

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 580 233**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.10.2005 E 12152320 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.04.2016 EP 2474316**

54 Título: **Análogos de toxina ShK y sus usos en inhibición selectiva de canales de potasio Kv1.3**

30 Prioridad:

07.10.2004 US 617395 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

22.08.2016

73 Titular/es:

**THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA (50.0%)
1111 Franklin Street, 12th Floor
Oakland, CA 94607, US y
BACHEM AMERICAS, INC. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CHANDY, K., GEORGE;
BEETON, CHRISTINE y
PENNINGTON, MICHAEL**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 580 233 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

Análogos de toxina ShK y sus usos en inhibición selectiva de canales de potasio Kv1.3.

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención proporciona a) composiciones novedosas de materia, b) métodos y kits para la inhibición *in vivo* y/o *in vitro* del canal Kv1.3 en linfocitos T y B y otros tipos de células y c) métodos para tratar trastornos autoinmunes y otros, en sujetos humanos o animales.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las membranas de plasma celular forman las superficies exteriores de las células eucarióticas. Diversos iones (por ejemplo, sodio, potasio, calcio, etc.) entran y salen de las células por difusión pasiva a través de las membranas plasmáticas de las células. Dicha difusión de iones dentro y fuera de las células se facilita por la presencia de "canales de iones" dentro de las membranas celulares. Los canales de iones son proteínas incrustadas dentro de la membrana celular, que controlan el flujo selectivo de iones a través de la membrana, permitiendo de esta manera la formación de gradientes de concentración entre los contenidos intracelulares de las células y el fluido extracelular circundante. Debido a que las concentraciones de iones están involucradas directamente en la actividad eléctrica de las células excitables (por ejemplo, las neuronas), el funcionamiento (o mal funcionamiento) de los canales de iones puede controlar sustancialmente las propiedades eléctricas y el comportamiento de dichas células. De hecho, una diversidad de trastornos, ampliamente denominados "canalopatías", se cree que están vinculados con las insuficiencias o disfunciones de canal de iones.

Los canales de iones se denominan como "regulados", si están abiertos o cerrados. Los tipos básicos de canales de iones regulados incluyen a) canales regulados por ligando, b) canales regulados mecánicamente, y c) canales regulados por voltaje. En particular, los canales regulados por voltaje se encuentran en las neuronas, células musculares y células no excitables, tales como linfocitos. Se abren o cierran en respuesta a cambios en la carga por la membrana plasmática.

30

Canales Kv1.3 y enfermedades autoinmunes.

Las enfermedades autoinmunes, tales como esclerosis múltiple (EM), diabetes mellitus tipo 1 (DMT1), artritis reumatoide (AR) y psoriasis, afectan a varios cientos de millones de personas en todo el mundo. En estos trastornos, se cree que los linfocitos T autorreactivos específicos - por ejemplo, linfocitos T específicos de mielina en pacientes de EM - experimentan una estimulación autoantígeno repetida durante el transcurso de la enfermedad y se diferencian de la células de memoria crónicamente activadas que contribuyen a la patogénesis por migración a los tejidos inflamados y secreción de citocinas (Viglietta y col., 2002; Vissers y col., 1002; Wulff y col., 2003b). Las terapias que se dirigen preferiblemente a los linfocitos T de memoria crónicamente activados tendrán un valor significativo para las enfermedades autoinmunes.

Los linfocitos T de memoria se dividen en dos sub-conjuntos - de memoria central (T_{CM}) y de memoria efectora (T_{EM}) - en base a la expresión del receptor de quimiocina CCR7 y la fosfatasa CD45RA (Geginat y col., 2001; Sallusto y col., 1999). Los linfocitos indiferenciados y T_{CM} se asientan en el nodo linfático antes de migrar a sitios de inflamación, mientras que los linfocitos T_{EM} se asientan directamente en sitios de inflamación donde secretan cantidades copiosas de IFN- β y TNF- α y muestran una función efectora inmediata. Recientemente se ha mostrado que los linfocitos T autorreactivos específicos de mielina en pacientes de EM son linfocitos T_{EM} predominantemente activos (Wulff y col., 2003b), y la transferencia adoptiva de linfocitos T_{EM} de rata activados específicos de mielina en receptores sin tratamiento previo inducen EAE grave (Beeton y col., 2001 a; Beeton y col., 2001 b). Una nueva diana terapéutica excitante para inmunomodulación de linfocitos T_{EM} es el canal de K^+ Kv1.3 regulado por voltaje. Los linfocitos T_{EM} regulan por aumento los canales Kv1.3 tras la activación y su proliferación inducida por antígeno es exquisitamente sensible a bloqueadores de Kv1.3 (Wulff y col., 2003b). Por el contrario, los linfocitos indiferenciados y T_{CM} son significativamente menos sensibles a los bloqueadores de Kv1.3 para empezar y rápidamente se vuelven resistentes al bloqueo de Kv1.3 regulando por aumento el canal de K^+ activado por calcio IKCa1 (Ghanshani y col., 2000; Wulff y col., 2003b).

La dominancia de Kv1.3 en los linfocitos T_{EM} proporciona una potente forma de manipular la actividad de este sub-conjunto con inhibidores de Kv1.3 específicos. La distribución tisular funcionalmente restringida del canal y el hecho de que el bloqueo de Kv1.3 *in vivo* mejora la EAE mediada por T_{EM} , la resorción ósea en una enfermedad

periodontal y reacciones de hipersensibilidad de tipo retardado en modelos animales sin provocar efectos secundarios obvios, ha mejorado lo atractivo de Kv1.3 como una diana terapéutica (Beeton y col., 2001b; Koo y col., 1997; Valverde y col., 2004). Aunque los bloqueadores de Kv1.3 suprimirán todos los linfocitos T_{EM} activados (por ejemplo, linfocitos T_{EM} específicos para antígenos de vacuna), una terapia basada en Kv1.3 será una mejora significativa frente a terapias actuales que modulan amplia e indiscriminadamente todo el sistema inmune. Una ventaja adicional de los bloqueadores de Kv1.3 es que son reversibles. Por lo tanto, se puede valorar el efecto terapéutico de los bloqueadores de Kv1.3 cuando sea necesario y detener la terapia frente a la infección, a diferencia de los agentes quimioterapéuticos, que tardan meses en disminuir.

10 **Canales Kv1.3 y obesidad**

Se descubrió que el canal Kv1.3 tiene una función en la homeostasis energética y el balance energético (Hum Mol Genet 2003 12: 551-9). Los ratones con el canal Kv1.3 genéticamente inactivados fueron capaces de ingerir dietas grasas sin ganar peso, mientras que los ratones de control a los que se les dio la misma dieta tuvieron sobre-peso. El bloqueo farmacológico de los canales Kv1.3 recapituló el efecto de los genes inactivados de los canales Kv1.3. En consecuencia, es probable que bloqueadores de Kv1.3 tengan uso en el manejo de la obesidad.

Canales Kv1.3 y Diabetes Mellitus tipo 2.

Los canales Kv1.3 tienen una función en el aumento regulado de la sensibilidad a la insulina en órganos diana periféricos, tales como el hígado y los músculos (Proc Natl Acad Sci USA. 2004 101: 3112-7). La genética inactivada del canal Kv1.3 en los ratones mejoró la sensibilidad del hígado y el músculo a la insulina. En consecuencia, los bloqueadores Kv1.3 pueden tener utilidad en el tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2 mejorando las acciones periféricas de la insulina, disminuyendo de esta manera los niveles de glucosa en sangre.

25 **Polipéptidos de origen natural conocidos por inhibir los canales Kv1.3**

El inhibidor Kv1.3 más potente es el péptido ShK de la anémona de mar del Caribe *Stichodactyla helianthus*. ShK es un polipéptido de 35 residuos entrecruzado por 3 puentes disulfuro. ShK bloquea Kv1.3 ($K_d = 11$ pM) y suprime la proliferación de linfocitos T_{EM} a concentraciones picomolares, y mejora la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) en ratas inducida por la transferencia adoptiva de linfocitos T_{EM} específicos de mielina. Una desventaja potencial de ShK es su baja afinidad picomolar para el canal Kv1.1 neuronal (K_d 28 pM). Aunque no se observaron efectos secundarios con ShK en ensayos de EAE, la entrada de altas concentraciones de ShK en el cerebro, como puede suceder cuando está comprometida la barrera hematoencefálica en EM, puede conducir a una neurotoxicidad no deseada. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de inhibidores de Kv1.3 altamente específicos. Un esfuerzo extenso por la industria farmacéutica y los grupos académicos ha producido varias moléculas pequeñas que inhiben Kv1.3 en el rango medio-nanomolar, pero estos compuestos no tienen la selectividad o potencia para hacerlos candidatos a fármaco viables.

Se han indicado previamente varios análogos peptídicos truncados de ShK. En uno de estos análogos de ShK, la secuencia nativa se truncó y después se estabilizó por la introducción de enlaces covalentes adicionales (un disulfuro no nativo y dos puentes lactama). En otros, los armazones estructurales no nativos estabilizados por disulfuro y/o puentes lactama se modificaron para incluir residuos aminoácidos clave de la toxina nativa. Estos análogos de ShK muestran grados variables de actividad inhibitoria de Kv1.3 y especificidad. Lanigan, M.D. y col.; Designed Peptide Analogues of the Potassium Channel Blocker ShK Toxin; Biochemistry, 25; 40(51): 15528-37 (Diciembre 2001).

50 Sigue habiendo necesidad en la técnica del desarrollo de nuevos análogos de ShK que inhiban selectivamente los canales Kv1.3 en linfocitos, con efectos inhibitorios mínimos o nulos en los canales Kv1.1 u otros canales de potasio.

SUMARIO DE LA INVENCION

La invención se define en las reivindicaciones.

55 La presente invención proporciona composiciones novedosas (denominadas en el presente documento como "análogos de ShK") que comprenden la toxina ShK unida (por ejemplo, ligada, unida por un enlazador o asociada de otro modo con) una entidad química orgánica o inorgánica (por ejemplo, un átomo, molécula, grupo, residuo, compuesto, resto, etc.), que tenga una carga aniónica, como se define en las reivindicaciones.

Además de acuerdo con la presente divulgación, se proporcionan métodos para inhibir canales de potasio y/o tratar enfermedades o trastornos en sujetos humanos o animales, administrando al sujeto una cantidad eficaz de un análogo de ShK de la presente invención. En algunas realizaciones, la entidad química a la que se une la toxina de ShK puede seleccionarse para proporcionar la inhibición selectiva de ciertos canales de potasio (por ejemplo canales Kv1.3) sobre otros canales de potasio (por ejemplo, canales Kv1.1).

Aún adicionalmente, de acuerdo con la presente invención, los análogos de ShK del carácter anterior pueden incluir una etiqueta de fluoróforo y dichos análogos ShK etiquetados con fluoróforo de la presente invención pueden usarse en citometría de flujo en solitario, o junto con tetrámeros de clase II que pueden detectar células autorreactivas.

Aspectos, elementos y detalles adicionales de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica tras la lectura de la descripción detallada y los ejemplos expuestos a continuación.

15 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra las estructuras químicas de varios análogos de ShK de la presente invención.

La figura 2A muestra un modelo molecular de ShK en base a la estructura de RMN publicada en la que Lys²², crítico para el bloqueo del canal, se resalta en un tono de gris. L-pTyr se unió al grupo α -amino de Arg¹ de ShK (resaltado en un segundo tono de gris) a través de un enlazador Aeea (derecha). Las estructuras del enlazador y L-pTyr se modelaron con AM1 en Hyperchem.

La figura 2B muestra el efecto de ShK (superior) y ShK(L5) (inferior) en corrientes de Kv1.3 y Kv1.1 en células transfectadas de forma estable.

La figura 2C muestra una inhibición dependiente de la dosis de Kv1.3 (símbolos abiertos) y Kv1.1 (símbolos cerrados) por ShK (oscuro) y ShK(L5) (claro). K_d en Kv1.3 = 10 ± 1 pM (ShK) y 69 ± 5 pM (ShK(L5)); K_d en Kv1.1 = 28 ± 6 pM (ShK) y $7,4 \pm 0,8$ nM (ShK(L5)).

La figura 2D muestra el transcurso de tiempo de absorción y de lavado de ShK(L5) en Kv1.3 donde las células se mantuvieron a un potencial de retención de 80 mV y se despolarizaron durante 200 ms a 40 mV cada 30 s.

La figura 2E muestra valores de K_d para la inhibición de Kv1.3 y Kv1.1 por los análogos de ShK. K_d para ShK-F6CA y ShK-Dap²² en base a las fuentes publicadas.

La figura 3A es un gráfico que muestra las intensidades de tinción de CD45RA y CCR7 según se determina por citometría de flujo en la población regulada por CD3⁺ de PBMC humanas teñidas con anticuerpos contra CD3, CD45RA y CCR7.

La figura 3B es un gráfico que muestra las intensidades de tinción de CD45RA y CCR7 según se determina por citometría de flujo en la población regulada por CD3⁺ en células de línea T_{EM} humana teñida con anticuerpos contra CD3, CD45RA y CCR7.

