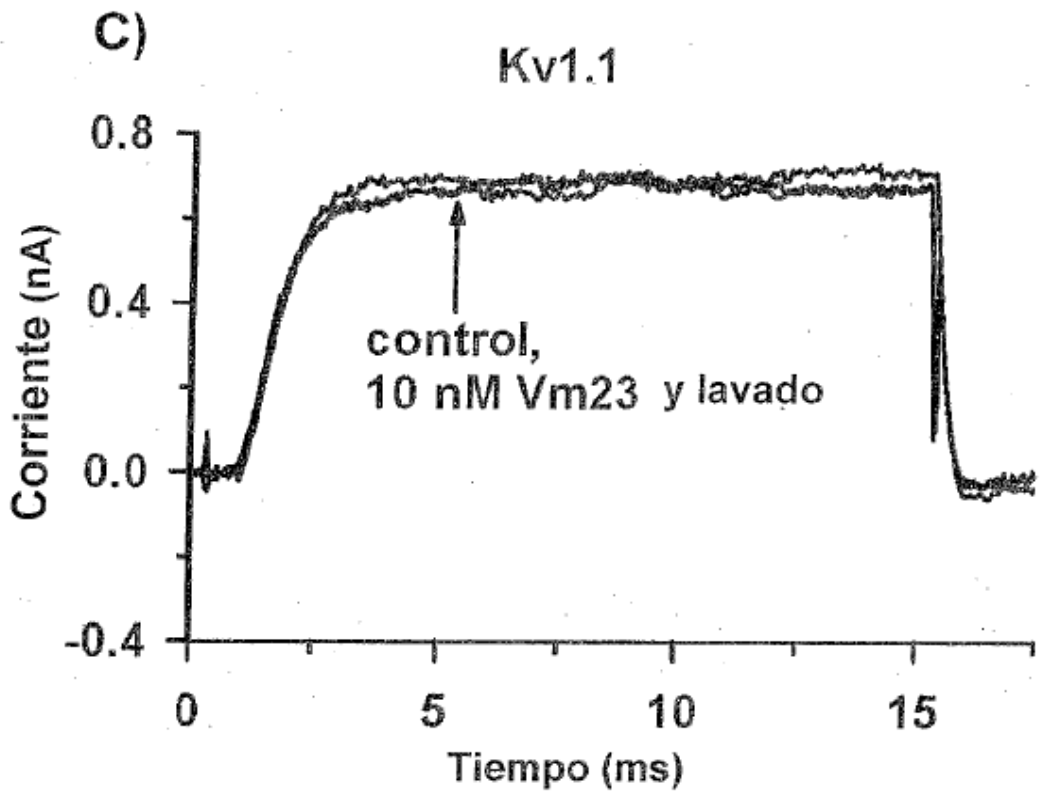


Figura 14

23/24

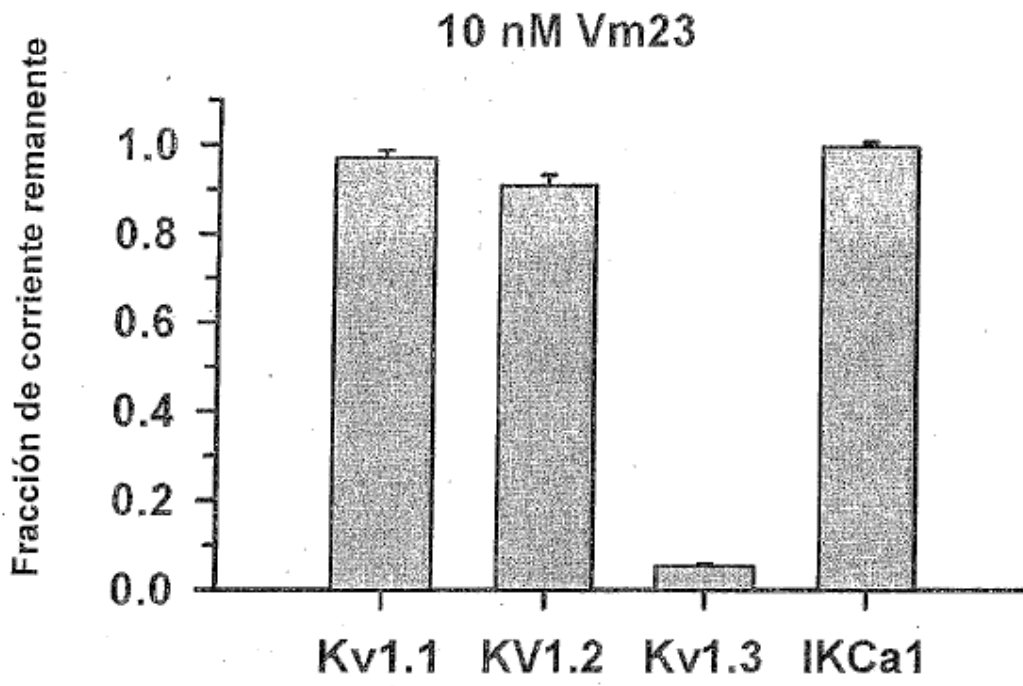