La figura 3C es un gráfico que muestra los efectos inhibitorios de ShK (gris oscuro) y ShK(L5) (gris claro) de la incorporación de [³H] timidina por las PBMC (símbolos abiertos, una mezcla de células indiferenciadas/linfocitos T_{CM}) y linfocitos T_{EM} (símbolos cerrados) con estimulación durante 48 horas con anticuerpo anti-CD3.

La figura 3D es una gráfica que muestra las PBMC humanas activadas previamente (células indiferenciadas/linfocitos T_{CM}) que regulan por aumento la expresión de K_{Ca}3.1 que se vuelven resistentes a la inhibición de ShK(L5) cuando se reactivan con el anticuerpo anti-CD3. Se ha indicado previamente que estas células se vuelven sensibles al inhibidor específico de K_{Ca}3.1 TRAM-34.

La figura 4A es un gráfico que muestra la tinción con CD45RC de linfocitos T esplénicos de rata (izquierda) y linfocitos T PAS (derecha) detectados por citometría de flujo.

La figura 4B es un gráfico que muestra las corrientes de Kv1.3 mostradas por linfocitos T PAS inactivos (superior) y activados por el antígeno de mielina (inferior).

La figura 4C proporciona una representación gráfica de perfiles de citometría de flujo de tinción con ShK-F6CA en linfocitos T PAS inactivos (superior) y activados por antígeno de mielina (inferior). Células no teñidas (líneas de color negro) y células teñidas con ShK-F6CA (área rellena de color gris claro). La competición de la tinción con ShK-F6CA por ShK(L5) no marcado se representa por el área rellena de color gris oscuro.

La figura 4D muestra imágenes confocales de la inmunotinción de Kv1.3 en linfocitos T PAS inactivos (superior) y activados con antígeno de mielina (inferior). El análisis estadístico se realizó usando la prueba U de Mann-Whitney.

La figura 4E muestra una inhibición dependiente de la dosis por ShK (líneas oscuras) y ShK(L5) (líneas claras) de la incorporación de [³H] timidina por células de rata (izquierda) indiferenciadas/linfocitos T_{CM}

(símbolos abiertos) y linfocitos T_{EM} (símbolos cerrados) activados con Con A (1 µg/ml).

La figura 4F muestra la inhibición dependiente de la dosis por ShK (líneas oscuras) y ShK(L5) (líneas claras) de la secreción de IL2 por los linfocitos T PAS 7 horas después de la estimulación con MBP. G, la inhibición inducida por ShK(L5) de la incorporación de [³H] timidina activada por el antígeno de mielina por los linfocitos T PAS (símbolos abiertos) se invierte por la adición de 20 µ/ml de IL2 (símbolos cerrados).

La figura 5A es un gráfico que muestra la actividad de bloqueo de Kv1.3 de ShK(L5) según se determina en los canales Kv1.3 expresada de forma estable en células L929.

La figura 5B es un gráfico que muestra los niveles en sangre de ShK(L5) en diversos momentos después de una única inyección subcutánea de 200 mg/kg de ShK(L5) en cuatro ratas. Se extrajo sangre en los momentos indicados y el suero se ensayó por fijación de membranas para determinar la cantidad de ShK(L5).

La figura 5C es un gráfico de los datos de la figura 5B ajustados a un único decaimiento exponencial que indica una semivida de aproximadamente 50 minutos.

La figura 5D es un gráfico que muestra los niveles en sangre de ShK(L5) en cinco ratas Lewis que recibieron inyecciones subcutáneas diarias individuales de 10 µg/kg/día de ShK(L5) durante 5 días. Se extrajo sangre cada mañana (24 horas después de la inyección previa) y se ensayó para el bloqueo de la actividad en los canales Kv1.3 por fijación de membranas.

La figura 5E es un gráfico que muestra niveles en suero de ShK(L5) en ratas en diversos momentos tras una única dosis de 10 mg/kg de ShK(L5) por vía subcutánea (barras de color blanco; n = 4) o intravenosa (barras de color negro; n = 4). Se extrajo sangre en los momentos indicados y el suero se ensayó por fijación de membranas para determinar la cantidad de ShK(L5) en sangre. ShK(L5) mantuvo un nivel en estado estable de 300 pM en la sangre casi 24 horas después de una única inyección subcutánea. Esta concentración es suficiente para inhibir selectivamente la función de los linfocitos T_{EM}.

La figura 5F es un gráfico que muestra el % de recuperación de ShK(L5) después de añadir una dosis de hemi-bloqueo de ShK(L5) al plasma de rata o PBS que contenía plasma de rata al 2 % y se incubó a 37 °C durante una duración variable. Las alícuotas se recogieron en los momentos indicados y la actividad de bloqueo se determinó en los canales Kv1.3. ShK(L5) es extremadamente estable en plasma.

La figura 6A es un gráfico que muestra la prevención puntuada de EAE. Los linfocitos T PAS se activaron *in vitro*, se lavaron y se inyectaron por vía intraperitoneal el día 0. Puntuación clínica de EAE: 0 = sin signos clínicos, 0,5 = cola caída distal, 1 = cola caída, 2 = paraparesia o ataxia leve, 3 = paraparesia moderada, 4 = parálisis completa de las extremidades posteriores, 5 = 4 + incontinencia, 6 = muerte. A las ratas (n = 6/grupo) se les inyectó por vía subcutánea vehículo en solitario (n = 6) o ShK(L5) (n = 6; 10 mg/kg/día) del día 0 al día 5.

La figura 6B es un gráfico que muestra el tratamiento puntuado de EAE. Los linfocitos T PAS se activaron *in vitro*, se lavaron y se inyectaron por vía intraperitoneal el día 0. El tratamiento con ShK(L5) a 10 mg/kg/día se inició cuando las ratas desarrollaron signos clínicos de EAE y se continuó durante 3 días.

La figura 6C es un gráfico que muestra el espesor de la oreja como un indicador de la reacción de DTH provocada frente a ovalbúmina en ratas. Los animales (n = 6/grupo) se trataron con ShK(L5) 10 mg/kg/día durante 2 días, después de lo cual se midió la hinchazón de la oreja. El análisis estadístico se realizó usando la prueba U de Mann-Whitney.

La figura 7A muestra la estructura de ShK(L5) y un gráfico que muestra la inhibición de los canales Kv1.3 en linfocitos T_{EM} en función de la concentración de ShK(L5). Cada punto de datos representa la media de tres determinaciones.

La figura 7B es un diagrama de complejo de señalización que contiene Kv1.3.

La figura 7C muestra una co-localización de CD4, Kv1.3, Kvβ2, SAP97, ZIP y p56^{lck} en IS.

La figura 7D muestra la tinción de CD4 y Kv1.3 en ausencia de un contacto visible T_{EM}-APC.

La figura 7E muestra la tinción de CD4 y Kv1.3 en linfocitos T_{EM} específicos de GAD65 expuestos a APC cargadas con MBP.

La figura 7F muestra que ShK(L5) 100 nM no impide la formación de IS.

La figura 7G muestra que ShK(L5) 100 nM no interrumpe el IS.

La figura 8A es un gráfico que muestra la señalización de calcio en linfocitos T_{EM} específicos de GAD de tres pacientes de DMT1 activados por anticuerpos secundarios de entrecruzamiento anti-CD3 + (flecha) en ausencia (negro) o presencia de ShK(L5) 0,1 nM (gris oscuro), 1 nM (gris medio) o 100 nM (gris claro).

La figura 8B es un gráfico que muestra la incorporación de [³H]-timidina por las células indiferenciadas/linfocitos T_{CM} y los linfocitos T_{EM} (izquierda) y los efectores indiferenciados/T_{CM} y efectores T_{EM} de pacientes con DMT1 y AR (derecha). Linfocitos T_{EM}: Clones de T_{EM} activados por GAD65 de tres pacientes de DM T1 y linfocitos SF-T_{EM} activados por el anticuerpo anti-CD3 de tres pacientes de AR. Células indiferenciadas/linfocitos T_{CM}: células diferenciadas de PB/linfocitos T_{CM} activadas por el anticuerpo anti-CD3 de los mismos tres pacientes de AR.

La figura 8C es una serie de gráficos de barras que muestran la producción de citocina por los linfocitos T_{EM} y las células indiferenciadas/linfocitos T_{CM} usados en la figura 8B.

La figura 8D muestra el fenotipo de los linfocitos T autorreactivos relevantes a la enfermedad e irrelevantes a la enfermedad en EM, DM T1 y AR.

5 La figura 8E es un diagrama que muestra la manera en la que ShK(L5) inhibe la señalización de calcio, la proliferación de linfocitos y la producción de citocina, pero no la formación de IS.

La figura 9 es un diagrama que representa un modelo de rata de hipersensibilidad de tipo tardío (DTH) provocada por linfocitos T de memoria efectora.

10 La figura 10 es un diagrama que muestra un protocolo de tratamiento para ShK(L5) en un modelo de rata de hipersensibilidad de tipo tardío (DTH) provocada por linfocitos T de memoria efectora

La figura 11 es un diagrama que representa la supresión específica de respuestas de memoria efectora *in vivo* en ratas mediante ShK(L5) sin interrumpir la función de los linfocitos T o los linfocitos B indiferenciados y de memoria central.

15 La figura 12A muestra corrientes de Kv1.3 (superior) y el número de canal/célula (inferior) en linfocitos T específicos de GAD65, insulina y mielina de pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) de nueva aparición, controles sanos y pacientes con esclerosis múltiple.

La figura 12B muestra la intensidad de tinción de Kv1.3 (superior) y de fluorescencia de linfocitos T individuales (inferior) de estos pacientes.

20 La figura 12C muestra gráficos del número de células relativo frente la intensidad de tinción de CCR7. Las células que expresan altos niveles de Kv1.3 son negativas a CCR7, es decir, son T_{EM}-efectores. Las células que expresan bajos niveles de Kv1.3 son positivas a CCR7, es decir no células indiferenciadas o linfocitos T_{CM}

25 La figura 12D muestra el número de Kv1.3/célula en linfocitos T autorreactivos de un paciente que tiene DMT1 y EM (izquierda), pacientes que han tenido DMT1 durante más de 5 años (centro) y pacientes que tienen DM tipo 2 no autoinmune.

La figura 12E muestra los números de Kv1.3 en linfocitos T CD4⁺GAD65-tetrámero⁺ de un paciente con DM T1 de nueva aparición.

La figura 13A muestra los números de canal Kv1.3 por célula en linfocitos T de sangre periférica y linfocitos T de líquido sinovial de pacientes de AR y linfocitos T de líquido sinovial de pacientes de OA.

30 La figura 13B muestra imágenes confocales de tinción de Kv1.3 (gris claro) y Kvβ2 (gris oscuro) en las células mostradas en la figura 13A.

La figura 13C muestra gráficos del número de células relativo frente la intensidad de tinción de CCR7.

35 La figura 13D muestra micrografías (superior) y gráficos de barras del índice inflamatorio (inferior) del sinovio de pacientes de AR y OA con tinción de anticuerpos anti-CD3 o anti-Kv1.3 y contra-tinción con hematoxilina/eosina (40X)

DESCRIPCIÓN DETALLADA

40 La siguiente descripción detallada y los dibujos adjuntos pretenden describir algunos, pero no necesariamente todos, los ejemplos o realizaciones de la invención únicamente. Esta descripción detallada y los dibujos adjuntos, no limitan el alcance de la invención de ningún modo.

45 La presente invención proporciona análogos novedosos de ShK como se define en las reivindicaciones. La divulgación proporciona métodos para preparar dichas composiciones y métodos para utilizar dichas composiciones para inhibir los canales Kv1.3 (u otros canales de iones) en células humanas o animales y para el tratamiento o prevención de enfermedades y trastornos, tales como trastornos autoinmunes mediados por linfocitos T. Las composiciones de la presente invención comprenden la toxina ShK unida (por ejemplo, conectada, unida por enlazador o asociada de otra forma) a un residuo aminoacídico con carga aniónica orgánico o inorgánico. En la invención, la entidad química de carga aniónica, orgánica o inorgánica, se selecciona para aumentar u optimizar la afinidad de la composición para la inhibición de canales Kv1.3 sobre canales Kv1.1.

50 De acuerdo con la presente invención, algunos ejemplos no limitantes de composiciones de la presente invención, en las que la entidad química con carga aniónica comprende un residuo aminoacídico, se muestran en las figuras 1 y 2E y se hacen referencia en el presente documento por designaciones alfanuméricas, como se muestra en la Tabla 1 que se indica a continuación:

Tabla 1

DESIGNACIÓN	RESIDUO AMINOACÍDICO UNIDO A ShK EN LA POSICIÓN 2
ShK-L1	AEEAc-L-Pmp(OH ₂)
ShK-D1	AEEAc-D-Pmp(O ₂)
ShK-D2	AEEAc-D-Pmp(OH, Et)
ShK-L3	AEEAc-L-Pmp(Et ₂)
ShK-D3	AEEAc-D-Pmp(Et ₂)
ShK-L4	AEEAc-L-Tyr
ShK-L5	AEEAc-L-Tyr(PO ₃ H ₂)
ShK-L7	AEEAc-L-Phe(p-CO ₂ H)

Con referencia específica a la figura 1, tirosina o fenilalanina o sus derivados no naturales cargados se conjugaron a ShK (izquierda superior) a través de un enlazador unido en su extremo N (residuo Arg1 mostrado en gris sombreado). El Lys22, que se requiere para bloqueo de canal, se ilustra en un tono más oscuro de gris. El modelo molecular de ShK se basa en la estructura de RMN publicada, y las estructuras del enlazador y los nuevos residuos se modelaron. Estas realizaciones de composiciones de la presente invención comprende generalmente la toxina ShK, que es un polipéptido, unido a (por ejemplo, unido químicamente, enlazado o asociado de otra forma) al menos un residuo aminoacídico de carga aniónica. En realizaciones en las que el residuo aminoacídico tiene un centro quiral, puede usarse el enantiómero D y/o L de dicho residuo aminoacídico. El residuo aminoacídico de carga aniónica puede ser un residuo no natural y puede unirse o enlazarse a un extremo N del polipéptido ShK. En algunas realizaciones, el residuo aminoacídico de carga aniónica puede unirse a un extremo N de ShK a través de un enlazador, tal como un enlazador aminoetiloxietiloxi-acetilo. Estos análogos de ShK inhiben el canal Kv1.3 más específicamente que ShK debido a que tienen una afinidad reducida para otros canales de potasio (por ejemplo, Kv1.1). El ShK puede aislarse a partir de fuentes naturales como se conoce en la técnica, o puede sintetizarse.

Síntesis de la toxina ShK

La toxina ShK puede sintetizarse mediante cualquier método adecuado. En uno de dichos métodos, los aminoácidos Fmoc (Bachem Feinchemikalien), incluyendo Arg(Pmc), Asp(OtBu), Cys(Trt), Gln(Trt), His(Trt), Lys(Boc), Ser(tBu) y Thr(tBu) se obtienen en el mercado y se ensamblan para formar la toxina ShK. El ensamblaje por etapas de los aminoácidos puede realizarse en un sintetizador peptídico Applied Biosystems 431A a la escala 0,25 mmol partiendo de Fmoc-Gys(Trt)-R. Los residuos 34 a 22 se acoplan individuales. Posteriormente, una alícuota (por ejemplo, la mitad) de la resina se elimina para realizar un mejor mezclado. El resto de secuencia peptídica se acopla doblemente a la alícuota de resina restante. Todos los acoplamientos están mediados por diciclohexilcarbodiimida en presencia de 2 equiv. de 1-hidroxibenzotriazol. Los dos residuos finales también se acoplan a través de la química HBTU/DIEA. Estos residuos son Aeea (Fmoc-ácido aminoetiloxietiloxiacético) y como el residuo N-terminal Fmoc-Tyr (PO₄) monobencil éster. Tras la eliminación final del grupo Fmoc, la resina peptídica (2,42 g) se escinde en la resina y se desprotege simultáneamente usando reactivo K durante 2 h a temperatura ambiente. El reactivo K se conoce en la técnica y se ha descrito en la bibliografía. Véase, King, D.S., Fields, C.G. y Fields, G.B. (1990) Int. J. Peptide Protein Res. 36, 255-266. Tras la escisión, el péptido se filtra para eliminar las perlas de resina gastadas y se precipita con éter dietílico enfriado con hielo. Después, el péptido se recoge en un embudo de filtro fino, se lava con éter enfriado con hielo y finalmente se extrae con AcOH al 20 % en H₂O. El extracto peptídico se diluye posteriormente en 2 litros de H₂O, el pH se ajusta a 8,0 con NH₄OH y se deja oxidar al aire a temperatura ambiente durante 36 horas. Tras la oxidación de los enlaces disulfuro con una relación 2:1 de glutatión reducido con respecto a oxidado, la solución peptídica se acidifica a pH 2,5 y se bombea sobre una columna Rainin Dynamax C₁₈ (5,0 x 30 cm). La muestra se eluye con un gradiente lineal de acetonitrilo al 5-30 % en H₂O que contiene TFA al 0,1 %. Las fracciones resultantes se analizan usando dos sistemas RP-HPLC analíticos: TFA y TEAP. Las fracciones puras se combinan y se liofilizan. (Véase, Pennington, M.W., Byrnes, M.E., Zaydenberg, I., Khaytin, I., de Chastonay, J., Krafft, D., Hill, R., Mahnir, V., Volberg, W.A., Gorczyca, W. y Kem, W.R. (1995) Int. J. Peptide Protein Res. 46, 354-358).

Como alternativa, puede utilizarse una síntesis peptídica de fase sólida empleando una estrategia de grupo protector Boc-Bzl para ensamblar la estructura primaria, así como análogos del péptido. Después, el péptido puede escindirse en la fase sólida por HF anhidro, produciendo el péptido lineal listo para el plegado como se ha descrito anteriormente para el péptido sintetizado Fmoc. (Véase, Stewart, J.M. y Young J.D. (1984) Solid Phase Peptide Synthesis. 2ª Edición. Pierce Chemical Company. Rockford, Il.)

Como alternativa, otros métodos sintéticos para ensamblar la estructura primaria de ShK o análogos puede incluir tecnología de ligado químico donde el péptido se prepara como una serie de fragmentos diseñados con péptidos tioéster C-terminal. El péptido tioéster puede reaccionar con otro péptido que contiene un residuo Cys N-terminal para formar un péptido que contiene un enlace peptídico nativo. Usando esta tecnología, se puede ensamblar de forma eficaz la estructura primaria de ShK (véase, (4) Wilken, J. y Kent S.B.H. (1998) Chemical protein synthesis. Current Opin. Biotech. 9, 412-426.)

Como alternativa, otro método sintético que puede emplearse para ensamblar la estructura primaria de ShK utilizará un enfoque convergente de fragmento peptídico protegido como se describe en Albericio, F., Lloyd-Williams, P., y Giralt, E. (1997) Convergent peptide synthesis; en Methods Enzymol. Ed G. Fields, Academic Press, Nueva York, NY. págs. 313-335. En este método, los fragmentos protegidos lineales se ensamblan como fragmentos protegidos de cadena lateral completa. Estos fragmentos pueden entonces acoplarse en conjunto de una forma convergente para ensamblar la estructura primaria de ShK o uno de sus análogos. El ensamblaje de los fragmentos puede también utilizar una resina de fase sólida para facilitar las etapas de acoplamiento y lavado.

Como alternativa, pueden usarse métodos recombinantes en los que la secuencia de codificación ADNc para ShK puede generarse para la expresión en un sistema de expresión procariota o eucariota. También son posibles análogos de ShK recombinantes que contienen amino ácidos no naturales utilizando moléculas de ARNt precargadas que utilizan codones no estándar. La construcción ADNc puede diseñarse para utilizar uno de estos codones sin utilizar para añadir el residuo fosfotirosina, así como el residuo Aeea. El plegado del análogo de ShK producido de forma recombinante puede realizarse entonces en un método similar al usado para los péptidos sintéticos. (Véase, Pennington, M.W., Byrnes, M.E., Zaydenberg, I., Khaytin, I., de Chastonay, J., Kraffe, D., Hill, R., Mahnir, V., Volberg, W.A., Gorczyca, W. y Kem, W.R. (1995) Int. J. Peptide Protein Res. 46, 354-358).

25 Unión de residuos aminoácidos aniónicos a ShK y modificaciones opcionales en ShK

Los residuos aminoácidos aniónicos pueden unirse al extremo N de la toxina ShK natural o sintética por medio de un enlazador, tal como un enlazador aminoetiloxietiloxi-acetilo, o mediante cualquier otro medio adecuado. En este ejemplo, se preparan los nueve (9) análogos de ShK mostrados en la figura 1. Inicialmente, Fmoc-Aeea-OH se acopla al extremo N de la toxina ShK sintética ensamblada como se ha descrito anteriormente. Después, la resina se divide en 9 alícuotas. Fmoc-Tyr(PO₄Bzl)-OH, Fmoc-d-Tyr(PO₄Bzl)-OH, Fmoc-Tyr(PO₄Me₂)-OH, Fmoc-Pmp-OH, Fmoc-d-Pmp-OH, Fmoc-Pmp(Et)-OH, Fmoc-Pmp(Et)₂-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, o Fmoc-Amp(Boc)-OH se acopla entonces usando DIC y HOBt a una de las alícuotas de resina. Después, la resina peptídica desbloqueada se escinde y se desprotege con reactivo K (King y col., 1990) que contiene triisopropilsilano al 5 % durante 2 h a TA. Met(O) se reduce por la adición de NH₄l sólido al cóctel de escisión en t-15 min. (Nicolas y col., 1995). Para el péptido que contiene Tyr(PO₄Me₂)-OH, se usó un cóctel de escisión que contenía TMSBr 1 M en TFA que contenía tioanisol como eliminador durante 18 h a 4 °C (Tian y col., 1993). La eliminación incompleta de los grupos protectores metilo es común al usar este método y dos de las especies (Tyr(PO₄) y Tyr(PO₄Me)) se purifican fácilmente por RP-HPLC. El análogo que contiene Tyr(PO₄Me₂) se escinde a través de escisión con reactivo K convencional manteniendo ambos grupos Me intactos en cada caso, la mezcla de escisión se filtra y el péptido en bruto se precipita en éter dietílico enfriado con hielo. El precipitado se recoge, produciendo aproximadamente 75 mg de péptido de 200 mg de resina. El producto en bruto se disuelve en 20 ml de AcOH acuoso al 50 % y se diluye en 0,75 l de H₂O. El pH de la solución se ajusta con NH₄OH a 8,2, y se dejó plegarse durante una noche con la adición de glutatión (2 mM:1 mM) (reducido:oxidado). Todos los análogos se purifican usando RP-HPLC como se ha descrito previamente (Pennington y col., 1995; Pennington y col., 1996a; Pennington y col., 1996b). Las fracciones puras se combinan y se liofilizan. Cada muestra se confirma por RP-HPLC, AAA y MALDI-TOF SM y se ajusta para justificar el contenido peptídico antes del bioensayo.

En algunas realizaciones de la invención, para mejorar las propiedades PK/PD de la estructura de ShK, los residuos que son sensibles a propiedades de degradación pueden reemplazarse o sustituirse. Por lo tanto, la sustitución del residuo Met en la posición 21 puede realizarse para impartir un efecto estabilizante a la oxidación. Adicionalmente, la sustitución de la función ácido C-terminal con una amida, impartirá estabilidad a las enzimas carboxipeptidasa C-terminal. Estas dos sustituciones a la estructura primaria de ShK combinadas con el resto aniónico en el extremo N se han sintetizado para generar el bloqueador de Kv1.3 más estable y selectivo. Las sustituciones fosfato no hidrolizables también impartirán un efecto estabilizante contra la hidrólisis de ácido y básica del fosfato, así como estabilidad contra enzimas fosfatasa. Las sustituciones se resumen a continuación. Los acrónimos usados son como se definen a continuación: Pmp = p-fosfonometil-Fenilalanina; y Nle = Norleucina.

Sustituciones:

- 5 p-fosfo-Tyr-Aeea-ShK-Nle21-Cys35-amida
 p-Fosfono-metil-Fenilalanina-Aeea-ShK-Nle21-Cys35amida (Pmp)
 p-Fosfatil-Phe-Aeea-ShK-Nle21-Cys35-amida (Ppa)
 p-fosfo-Tyr-Aeea-ShK-Nle21-Cys35-ácido
 p-Fosfono-metil-Fenilalanina-Aeea-ShK-Nle21-Cys35ácido (Pmp)
 p-Fosfatil-Phe-Aeea-ShK-Nle21-Cys35-ácido (Ppa)
- 10 Además de la Pmp y Ppa no hidrolizables, la sustitución de p-Fosfono(difluoro-metil)-Fenilalanina (Pfp) y p-Fosfono-metilceto-Fenilalanina (Pkp) son también sustituciones aniónicas, con la siguiente condición:
- 15 Pfp-Aeea-Shk-Nle21 Cys35 amida
 Pkp-Aeea-ShK-Nle21-Cys35 amida
 Pfp-Aeea-Shk-Nle21 Cys35 ácido
 Pkp-Aeea-ShK-Nle21-Cys35 ácido

20 Las estructuras de las sustituciones N-terminales se exponen en el Apéndice B. Otras estructuras que están dentro del alcance de la presente invención se publican en Beeton, C. y col., Targeting Effector Memory T Cells with a Selective Peptide Inhibitor of Kv1.3 Channels for Therapy of Autoimmune Diseases, Molecular Pharmacology, Vol. 67, No.4, 1369- (2005), una copia completa del cual se adjunta a la presente como Apéndice C.