Figura 15

24/24

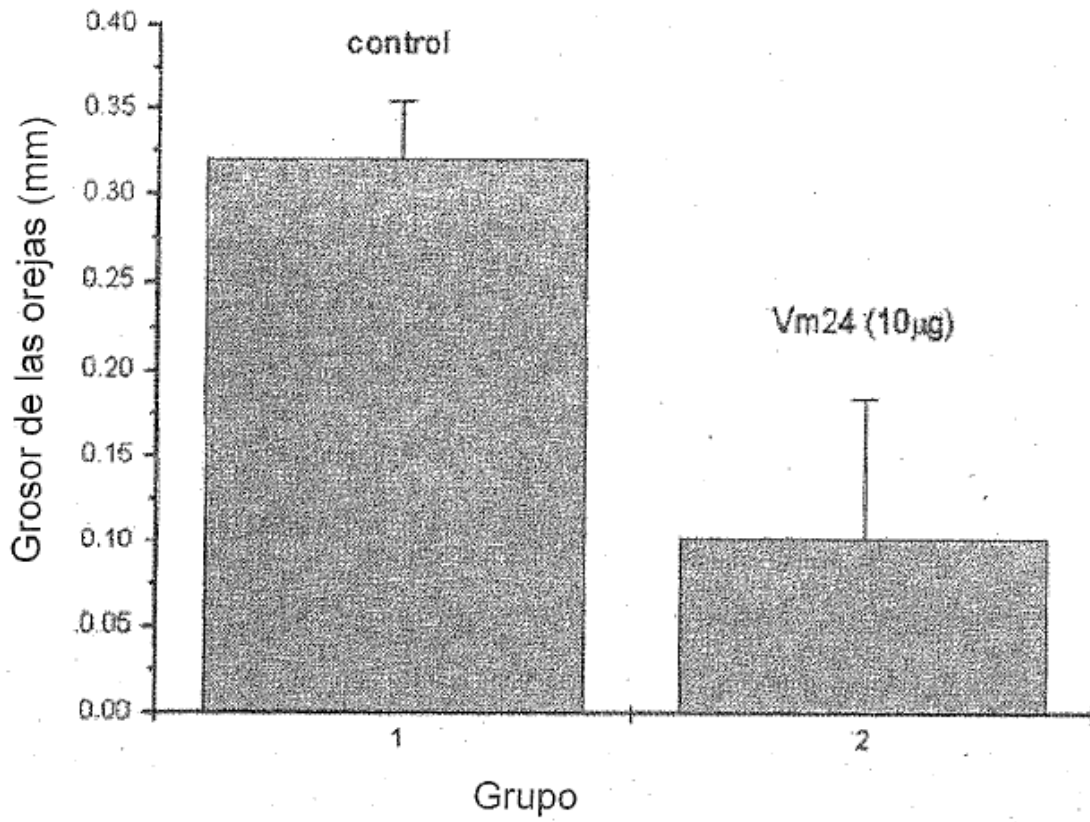


Figura 16