Usos terapéuticos de análogos de ShK de la presente invención

25 La presente divulgación proporciona métodos para tratar o prevenir ciertos trastornos o enfermedades, tales como trastornos mediados por linfocitos T (por ejemplo, trastornos autoinmunes, enfermedad de injerto contra huésped, prevención de rechazo de trasplantes de órganos, etc.), otros trastornos inflamatorios, obesidad y diabetes tipo 2, en sujetos humanos o animales administrando al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz (por ejemplo, preventiva o eficaz para reducir o eliminar síntomas o el avance de la enfermedad) de una preparación farmacéuticamente
 30 aceptable que consiste o comprende un análogo de ShK de la presente invención (por ejemplo, incluyendo, pero sin limitación, los enumerados en la Tabla 1 anterior). Puede usarse cualquier ruta adecuada de administración (por ejemplo, oral, rectal, intravenosa, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intranasal, tópica, transmucosa, transdérmica, por implante de administración de fármaco, etc.). Cuando se utiliza para prevenir o tratar un trastorno mediado por linfocitos T, la dosificación o dosificaciones serán suficientes para inhibir los canales Kv1.3 en las
 35 membranas de linfocitos T. A este respecto, los análogos de ShK de la presente invención tienen el potencial de usarse para prevenir o tratar una amplia diversidad de trastornos autoinmunes mediados por linfocitos T. Los siguientes son algunos ejemplos de algunas enfermedades autoinmunes mediadas por linfocitos T que pueden prevenirse o tratarse por los métodos de la presente invención, categorizados con respecto al órgano diana que se afecta principalmente por cada una de dichas enfermedades:
 40

Sistema nervioso:

Esclerosis múltiple
 Miastenia gravis
 Neuropatías autoinmunes, tales como Guillain-Barré
 Uveitis autoinmune

Sangre:

Anemia hemolítica autoinmune
 Anemia perniciosa
 Trombocitopenia autoinmune

Vascular:

Arteritis temporal
 Síndrome antifosfolípido
 Vasculitis, tales como granulomatosis de Wegener y enfermedad de Behcet

Tracto gastrointestinal:

Enfermedad de Crohn
 Colitis ulcerosa
 Cirrosis biliar primaria
 Hepatitis autoinmune
 Resorción ósea asociada a enfermedad periodontal

Endocrino:

Diabetes mellitus tipo 1
 Enfermedad de Addison
 Enfermedad de Grave
 Tiroiditis de Hashimoto
 Ooforitis y orquitis autoinmune

Piel:

Psoriasis
Dermatitis herpetiforme
Pénfigo vulgar
Vitíligo

Múltiples órganos y/o sistema musculoesquelético:
Artritis reumatoide (AR)
Osteoartritis (OA)
Lupus eritematoso sistémico
Escleroderma
Polimiositis, dermatomiositis
Espondiloartropatías, tal como espondilitis anquilosante
Síndrome de Sjogren

Independientemente del órgano u órganos particulares afectados, se cree que los linfocitos T contribuyen al desarrollo de enfermedades autoinmunes. Las terapias actualmente disponibles para estas enfermedades son sustancialmente insatisfactorias y típicamente implican el uso de glucocorticoides (por ejemplo metilprednisolona, 5 prednisona), agentes antiinflamatorios no esteroideos, sales de oro, metotrexato, antimaláricos, y otros inmunosupresores, tales como ciclosporina y FK- 506. Además, otro trastorno mediado por linfocitos T que puede prevenirse o tratarse por los métodos de la presente invención es la enfermedad de injerto contra huésped y/o rechazo de órganos trasplantados. De hecho, los resultados de los procedimientos de trasplante de órganos han mejorado progresivamente con el desarrollo de refinamiento en el tipado tisular, técnicas quirúrgicas y tratamientos 10 inmunosupresores más eficaces. Sin embargo, el rechazo de órganos trasplantados permanece como un problema principal. Los linfocitos T tienen una función principal en la respuesta inmune y son responsables, en gran medida, del rechazo de muchos órganos trasplantados. También son responsables de la enfermedad denominada injerto contra huésped, en la que las células de médula ósea trasplantadas reconocen y destruyen tejidos del huésped no apareados a MHC. Por consiguiente, se usan fármacos tales como ciclosporina y FK506 que suprimen la inmunidad 15 de los linfocitos T para prevenir el rechazo de trasplante y la enfermedad de injerto contra huésped. Desafortunadamente, estos fármacos que inhiben los linfocitos T son tóxicos, limitando su uso las toxicidades hepáticas y renales. Por lo tanto, los métodos de la presente invención pueden proporcionar alternativas menos tóxicas para el tratamiento o prevención de enfermedad de injerto contra huésped o rechazo de trasplante. Además, se ha mostrado que los inhibidores del canal de potasio Kv1.3 regulado por voltaje son especialmente eficaces en la 20 supresión de linfocitos T de memoria efectora y, por lo tanto, los métodos de la presente invención pueden ser particularmente eficaces para prevenir o tratar enfermedades que se asocian a los linfocitos T de memoria efectora tales como: resorción ósea y enfermedad periodontal, psoriasis, artritis reumatoide, diabetes mellitus y esclerosis múltiple. Además de enfermedades mediadas por linfocitos T, se ha determinado que el canal Kv1.3 regula la homeostasis energética, el peso corporal y la sensibilidad a la insulina periférica. Por lo tanto, los métodos de la 25 presente divulgación pueden usarse para tratar otras enfermedades y trastornos que implican una homeostasis, peso corporal y sensibilidad de insulina periférica anormales inhibiendo los canales Kv1.3 en membranas celulares, tales estas otras enfermedades y trastornos incluyen, pero no se limitan necesariamente a, resorción ósea en enfermedad periodontal, diabetes tipo 2, síndrome metabólico y obesidad.

30 **Uso de análogos de ShK de la presente invención en citometría de flujo**

Además, de acuerdo con la presente divulgación, se proporcionan métodos para diagnosticar trastornos mediados por linfocitos T o clasificados de otra forma o que se distinguen entre diversos tipos de células *in vitro* usando versiones etiquetadas con fluoróforo de ShK(L5) para su uso en citometría de flujo en solitario, o junto con 35 tetrámeros de clase II que pueden detectar células autorreactivas. La citometría de flujo es un método flexible para caracterizar células en suspensión en el que se usa clasificación de células activadas por fluorescencia para seleccionar células vivas en base a las características medidas por citometría de flujo. Los tipos de características y funciones celulares que pueden detectarse por citometría de flujo incluyen la expresión de proteínas fuera y dentro de las células, el tipo de contenido de ADN, la viabilidad y la apoptosis, la actividad de bomba de resistencia a 40 múltiples fármacos, la actividad enzimática, la activación de linfocitos T, la especificidad de receptor de linfocitos T, la expresión de citocina, la fagocitosis y la actividad de ráfaga oxidativa. Por lo tanto, en este método de la presente divulgación, el residuo aminoácido unido al ShK puede incorporar una etiqueta de fluoróforo para su uso en citometría de flujo en solitario, o junto con tetrámeros de clase II cargados con autoantígenos específicos que pueden detectar células autorreactivas. Las descripciones específicas de los métodos por los que dicha citometría 45 de flujo puede realizarse se describen en Beeton, C., y col., A Novel Fluorescent Toxin to Detect and Investigate Kv1.3 Channel Up-Regulation in Chronically Activated T Lymphocytes; J. Biol. Chem., Vol. 278, Nº 11, 9928-9937 (Marzo de 2003). En general, un citómetro de flujo usa luz láser enfocada para iluminar células según pasan el haz láser en una corriente fluida. La luz dispersada por las células y la luz emitida por los colorantes fluorescentes unidos a las células de interés, se analizan por varios detectores y se procesan por un ordenador. Las células pueden

distinguirse y seleccionarse en base al tamaño y forma, así como por la presencia de muchas moléculas diferentes dentro y en la superficie de las células.

Ejemplos de efectos de inhibición del canal de potasio y utilidad terapéutica de análogos de ShK de la presente invención

ShK bloquea el canal Kv1.1 neuronal y el canal Kv1.3 con una potencia aproximadamente equivalente. Por lo tanto, la neurotoxicidad es una preocupación bajo las circunstancias que compromete la barrera hematoencefálica y permite la entrada de cantidades suficientes de ShK para bloquear los canales Kv1.1. La estrategia para diseñar un inhibidor específico de Kv1.3 se guió por el hallazgo de que fluoresceína-6-carboxilato (F6CA) que contiene ShK-F6CA unido a través de un enlazador Aeea de 20 A de largo al extremo N de ShK mostró 80 veces de selectividad para Kv1.3 sobre Kv1.1 (Beeton y col., 2003). Dado que F6CA puede existir como un carboxilato restringido o también como una lactona ciclada, no estaba claro si la especificidad a Kv1.3 de ShK-F6CA se debió a la carga negativa de F6CA, la hidrofobicidad creada por este núcleo de fluoresceína voluminoso grande, el apilamiento electrónico p planar potencial, o una combinación de todas estas contribuciones potenciales. Para distinguir entre estas posibilidades y con la intención de desarrollar un inhibidor selectivo a Kv1.3 no fluorescente, se generó una serie de 12 análogos de ShK N-terminalmente sustituidos para probar algunas de estas interacciones. Uniendo tirosina, fenilalanina o sus derivados (variables en carga, tamaño e hidrofobicidad) a través de un enlazador Aeea al extremo N de ShK, se pudo probar los efectos de carga e hidrofobicidad para comprender mejor la mejora de selectividad observada con la sustitución de F6CA.

Inhibición selectiva de KVv1.3 sobre la inhibición de Kv1.1:

En el ejemplo mostrado en las figuras 2A-2D, L-fosfotirosina (L-pTyr), un aminoácido aromático modificado post-traduccionalmente negativamente cargado (carga neta 2), se unió a través del enlazador AEEA a ShK-Arg¹ para generar el análogo ShK(L5) novedoso. La toxina ShK y ShK(L5) se ensayaron en los canales Kv1.3 y Kv1.1 expresados de forma estable en células L929. La figura 2B muestra los efectos de ShK u ShK(L5) sobre las corrientes de Kv1.3 y Kv1.1 provocadas por pulsos de despolarización de 200 ms de un potencial de retención de 80 mV a 40 mV. Ambos péptidos bloquearon de forma reversible Kv1.3 y Kv1.1 de una manera dependiente de la dosis con coeficientes de Hill de 1. K_d se determinaron a partir de las curvas dosis-respuesta mostradas usando el software Microcal Origin. ShK bloqueó Kv1.3 ($K_d = 10 \pm 1$ pM) y Kv1.1 ($K_d = 28 \pm 6$ pM) con una potencia aproximadamente equivalente según se esperó (figura 1C). Por el contrario, ShK(L5) fue selectivo 100 veces para Kv1.3 ($K_d = 69 \pm 5$ pM) sobre Kv1.1 ($K_d = 7,4 \pm 0,8$ nM) (figuras 1B, 1C). El transcurso de tiempo del bloqueo de corriente de Kv1.3 por ShK(L5) y su lavado se muestra en la figura 1D. La constante temporal (T_{ON}) de la absorción de ShK(L5) fue 131 ± 21 s ($n = 7$), mientras que la constante temporal (T_{OFF}) para el lavado peptídico fue 150 ± 28 s ($n = 4$). La K_d (57 ± 7 pM) calculada a partir de los valores de K_{ON} ($15 \times 10^6 \pm 0,5 \times 10^6$ M⁻¹s⁻¹) y K_{OFF} ($0,0059 \pm 0,0013$ s⁻¹) es coherente con la K_d (69 ± 5 pM) determinada con el software Microcal Origin.

También se ensayaron otros análogos de ShK en los canales Kv1.3 y Kv1.1. ShK(D5) que contenía D-fosfotirosina (D-pTyr) fue selectivo 35 veces para Kv1.3 sobre Kv1.1, pero fue de un orden de magnitud menos potente que ShK(L5). ShK(L6) que contenía L-pTyr-monometilo mostró una especificidad de Kv1.3 más modesta (11 veces), mientras que los análogos de ShK que contenían L-pTyr-dimetilo o L-Tyr no fueron selectivos para Kv1.3 sobre Kv1.1. Los análogos que contenían fenilalanina o sus derivados (variables en masa entera, densidad de p electrones y carga) fueron moderadamente específicos o no específicos para Kv1.3 sobre Kv1.1. La especificidad de 100 veces de ShK(L5) para Kv1.3 sobre Kv1.1 es mayor que la de ShK-F6CA (80 veces), ShK(D5) (35 veces), ShK-Dap²² (33 veces) o cualquier otro análogo de ShK ensayado.

Los Solicitantes también evaluaron la especificidad de ShK(L5) en un panel de 20 canales iónicos y estos datos se resumen en la siguiente Tabla 2:

Canales	K_d de ShK(L5) [pM]
Kv1.1	7.000 ± 1.000
Kv1.2	48.000 ± 7.000
Kv1.3 (clonado)	69 ± 5
Kv1.3 (nativo)	76 ± 8
Kv1.4	137.000 ± 3.000
Kv1.5	100.000 sin efecto
Kv1.6	18.000 ± 3.000
Kv1.7	100.000 sin efecto

Kv2.1	100.000 sin efecto
Kv3.1	100.000 sin efecto
Kv3.2	20.000 ± 2.000
Kir2.1	100.000 sin efecto
Kv11.1 (HERG)	100.000 sin efecto
K _{Ca} .1.1	100.000 sin efecto
K _{Ca} 2.1	100.000 sin efecto
K _{Ca} 2.3	100.000 sin efecto
K _{Ca} 3.1	115.000 ± 5.000
Nav1.2	100.000 sin efecto
Nav1.4	100.000 sin efecto
Canal CT de linfocitos T activado por hinchazón	100.000 sin efecto
Cav1.2	100.000 sin efecto

Como puede apreciarse a partir de los datos de la Tabla 2 anterior, ShK(L5) bloqueó el canal Kv1.3 en los linfocitos T con una K_d (76 pM) equivalente a su K_d en el canal clonado (69 pM). Fue selectivo 100 veces para Kv1.3 sobre Kv1.1, selectivo 260 veces sobre Kv1.6, selectivo 280 veces sobre Kv3.2, selectivo 680 veces sobre Kv1.2 y selectivo >1000 veces sobre todos los demás canales ensayados. Mayormente, fue selectivo para Kv1.3 1600 veces sobre K_{Ca}3.1, el canal de K^+ activado por calcio que regula la activación de las células indiferenciadas y los linfocitos T_{CM} humanos (Wulff y col., 2003). El ShK nativo fue menos selectivo que ShK(L5). ShK fue selectivo 2,8 veces para Kv1.3 ($K_d = 10 \pm 1$ pM) sobre Kv1.1 ($K_d = 28 \pm 6$ pM), selectivo 20 veces sobre Kv1.6 (200 ± 20 pM), 500 veces selectivo sobre Kv3.2 ($K_d = 5,000 \pm 1,000$ pM), y >1000 veces selectivo sobre Kv1.2 (10 ± 1 nM) y K_{Ca}3.1 ($K_d = 28 \pm 3$ nM). Margatoxina, un péptido procedente del veneno de escorpión que se ha promocionado como un inhibidor de Kv1.3 específico (Koo y col., 1997; Lin y col., 1993; Middleton y col., 2003) también fue no específica. Fue 5 veces selectivo para Kv1.3 (110 ± 12 pM) sobre Kv1.2 ($K_d = 520 \pm 1$ pM), 9 veces selectivo sobre Kv1.1 (10 ± 1 nM) y >1000 veces selectivo sobre Kv1.6 y Kv3.2 ($K_d >100$ nM). Luteolina, un nutracéutico vendido para enfermedades autoinmunes (www.lutimax.com) sobre la base de que es un inhibidor de Kv1.3 (Lahey y Rajadhyaksha, 2004), bloqueó Kv1.3 débilmente ($K_d = 65 \pm 5$ mM) y no mostró ninguna selectividad sobre Kv1.1 ($K_d = 77 \pm 5$ mM), Kv1.2 ($K_d = 63 \pm 4$ mM) o Kv1.5 ($K_d = 41 \pm 3$ mM). La exquisita especificidad de ShK(L5) para Kv1.3 junto con su afinidad picomolar para el canal le hace un inmunosupresor potencialmente atractivo.

Supresión preferencial de proliferación de linfocitos T_{EM} humanos

Con referencia a las figuras 3A-3D, para evaluar la actividad inmunosupresora *in vitro* de ShK(L5), los Solicitantes compararon su capacidad de suprimir la proliferación estimulada por el anticuerpo anti-CD3 de líneas de linfocitos T_{EM} humanos frente a PBMC humanas que contienen una mezcla de células indiferenciadas y linfocitos T_{CM}. La citometría de flujo confirmó los fenotipos de la superficie celular de las dos poblaciones estudiadas. Como se observa en la figura 3A, las líneas T_{EM} fueron >90 % de CCR7⁺CD45RA⁺, mientras que como se muestra en la figura 3B, las PBMC contenían un 65 % de células CCR7⁺CD45RA⁺ (indiferenciadas) y un 18 % de CCR7⁺CD45RA⁺ (T_{CM}). La figura 3C muestra que ShK(L5) y ShK eran 60 veces más eficaces en la supresión de la proliferación de linfocitos T_{EM} ($CI_{50} = \sim 80$ pM) en comparación con los PBMC ($CI_{50} = 5$ nM, $p < 0,05$). La sensibilidad inferior de las PBMC puede explicarse por una rápida regulación por aumento de los canales K_{Ca}3.1 en las células indiferenciadas y los linfocitos T_{CM} tras la estimulación como se ha indicado previamente (Ghanshani y col., 2000; Wulff y col., 2003). De acuerdo con esta interpretación, las PBMC activadas durante 48 horas para regular por aumento la expresión de K_{Ca}3.1, después en reposo durante 12 horas, y activadas de nuevo con anticuerpo anti-CD3 fueron completamente resistentes al bloqueo de ShK(L5), como se muestra en la fila superior de la figura 3D. Las PBMC que se habían suprimido por ShK(L5) durante la primera ronda de estimulación mostraron una resistencia idéntica a ShK(L5) cuando las células se lavaron, reposaron y se estimularon de nuevo con el anticuerpo anti-CD3. Estos resultados corroboran los estudios anteriores indicando que las células indiferenciadas y los linfocitos T_{CM} escapan de los inhibidores de Kv1.3 por la regulación por aumento de los canales K_{Ca}3.1. Por lo tanto, ShK(L5) suprime preferiblemente y de forma persistente la proliferación de linfocitos T_{EM}.

Supresión preferencial de proliferación de linfocitos T_{EM} de rata

Como un preámbulo para evaluar la efectividad terapéutica de ShK(L5), se examinó su capacidad para suprimir la proliferación de la línea de linfocitos T de memoria, PAS, que provoca una enfermedad tipo EM en ratas. Como un control, los Solicitantes usaron linfocitos T de bazo de rata. Para confirmar el estado de diferenciación de las dos poblaciones celulares, se evaluó la expresión de CD45RC, un marcador de linfocitos T indiferenciados (Bunce y Bell,

1997). Los linfocitos T esplénicos de rata fueron un 76 % de CD45RC⁺ (es decir, principalmente células indiferenciadas), mientras que las células PAS fueron CD45RC⁻, lo que sugiere que son células de memoria, como se muestra en la figura 4A. Para determinar si las células PAS están en el estado T_{EM} o el estado T_{CM}, se examinó la expresión de Kv1.3 antes y 48 horas después de la activación. Se espera que los linfocitos T_{EM} pero no T_{CM} regulen por aumento significativamente los niveles de Kv1.3 tras la estimulación. Con referencia a la figura 4B, los experimentos de fijación de membranas revelaron un llamativo aumento en la amplitud de corriente de Kv1.3 después de la estimulación con MBP de las células PAS coherente con la de sus linfocitos T_{EM}. Como una medida independiente del número de canales Kv1.3 en células PAS, se usó ShK-F6CA, un análogo de ShK marcado de forma fluorescente que previamente se ha indicado que se une específicamente a Kv1.3. La intensidad de tinción ShK-F6CA determinada por citometría de flujo refleja el número de tetrámeros de Kv1.3 expresados en la superficie celular. Como se observa en la figura 4C, la intensidad de tinción de ShK-F6CA (10 nM) aumentó con activación por MBP de las células PAS y un exceso de ShK(L5) no etiquetado (100 nM), inhibió de forma competitiva la tinción de ShK-F6CA. Como una prueba final, los Solicitantes realizaron microscopía confocal en células PAS inactivas y estimuladas por MBP que se han fijado y teñido con un anticuerpo específico de Kv1.3. De acuerdo con los datos en las figuras 4B y 4C, los linfocitos T PAS en reposo tenían una intensidad de tinción de Kv1.3 de $4,4 \pm 0,6$ y este valor aumentó a $10,6 \pm 2,3$ ($p < 0,005$) después de la activación inducida por antígeno (véase la figura 4D) que mostraba un aumento en la expresión de proteína de Kv1.3 tras la activación. Por lo tanto, las células PAS activadas por MBP son linfocitos CD45RC⁻ Kv1.3^{high} T_{EM}, mientras que en los linfocitos T esplénicos de rata usados en estos experimentos están predominantemente en el estado indiferenciado.

La proliferación activada por MBP de las células PAS se suprimió ~1000 veces más eficazmente por ShK(L5) y ShK (CI₅₀ = ~80 pM) que la proliferación inducida por mitógeno de linfocitos T esplénicos de rata (véase la figura 4E, CI₅₀ ~100 nM; $p < 0,05$). Estos resultados corroboran los hallazgos con linfocitos T humanos que se han descrito anteriormente. Como se observa en la figura 4G, ShK(L5) inhibió la producción de IL2 inducida por MBP por células PAS (figura 4F), y la IL2 exógena parcialmente anuló la supresión de ShK(L5) de la proliferación de células PAS (figura 4G). Estudios anteriores indicaron hallazgos similares con inhibidores de Kv1.3 menos específicos en linfocitos T humanos, de rata y de cerdo enano. En resumen, ShK(L5) es un inhibidor potente y selectivo de linfocitos T_{EM} humanos y de rata y, por lo tanto, puede tener uso terapéutico en enfermedades autoinmunes dirigiéndose preferiblemente a los linfocitos T_{EM} que contribuyen a la patogénesis de estos trastornos.

Semivida circulante y estabilidad

Se usó un bioensayo de fijación de membranas para averiguar si los niveles circulantes de ShK(L5) tras la inyección subcutánea fueron suficientes para inhibir los linfocitos T_{EM}. Los resultados de estos experimentos se muestran en las figuras 5A-5F.

Se ensayaron muestras de suero de ratas tratadas con ShK(L5) y de control para bloquear la actividad en los canales Kv1.3. El suero de control no mostró ninguna actividad de bloqueo detectable, indicando una ausencia de bloqueadores de canal endógeno. Para estandarizar el ensayo, se añadieron cantidades conocidas de ShK(L5) al suero de rata y estas muestras se ensayaron en canales Kv1.3. Las muestras de suero con adiciones bloquearon las corrientes de Kv1.3 de una forma dependiente de la dosis ($K_d 77 \pm 9$ pM) que fue indistinguible del efecto de ShK(L5) en ausencia de suero (figura 4A). Los niveles de ShK(L5) en animales tratados se determinaron por comparación con la curva estándar. ShK(L5) fue detectable en suero 5 minutos después de una única inyección subcutánea de 200 mg/kg. Los niveles pico (12 nM) se alcanzaron en 30 minutos y después el nivel cayó hasta un valor inicial de aproximadamente 300 pM durante 420 minutos. La desaparición de ShK(L5) de la sangre pudo ajustarse por un único exponencial. La semivida circulante se estimó en ~50 min.

Dado que el nivel sérico máximo después de 200 mg/kg (12 nM) excede significativamente el requisito para el bloqueo selectivo de los canales Kv1.3 y la función de los linfocitos T_{EM}, se ensayaron dosis inferiores. Después de una única inyección de 10 mg/kg, la concentración sérica máxima de ShK(L5) alcanzó 500 pM en 30 min (datos no mostrados), una concentración suficiente para bloquear >90 % de Kv1.3 pero sin afectar a Kv1.1. La administración a diario repetida de esta dosis (10 mg/kg/día) dio como resultado niveles en estado estable de ~300 pM (medidos 24 horas después de la inyección, figura 5D), que es suficiente para causar una supresión del 60-70 % de linfocitos T_{EM} con poco efecto sobre las células indiferenciadas/linfocitos T_{CM}. El nivel en "estado estable" es inesperado dada la semivida circulante estimada de ~50 min e indica que ShK(L5) se "acumula" en una administración repetida. Para determinar si el "depósito" estaba en la piel o en otra parte en el cuerpo, se midieron los niveles en sangre de ShK(L5) 10 horas después de que las ratas recibieran inyecciones intravenosas o subcutáneas individuales de 10 mg/kg de ShK(L5). El péptido desapareció con el mismo transcurso de tiempo después de administración por cualquier ruta (figura 5E) indicando que la piel no es responsable del nivel en estado estable de 300 pM de ShK(L5).

alcanzado después de una única inyección diaria de 10 mg/kg (figura 5D), y el depósito o los depósitos residen en otra parte.

El logro con éxito de un nivel en estado estable de 300 pM de ShK(L5) tras inyecciones individuales diarias de 10 mg/kg/día sugiere que el péptido puede ser estable *in vivo*. Para examinar directamente su estabilidad, se incubó ShK(L5) en plasma de rata o en PBS que contenía plasma de rata al 2 % a 37 °C durante duraciones variables y después se midió la actividad de bloqueo de Kv1.3. En ambos conjuntos de muestras con adiciones (plasma y PBS) se observó una reducción del 50 % en la actividad de bloqueo de Kv1.3 en aproximadamente 5 horas, presumiblemente debido a la unión del péptido a la superficie plástica del tubo, y después el nivel permaneció estable durante los siguientes 2 días (figura 5F). Como un ensayo de estabilidad añadido, se comparó la actividad de bloqueo de Kv1.3 frente a la actividad de bloqueo de Kv1.1 de sueros de ratas tratadas con ShK(L5). Si ShK(L5) se modifica *in vivo*, por desfosforilación de pTyr o escisión de la cadena lateral Aeea-pTyr, producirá ShK(L4) y ShK respectivamente, ninguno de los cuales es selectivo para Kv1.3 sobre Kv1.1. Las muestras en suero de animales tratados con ShK(L5) mostraron la misma selectividad para Kv1.3 sobre Kv1.1 que ShK(L5), indicando que el péptido no experimenta las modificaciones que se han indicado anteriormente. Tomados en conjunto, estos resultados indican que ShK(L5) es notablemente estable en plasma y alcanza concentraciones en suero farmacológicamente relevantes después de inyecciones subcutáneas diarias individuales de 10 mg/kg.

Sin toxicidad

Los Solicitantes realizaron varios ensayos *in vitro* e *in vivo* para determinar si ShK(L5) muestra alguna toxicidad. Los resultados de estos estudios se resumen en el Apéndice A. Las células linfoides humanas y de rata incubadas durante 48 horas con una concentración (100 nM) de ShK(L5) >1200 veces mayor que la dosis de hemi-bloqueo de Kv1.3 o la Cl_{50} para la supresión de T_{EM} (70-80 pM), mostraron una citotoxicidad mínima. La misma alta concentración de ShK(L5) fue negativa en el ensayo de Ames en la cepa de ensayo TA97A, sugiriendo que no es un mutagen. Ningún ensayo *in vitro* pudo detectar una toxicidad significativa.

El bloqueo inducido por fármaco de los canales Kv11.1 (HERG) ha contribuido a una mayor toxicidad cardiaca y la retirada de varios medicamentos del mercado. ShK(L5) no tiene ningún efecto sobre los canales Kv11.1 a 100 nM (>1430 veces la K_d para Kv1.3) y, por lo tanto, el régimen terapéutico escogido por los Solicitantes (10 mg/kg/día, 300 pM, nivel circulante en estado estable) no debería causar cardiotoxicidad. Como un ensayo adicional, los Solicitantes realizaron análisis de variabilidad de la frecuencia cardiaca en ratas conscientes a las que se administró vehículo (PBS + suero de rata al 2 %) el día 1, seguido de 10 mg/kg/día de ShK(L5) el día 2. ShK(L5) no tuvo ningún efecto sobre la frecuencia cardiaca ni los parámetros HRV estándar (variabilidad de la frecuencia cardiaca) tanto en los dominios de tiempo como de frecuencia (Task force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing Electrophysiology, 1996).

Estimulados por los experimentos de toxicidad aguda, los Solicitantes realizaron un estudio de toxicidad sub-crónica en el que se administraron inyecciones subcutáneas diarias a ratas de 10 mg/kg de ShK(L5) o vehículo durante 2 semanas (n = 6 en cada grupo). Los animales tratados con ShK(L5) ganaron peso en el mismo grado que ratas que recibieron vehículo (Apéndice A). El análisis hematológico y de química de sangre no mostró ninguna diferencia entre las ratas tratadas con ShK(L5) y con vehículo, y el análisis citométrico de flujo no reveló diferencias en las proporciones de subconjuntos de timocitos o linfocitos (Apéndice A). En conjunto, estos estudios sugieren que ShK(L5) es seguro.

Para determinar el índice de seguridad terapéutica, se administró una dosis 60 veces superior (600 mg/kg/día) de ShK(L5) a ratas sanas durante 5 días y no se observó ningún signo clínico de toxicidad, y no se percibió toxicidad cuando ratas sanas recibieron una única inyección de 1000 mg/kg de ShK(L5). La situación es menos optimista cuando la barrera hematoencefálica está comprometida, como sucede en EAE y EM. Las ratas con EAE que recibieron ShK(L5) 10 mg/kg/día durante 10 días, no mostraron signos de toxicidad. Por el contrario, el cuarenta por ciento de ratas (5/12) a las que se administraron 600 mg/kg/día durante cinco días, murieron en el quinto día cuando desarrollaron signos clínicos de EAE (DL_{50} extrapolada = 760 mg/kg/día). Ya que la concentración pico de ShK(L5) en el suero (12 nM) después de administración de una única inyección de 200 mg/kg es suficiente para bloquear >50 % de los canales Kv1.1, la toxicidad observada en ratas con EAE a las que se administraron 600 mg/kg/día de ShK(L5) se debe probablemente a la entrada en el cerebro de cantidades suficientes de ShK(L5) para bloquear Kv1.1. Por lo tanto, el índice de seguridad terapéutica eficaz de ShK(L5) excede ampliamente de 100 en situaciones en las que la barrera hematoencefálica no está comprometida (como se observa en enfermedades autoinmunes que NO afectan al sistema nervioso central (SNC)), mientras que el índice de seguridad terapéutico es de 75 cuando se rompe la barrera hematoencefálica.

Prevención de DTH y EAE adoptiva aguda

Con referencia a las figuras 6A-6C, ShK(L5) se evaluó para comprobar la actividad inmunosupresora *in vivo* en dos modelos animales. Los Solicitantes ensayaron su capacidad para prevenir y tratar EAE aguda inducida por la transferencia de linfocitos T_{EM} PAS activados por MBP en ratas Lewis, así como para suprimir la reacción de DTH mediada por linfocitos T_{EM}. Las células PAS se activaron con MBP durante 48 horas *in vitro* y después se transfirieron de forma adoptiva ($6-8 \times 10^6$ células viables) a ratas Lewis. Para el ensayo de prevención, después, las ratas recibieron inyecciones subcutáneas de solución salina (controles) o ShK(L5) (10 µg/kg/día) durante 5 días. En el primer ensayo de prevención, las ratas de control desarrollaron EAE leve (puntuación clínica máxima promedio $2,0 \pm 1,2$) con una aparición media de $5,6 \pm 0,6$ días (no se muestra). ShK(L5) redujo la gravedad de la enfermedad (puntuación clínica máxima promedio $0,7 \pm 0,6$, $p < 0,05$). En el segundo ensayo de prevención, las ratas de control desarrollaron EAE más grave (puntuación clínica máxima promedio $3,2 \pm 0,4$) con una aparición media de $4,8 \pm 0,4$ días (figura 6A). ShK(L5) redujo significativamente la gravedad de la enfermedad (puntuación clínica máxima promedio $0,6 \pm 0,4$, $p < 0,007$) pero no retrasó significativamente la aparición de la enfermedad ($5,5 \pm 0,7$ días; $p = 0,07$). No se apreciaron signos de toxicidad en estos estudios.

En el ensayo de tratamiento (figura 6B), a las ratas se les inyectaron células PAS activadas con MBP, se les administró solución salina o 10 µg/kg/día de ShK(L5) cuando desarrollaron inicialmente signos de EAE (cola caída, postura jorobada y pérdida del 6 % o más de su peso durante 24 horas) y la terapia continuó durante tres días. Los signos clínicos de EAE alcanzaron su punto máximo el día 6 en el grupo de control (puntuación = $3,9 \pm 0,7$) y el día 7 en el grupo tratado (puntuación = $1,9 \pm 0,9$; $p < 0,05$).

Como una evaluación independiente de la actividad inmunosupresora de ShK(L5) *in vivo*, los Solicitantes también examinaron su eficacia en la inhibición de la reacción de DTH que está mediada predominantemente por los linfocitos T_{EM} de tropismo cutáneo. Las ratas Lewis inmunizadas con ovalbúmina y adyuvante se estimularon 7 días más tarde con ovalbúmina en una oreja y solución salina en la otra oreja. Después, las ratas recibieron inyecciones de solución salina (controles) o ShK(L5) (10 µg/kg/día) y se midió el grosor de la oreja como una indicación de DTH. Todas las ratas de control desarrollaron hinchazón de oreja 24 y 48 horas después de la estimulación con ovalbúmina, mientras que la reacción de DTH fue sustancialmente más moderada en los animales tratados con ShK(L5) (figura 6C). Por lo tanto, ShK(L5) inhibe la respuesta de DTH mediada por T_{EM}, y previene y mejora la EAE adoptiva grave inducida por linfocitos T_{EM} activados por mielina.

Grupos Kv1.3 en IS durante la presentación del antígeno pero el aflujo de K⁺ a través de Kv1.3 no se requiere para la formación o la estabilidad de IS

Haciendo referencia a las figuras 7A-7G, ShK(L5), un inhibidor de Kv1.3 altamente selectivo (21), bloqueó las corrientes de Kv1.3 en los linfocitos T_{EM} específicos de GAD65 con una K_d de 72 ± 3 pM. Se usó ShK(L5) como una sonda farmacológica para definir estas etapas en la activación de linfocitos T_{EM} que requieren la función de Kv1.3. Los estudios bioquímicos han mostrado que Kv1.3 y Kvb2 pertenecen a un complejo de señalización que incluye SAP97 (proteína asociada a sinapsis 97), ZIP (proteína que interactúa con PKC-zeta, proteína p62 asociada a p56^{lck}, A170), p56^{lck} y CD4 (figura 7B). La existencia de este complejo en linfocitos T_{EM} humanos se sostiene por los resultados de los Solicitantes que muestran sellado conjunto de Kv1.3, Kvb2, SAP97, ZIP y p56^{lck} con CD4. Además, los estudios FRET (transferencia de energía fluorescente) muestran Kv1.3 en proximidad inmediata a CD3 en linfocitos T humanos transfectados con Kv1.3, y el canal se localiza preferiblemente en el punto de contacto entre los linfocitos T citotóxicos humanos transfectados con Kv1.3 y sus dianas. Ya que CD4 circula a IS, la zona de contacto entre los linfocitos T y las células que presentan antígeno (APC), es posible que Kv1.3 y otras proteínas en el complejo de señalización también se localicen en IS durante la presentación de antígeno. Para probar esta idea, clones de Kv1.3^{high} T_{EM} específicos de GAD65 de un paciente de DMT1 se incubaron con APC apareadas a HLA que se habían cargado con péptido GAD65 5571 y se habían teñido con DAPI para facilitar la visualización. Después de 20 min, los conjugados de APC-T_{EM} se inmunotifieron para proteínas en el complejo de señalización. CD4 se localizó en IS con Kv1.3, Kvb2, SAP97, ZIP y p56^{lck}. En ausencia de contacto APC-T_{EM}, CD4 y Kv1.3 se distribuyeron por toda la célula. Además, CD4 y Kv1.3 no pudieron localizarse en los puntos de contacto cuando los linfocitos T_{EM} específicos de GAD65 se expusieron a APC cargadas con MBP (un antígeno irrelevante), verificando que el agrupamiento de IS es específico de antígeno. Por lo tanto, en los linfocitos T_{EM} específicos de GAD65, un complejo de señalización que contiene Kv1.3 circula junto con CD4 a IS durante la presentación de antígeno, sugiriendo que Kv1.3 es un componente integral de la maquinaria que transduce señales en los linfocitos T_{EM}. En base a estos estudios, ShK(L5) a una concentración que bloquea aproximadamente el 99 % de los canales Kv1.3 (100 nM) no impidió el agrupamiento de IS y no interrumpió IS una vez formado, indicando que el eflujo de K⁺ a

través de los canales Kv1.3 es innecesario para la formación o la estabilidad de IS.

Supresión de linfocitos T_{EM} humanos

5 Con referencia a las figuras 8A-8E, ShK(L5) inhibió la señalización del calcio en linfocitos T_{EM}, una etapa temprana y esencial en la activación de linfocitos T. Se cargaron clones de T_{EM} específicos de GAD65 de pacientes de DMT1 con el tinte indicador de calcio Fluo3, se incubaron previamente en medio en solitario y con concentraciones en aumento de ShK(L5) y se sometieron a diagnóstico por imagen por citometría de flujo antes y después de la adición de un anticuerpo anti-CD3 de activación y un anticuerpo secundario de entrecruzamiento. El ascenso del calcio
10 máximo se produjo 242 ± 35 segundos después de la estimulación y se bloqueó por ShK(L5) con una CI_{50} de ~ 200 pM (figura 8A). ShK(L5) fue 10 veces más eficaz en la supresión de la incorporación de [³H]-timidina por los linfocitos T_{EM} autorreactivos de pacientes de DMT1 y AR en comparación con las células indiferenciadas/linfocitos T_{CM} de estos pacientes (figura 8B, izquierda). En un segundo conjunto de experimentos (figura 8B, derecha), los linfocitos T de RA-SF y RA-PB se activaron con el anticuerpo anti-CD3 durante 48 horas para generar "T_{EM}-
15 efectoras" y "indiferenciadas/T_{CM}-efectoras" respectivamente. Las células se dejaron en reposo durante una noche en medio, se estimularon de nuevo con el anticuerpo anti-CD3 en presencia o ausencia de ShK(L5) durante 48 horas más y se midió la incorporación de [³H]-timidina. Los RA-SF-T_{EM}-efectores conservaron su sensibilidad a la inhibición de ShK(L5), mientras que los RA-PB-indiferenciados/T_{CM}-efectores fueron resistentes al bloqueo de Kv1.3 (figura 8B, derecha), muy probablemente debido a que regulan por aumento el canal KCa3.1/IKCa1 activado por
20 calcio, que se sustituye por Kv1.3 en el fomento de la entrada de calcio. ShK(L5) suprimió significativamente la producción de interleucina 2 (IL2) e interferón-g (IFN-g) por los linfocitos T_{EM} de pacientes de DMT1 y AR, mientras que la producción de IL2 e IFN-g por las células indiferenciadas/linfocitos T_{CM} de estos pacientes se vio menos afectada (figura 8C). La producción del factor α de necrosis tumoral e interleucina 4 tanto por linfocitos T_{EM} como células indiferenciadas/linfocitos T_{CM} fue menos sensible a ShK(L5) (figura 8C).

25 **Verificación del modelo de rata de hipersensibilidad de tipo tardío (DTH) causada por linfocitos T de memoria efectora.**

Como se muestra en la figura 9, las ratas se inmunizaron con ovalbúmina (OVA) en adyuvante. Se estimularon en
30 una oreja 7 días después con OVA y en la otra con solución salina. Se midió la hinchazón de la oreja 24 horas después como un signo de hipersensibilidad de tipo tardío (DTH). Los histogramas FACS mostrados en la figura 9 indican que los linfocitos T en las orejas estimuladas con OVA son células de memoria negativa CD45RC mientras que los linfocitos T en la sangre y el bazo de las mismas ratas primordialmente son linfocitos T indiferenciados.

35 **Protocolo de tratamiento para Shk(L5) en un modelo de rata de hipersensibilidad de tipo tardío (DTH) causada por linfocitos T de memoria efectora**

Como se muestra en la figura 10, las ratas recibieron ShK(L5) 10 μ g/kg/día como inyección subcutánea desde el día 0 al día 7 (durante la fase de cebado) para impedir la diferenciación de células indiferenciadas a linfocitos TEM de
40 memoria efectora, o durante la fase efectora después de la exposición de la oreja a ovalbúmina para impedir la función de los linfocitos TEM.

Shk(L5) suprime específicamente las respuestas de memoria efectora in vivo en ratas sin alterar la función de los linfocitos T o linfocitos B indiferenciados y de memoria central

45 Como se ilustra en la Figura 11, las ratas de control desarrollaron hinchazón en la oreja, es decir una respuesta DTH positiva. ShK(L5) NO fue eficaz en la supresión de DTH al administrarse durante la fase de cebado, indicando que no suprimió la diferenciación de células indiferenciadas y linfocitos T de memoria central en células de memoria efectora. ShK(L5) suprime la DTH cuando se administra durante la fase efectora, indicando que evita la habilidad de
50 los linfocitos T de memoria efectora para alcanzar la oreja y/o suprime la activación de linfocitos T de memoria efectora. La primera posibilidad se excluyó debido a que el número de linfocitos T en las orejas de ratas tratadas con ShK(L5) fue el mismo que en las orejas de ratas a las que se les administró el vehículo. ShK(L5) suprimió la activación de linfocitos T de memoria efectora en la oreja debido a que estos linfocitos T fueron negativos a Kv1.3, mientras que los linfocitos T de memoria en las orejas de animales tratados con vehículos fueron positivos a Kv1.3.
55 Las respuestas de los linfocitos B de IgM e IgG en estos animales tampoco se vieron afectadas.

Expresión de Kv1.3 en linfocitos T específicos para GAD65/555-567. Antígenos de insulina/9-23 y mielina de pacientes con DMT1 O MS y controles sanos

La figura 12A muestra corrientes de Kv1.3 (superior) y número de canal/célula (inferior) de linfocitos T específicos de antígeno de pacientes con diabetes mellitus de tipo 1 de nueva aparición, controles sanos y pacientes con esclerosis múltiple. Cada punto de datos representa la media \pm SEM de 20-50 células de 2-4 líneas de linfocitos T de un único donante medida 48 horas después de la tercera estimulación con antígeno. Debido a la baja frecuencia de linfocitos T específicos para insulina y GAD65 en la sangre de pacientes de DMT1 y controles, se amplificaron estas poblaciones generando líneas de linfocitos T CD4⁺ específicos de autoantígeno a corto plazo usando el método de pocillos divididos. Como controles, se generaron líneas de linfocitos T específicas para la proteína básica de mielina (MBP) de autoantígeno irrelevante que está implicada en MS pero no en DM T1. Tras la tercera estimulación antigénica, las corrientes de Kv1.3 se midieron por fijación de membranas de células enteras en células activadas con una capacidad de membrana mayor de 4 pF (diámetro celular \geq 11 μ m). Las corrientes de Kv1.3 representativas y los números de canal Kv1.3/linfocito T se muestran en la figura 12A. Las corrientes mostraron propiedades biofísicas y farmacológicas características de Kv1.3. Los linfocitos T específicos para insulina (9-23) o GAD65 (555-567) de pacientes con DMT1 de nueva aparición mostraron mayores corrientes de Kv1.3 y expresaron altos números de canales Kv1.3, mientras que los linfocitos T específicos de MBP irrelevantes a la enfermedad de estos pacientes fueron Kv1.3^{low} ($p = 0,001$). Para comparación, se trazan los datos de Kv1.3 publicados en pacientes de MS en los que se observó el patrón opuesto. En pacientes de MS, los linfocitos T específicos para MBP o glicoproteína de oligodendrocito de mielina (péptido 35-55) o proteína proteolípídica (péptido 139-151) fueron Kv1.3^{high}, mientras que los linfocitos T específicos de insulina y GAD65 fueron Kv1.3^{low} ($p = 0,0001$). Los linfocitos T autorreactivos aislados de controles sanos fueron Kv1.3^{low} independientemente de la especificidad. En un individuo tanto con MS como DM T1, los linfocitos T específicos para los tres autoantígenos fueron Kv1.3^{high}. Los linfocitos T específicos de GAD65 y específicos de insulina de pacientes con DM T1 duradera fueron Kv1.3^{high}, lo que reflejaba la persistencia de los linfocitos T_{EM} autorreactivos, mientras que se observó un patrón de Kv1.3^{low} en linfocitos T específicos de GAD65 y de insulina de pacientes con DM tipo 2 no autoinmune. Como se observa en la figura 12B, intensidad de tinción de Kv1.3 (superior) y de fluorescencia de células individuales (inferior). Los Solicitantes confirmaron los datos de fijación de membranas por inmunotinción para Kv1.3. Los linfocitos T específicos de insulina y GAD65 de pacientes de DMT1 y los linfocitos T específicos de MBP de pacientes de MS se tiñeron intensamente, mientras que las células específicas para autoantígenos irrelevantes se tiñeron escasamente. La figura 12C muestra la expresión de CCR7. La citometría de flujo reveló que los linfocitos T Kv1.3^{high} eran linfocitos T_{EM} CCR7, mientras que las células Kv1.3^{low} eran células CCR7⁺ indiferenciadas o linfocitos T_{CM}. La figura 12D muestra el número de Kv1.3/célula en linfocitos T autorreactivos de un paciente tanto con DM T1 como MS, y de pacientes que han tenido DM T1 o DM tipo 2 durante más de 5 años y 2 años, respectivamente. La figura 12E muestra los números de Kv1.3 en linfocitos T CD4⁺GAD65-tetrámero⁺ de un paciente con DM T1 de nueva aparición. Como un control adicional, se usaron tetrámeros fluorescentes MHC de clase II que contenían el péptido GAD65 557I, para aislar linfocitos T CD4⁺ específicos de GAD65 de un paciente positivo a DR-0401 con DMT1 de nueva aparición. Los linfocitos T activados por GAD65 clasificados por tetrámeros mostraron el mismo patrón Kv1.3^{high} observado en las líneas de linfocitos T específicos para GAD65 de pacientes de DMT1. En resumen, los linfocitos T activados por autoantígeno relevantes a la enfermedad tanto en DMT1 como en MS son Kv1.3^{high}CCR7⁺ T_{EM}-efectores, mientras que las células autorreactivas irrelevantes a la enfermedad en estos pacientes son células Kv1.3^{low}CCR7⁺ indiferenciadas/linfocitos T_{CM}.

40 Expresión de Kv1.3 en artritis reumatoide y osteoartritis

En AR, los linfocitos T relevantes a la enfermedad pueden aislarse de las articulaciones afectadas. Los linfocitos T de fijación de membranas de los Solicitantes procedentes del fluido sinovial (SF) de 7 pacientes de AR, 48 horas después de estimulación con anticuerpo anti-CD3. Como se observa en la figura 13A, como controles, los Solicitantes analizaron células T-SF de 7 pacientes con osteoartritis (OA) no autoinmune degenerativa (que se ha activado con el mismo protocolo. Los linfocitos T RA-SF fueron Kv1.3^{high}, mientras que los linfocitos T OA-SF fueron Kv1.3^{low} ($p < 0,0001$). Los Solicitantes observaron el patrón de Kv1.3^{low} en linfocitos T activados por anti-CD3 de la sangre periférica (PB) de pacientes de AR ($p < 0,0001$) porque los linfocitos T_{EM} Kv1.3^{high} autorreactivos son infrecuentes en la sangre. La inmunotinción para Kv1.3 y su subunidad Kv β 2 asociada corroboraron los datos de fijación de membranas. La figura 13B muestra imágenes confocales de la tinción de Kv1.3 (gris claro como se observa en la figura) y Kv β 2 (gris más oscuro como se observa en la figura). Los linfocitos T RA-SF se tiñeron intensamente tanto para Kv1.3 como Kv β 2, mientras que los linfocitos T OA-SF y RA-PB mostraron una tinción débil. La figura 13C ilustra la expresión de CCR7. La citometría de flujo verificó que los linfocitos T Kv1.3^{high} RA-SF eran linfocitos T_{EM} CCR7⁺, mientras que los linfocitos T Kv1.3^{low} OA-SF y RA-PB eran células CCR7⁺ indiferenciadas/linfocitos T_{CM}. La figura 13D (superior) muestra micrografías del sinovio de pacientes de AR y OA con tinción de anticuerpos anti-CD3 o anti-Kv1.3 y contra-tinción con hematoxilina/eosina (40X) Como un ensayo adicional, se inmunotifieron tejido sinoviales (ST) embebidos en parafina de 5 pacientes de AR y 5 pacientes de OA para CD3, Kv1.3 y CCR7. Se ha mostrado previamente que este método de tinción no detecta Kv1.3 en células indiferenciadas/linfocitos T_{CM} debido a su bajo número de canales Kv1.3. En RA-ST, se observó una preponderancia

de linfocitos T_{EM} CD3⁺Kv1.3⁺CCR7⁻, mientras que las células CD3⁺ fueron escasas en sinovio de OA y estas fueron principalmente células Kv1.3⁺CCR7⁺ indiferenciadas/linfocitos T_{CM}. El grado de infiltración por las células CD3⁺, Kv1.3⁺ y CCR7⁺ se evaluó por el sistema de clasificación de la figura S2A. Índice inflamatorio de CD3⁺: AR = 3,2 ± 0,1; OA = 1,1 ± 0,2 (p<0,01); Índice inflamatorio de Kv1.3⁺: AR = 2,8 ± 0,3; OA = 0,6 ± 0,3 (p<0,01). Por lo tanto, en 5 tres trastornos autoinmunes diferentes, estos resultados son consistentes con linfocitos T autorreactivos asociados a la enfermedad son Kv1.3^{high}CCR7⁻T_{EM}-efectores.

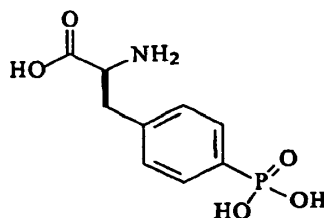
Se apreciará que la invención se ha descrito en el presente documento con referencia a ciertos ejemplos o realizaciones de la invención pero que pueden hacerse diversas adiciones, eliminaciones, alteraciones y 10 modificaciones a estos ejemplos y realizaciones, sin apartarse del alcance de la invención reivindicada. Por ejemplo, cualquier elemento o atributo de una realización o ejemplo puede incorporarse en o emplearse con otra realización o ejemplo, a menos que para hacerlo la realización o el ejemplo se vuelva inadecuado para su uso pretendido. Además, cuando las etapas de un método o procedimiento se citan o indican en un orden particular, el orden de estas etapas puede cambiarse a menos que se especifique otra cosa o a menos que dicho cambio en el orden de 15 las etapas haga a la invención carente de patentabilidad o inadecuada para su uso pretendido. Todas las adiciones, eliminaciones, modificaciones y alteraciones razonables han de considerarse equivalentes de los ejemplos descritos.

Apéndice A: Estudio de toxicidad de ShK(L5)

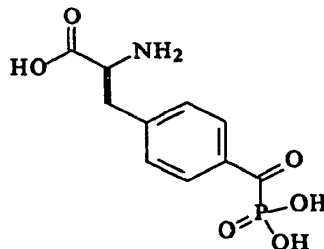
Pruebas <i>In vitro</i>		ShK(L5) 100 nM	
Citotoxicidad (% de células muertas)			
PBMC humanas		7,5 ± 4,3	
Linfocitos T PAS		8,1 ± 0,8	
Células Jurkat		5,5 ± 3,3	
Linfoma de Burkitt		3,1 ± 0,9	
Mieloma RPMI 8226		6,5 ± 2,1	
Ensayo de Ames		Negativo	
Ensayos <i>in vivo</i> agudos	Solución salina	SHK(L5) 10 µg/kg	
Electrocardiograma*			
Frecuencia cardiaca	302 ± 13	311 ± 20	
SDNN	13,3 ± 3,0	17,8 ± 4,4	
% CV	6,7 ± 1,4	92 ± 2,2	
SDANN _{5min}	5,0 ± 2,0	6,9 ± 2,3	
rMSSD	6,8 ± 2,2	9,8 ± 3,5	
HF (n.u.)	71 ± 21	79 ± 37	
HF (%)	50 ± 8	53 ± 10	
LF (n.u.)	68 ± 4	64 ± 10	
LF (%)	50 ± 8	47 ± 10	
LF/HF	1,1 ± 0,4	1,3 ± 0,7	
Ensayos sub-crónicos <i>in vivo</i>	Solución salina	ShK(L5) 10 µg/kg/día durante 2 semanas	
Aumento de peso (%)	72 ± 1,8	62 ± 1,7	
Recuento sanguíneo completo			
Hematocrito (%)	403 ± 1,4	39,0 ± 4,9	
Hemoglobina (g/dl)	15,3 ± 0,5	15,0 ± 1,5	
MCV (fl)	48,5 ± 0,2	48,3 ± 0,3	
MCH (pg)	18,5 ± 0,8	18,5 ± 0,6	
MCHC (g/dl)	38,0 ± 1,8	38,4 ± 1,3	
Glóbulos blancos totales (x 10 ³ mm ⁻³)	7,1 ± 2,1	7,1 ± 2,5	
Glóbulos rojos totales (x 10 ⁶ mm ⁻³)	8,3 ± 0,3	8,1 ± 1,0	
Plaquetas totales (x 10 ³ mm ⁻³)	656 ± 214	606 ± 106	
Química sanguínea			
Fosfatasa alcalina (U/l)	170 ± 26	150 ± 18	
Glucosa (mg/dl)	139 ± 21	150 ± 18	
Nitrógeno ureico en sangre (mg/dl)	17,1 ± 2,6	15,0 ± 1,7	
Creatinina (mg/dl)	0,6 ± 0	0,6 ± 0,1	
Albumina (g/dl)	5,0 ± 0,3	4,5 ± 0,4	
Poblaciones celulares tímicas (%).			

CD4 ⁻ CD8 ⁻	3,6 ± 1,1	43 ± 0,7
CD4 ⁺ CD8 ⁺	77,8 ± 6,1	76,8 ± 4,1
CD4 ⁺ CD8 ⁻	8,5 ± 1,7	11,2 ± 2,0
CD4 ⁻ CD8 ⁺	10,0 ± 3,3	7,6 ± 1,3
CD3 ⁺	89,5 ± 1,6	93,2 ± 3,5
Poblaciones esplénicas (%)		
CD3 ⁺	72,4 ± 4,4	65,4 ± 0,1
CD3 ⁺ CD45RC ⁺	35,6 ± 2,6	39,8 ± 1,1
CD3 ⁺ CD45RC ⁻	23,6 ± 2,3	26,5 ± 1,3
CD3 ⁺ CD4 ⁺	62,7 ± 0,1	66,6 ± 1,2
CD3 ⁺ CD8 ⁺	26,9 ± 0,1	25,0 ± 0,2
IgM ⁺	38,8 ± 1,5	33,3 ± 0,3
Datos expresados como media ± DE. *Ensayado con pruebas t, p<0,05 en todos los parámetros; SDNN: Desviación estándar de todos los intervalos RR normal-normal; % CV: 100 x SDNN/intervalo RR medio; SDANN _{5min} : Desviación estándar de la media de los intervalos RR normales para cada periodo de 5 min; rMSSD: Media cuadrática de diferencia sucesiva; HF (n.u.): Energía de alta frecuencia (0,75 - 2,5 Hz) en unidad normalizada; LF (n.u.): Energía de baja frecuencia (0,2 - 0,75 Hz) en unidad normalizada.		

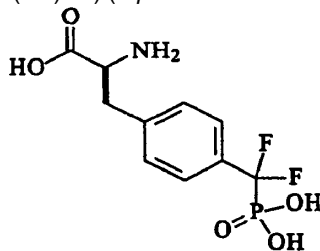
APÉNDICE B



L-p-Fosfonofenilalanina (PPA)



5 *L-p*-Fosfonometanonafenilalanina (PM(=O)PA) (*L-p*-Cetofosfonofenilalanina (KPP))



L-p-Fosfonodifluorometil-fenilalanina (PM(f2)PA) (*L-p*-Difluorometilfosfonofenilalanina)

10 Direccionamiento de los linfocitos T de memoria efectora con un inhibidor peptídico selectivo de canales Kv1.3 para la terapia de enfermedades autoinmunes

Christine Beeton, Michael W. Pennington, Heike Wulff, Satendra Singh, Daniel Nugent, George Crossley, Ilya Khaytin, Peter A. Calabresi, Chao-Yin Chen, George A. Gutman y K. George Chandy.

15

Department of Physiology and Biophysics, University of California Irvine, Irvine, California (C.B., G.A.G., K.G.C.); Bachem Bioscience Inc., King of Prussia, Pennsylvania (M.W.P., S.S., D.N., G.C., I.K.); Department of Medical Pharmacology and Toxicology, University of California, Davis, California (H.W., C.Y.C.); y Department of Pathology,

Johns Hopkins Hospital, Baltimore, Maryland (P.A.C.)

Recibido el 13 de octubre de 2004; aceptado el 21 de enero de 2005

5 Resumen

El canal de K(+) Kv1.3 regulado por voltaje es una diana novedosa para la inmunomodulación de linfocitos T de memoria efectora autorreactivos (T_{EM}) que tienen una función principal en la patogénesis de las enfermedades autoinmunes. Se describe la caracterización del péptido novedoso ShK(L5) que contiene 1-fosfotirosina unida a través de un enlazador hidrófilo de nueve átomos al extremo N del péptido ShK de la anémona de mar *Stichodactyla helianthus*. ShK(L5) es un bloqueador de Kv1.3 altamente específico que muestra una selectividad de 100 veces para Kv1.3 (K_d = 69 pM) sobre Kv1.1 y una selectividad de más de 250 veces sobre todos los demás canales ensayados. ShK(L5) suprime la proliferación de linfocitos T(EM) humanos y de rata e inhibe la producción de interleucina-2 a concentraciones picomolares. Los linfocitos T humanos indiferenciados y de memoria central son inicialmente 60 veces menos sensibles que los linfocitos T(EM) con respecto a ShK(L5) y después se vuelven resistentes al péptido durante la activación regulando por aumento el canal K(Ca)_v3.1 activado con calcio. ShK(L5) no muestra citotoxicidad *in vitro* sobre líneas celulares de mamífero y es negativo en la prueba de Ames. Es estable en plasma y cuando se administra una vez al día por inyección subcutánea (10 µg/kg), alcanza niveles en sangre en "estado estable" de aproximadamente 300 pM. Este régimen no causa toxicidad cardiaca evaluada por monitorización EKG continua y no altera los parámetros de la química clínica y hematológicos después de una terapia de 2 semanas. ShK(L5) previene y trata la encefalomiелitis autoinmune experimental y suprime la hipersensibilidad de tipo tardío en ratas. ShK(L5) puede ser útil para la terapia de trastornos autoinmunes.

ABREVIATURAS: MS, esclerosis múltiple; T_{EM}, subconjunto de linfocitos T de memoria efectora; T_{CM}, subconjunto de linfocitos T de memoria central; EAE, encefalomiелitis autoinmune experimental; DTH, hipersensibilidad de tipo tardío; K_{Ca}3.1, canal de K⁺ activado por Ca²⁺ de conductancia intermedia; K_v, canal de K⁺ regulado por voltaje; ShK, toxina de *Stichodactyla helianthus*; Fmoc, 9-fluorenilmetoxicarbonilo; Pmp, *p*-fosfonometil-fenilalanina; Aeea, ácido amino-etil-oxi-etiloxi-acético; HEK, riñón embrionario humano; HERG, gen humano relacionado con *éter-a-go-go*; PBMC, célula mononuclear de sangre periférica; IL2, interleucina 2; PBS, solución salina tamponada con fosfato; MBP, proteína básica de mielina; F6CA, fluoresceína-6-carboxilo; L-pTyr, L-fosfotirosina; CP-339818, 1-bencil-4-pentilimino-1,4-dihidroquinolina; UK-78282, 4-[difenilmetoxi]metil]-1-[3-(4-metoxifenil)propil]-piperidina; WIN-17317, clorhidrato de 1-bencil-7-cloro-4-*n*-propilimino-1,4-dihidroquinolina.

Este trabajo contó con el apoyo de subvenciones de la National Multiple Sclerosis Society (para H.W., K.G.C., P.A.C., M.W.P.), el National Institute of Health (subvención NS048252 para K.G.C.), la Arthritis National Research Foundation (para C.B.), y una beca posdoctoral de la National Multiple Sclerosis Society (para C.B.).

C.B. y M.P. contribuyeron por igual a este trabajo.

El artículo, la fecha de publicación y la información de referencia pueden encontrarse en <http://molpharm.aspetjournals.org/> doi: 10.1124/mol.104.008193.

Las enfermedades autoinmunes afectan a millones de personas en todo el mundo y pueden tener un mecanismo patogénico común. La patogénesis puede implicar el "despertar" de los linfocitos T autorreactivos específicos a la enfermedad latentes - por ejemplo, linfocitos T específicos de mielina en pacientes con esclerosis múltiple (MS) - por mimetismo molecular u otros mecanismos indeterminados. Una vez despiertos, los linfocitos T autorreactivos pueden diferenciarse de un estado indiferenciado a linfocitos T de memoria continuamente activados como consecuencia de una estimulación autoantigénica repetida y contribuir al daño inflamatorio migrando rápidamente a los tejidos, secretando citocinas inflamatorias, y mostrando una función efectora inmediata (Sallusto y col., 1999). Varias líneas de prueba apoyan este esquema. En primer lugar, una mayoría de los linfocitos T específicos de mielina de pacientes con MS son linfocitos T de memoria efectora (T_{EM}) activados independientes de la co-estimulación (Lovett-Racke y col., 1998; Scholz y col., 1998; Markovic-Plese y col., 2001; Wulff y col., 2003). En segundo lugar, la transferencia de linfocitos T_{EM} específicos de mielina a receptores de rata sin tratar induce encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE), un modelo para EM (Beeton y col., 2001b). En tercer lugar, los linfocitos T de pacientes con diabetes mellitus tipo 1 que son específicos para la descarboxilasa 65 de ácido glutámico de autoantígeno asociado a la enfermedad son células de memoria continuamente activadas (Viglietta y col., 2002). Por último, la mayoría de los linfocitos T en el sinovio de pacientes con artritis reumatoide y en lesiones cutáneas de pacientes con psoriasis son linfocitos T_{EM}, ya que son linfocitos T que provocan una hipersensibilidad de tipo tardío (DTH) (Ezawa y col., 1997; Friedrich y col., 2000; Soler y col., 2003). Los linfocitos B de memoria, especialmente

aquellos que pertenecen al subconjunto CD27⁺IgD⁻ de conmutación de clase, también contribuyen probablemente a la patogénesis de muchas enfermedades autoinmunes (Iglesias y col., 2001; O'Connor y col., 2001; Corcione y col., 2004). Las terapias que se dirigen a linfocitos T_{EM} y linfocitos B de memoria de conmutación de clase sin alterar la actividad de otros subconjuntos de linfocitos se dirigirán, por lo tanto, a las células patógenas en pacientes con 5 enfermedades autoinmunes pero sin comprometer las respuestas inmunes agudas.

Una nueva diana terapéutica excitante para inmunomodulación de linfocitos T_{EM} y linfocitos B de memoria de conmutación de clase es el canal de K⁺ Kv1.3 regulado por voltaje. Los linfocitos T_{EM} regulan por aumento Kv1.3 tras la activación y su proliferación inducida por antígeno es exquisitamente sensible a bloqueadores de Kv1.3 (Wulff y 10 col., 2003). Por el contrario, los linfocitos indiferenciados y T_{CM} son significativamente menos sensibles a los bloqueadores de Kv1.3 para empezar y rápidamente se vuelven resistentes al bloqueo de Kv1.3 regulando por aumento el canal de K⁺ activado por calcio K_{Ca}3.1 (Wulff y col., 2003; Chandy y col., 2004). Los linfocitos B, como los linfocitos T, cambian su dependencia del canal de potasio de K_{Ca}3.1 a Kv1.3 según se diferencian de indiferenciados a linfocitos B de memoria CD27⁺IgD⁻ de conmutación de clase (Wulff y col., 2004). Los bloqueadores de Kv1.3 15 inhiben la proliferación de estas células sin afectar a los linfocitos B indiferenciados y de memoria CD27⁺IgD⁺. Mediante el direccionamiento de los linfocitos T_{EM} y los linfocitos B de memoria de conmutación de clase con bloqueadores de Kv1.3, puede ser posible mejorar las enfermedades autoinmunes sin comprometer la mayor parte de la respuesta inmune. La distribución tisular funcionalmente restringida de Kv1.3 y el hecho de que, *in vivo*, el bloqueo de Kv1.3 mejore la EAE, la resorción ósea en una enfermedad periodontal, y DTH en modelos animales sin 20 provocar efectos secundarios obvios ha mejorado lo atractivo de Kv1.3 como una diana terapéutica (Koo y col., 1997; Beeton y col., 2001b; Valverde y col., 2004). Aunque los bloqueadores de Kv1.3 suprimirán todos los linfocitos T_{EM} activados (por ejemplo, linfocitos T_{EM} específicos para antígenos de vacuna) y linfocitos B de memoria de conmutación de clase, una terapia basada en Kv1.3 será una mejora significativa frente a terapias actuales que suprimen amplia e indiscriminadamente todo el sistema inmune. Una ventaja adicional de los bloqueadores de Kv1.3 25 es que son reversibles. Por lo tanto, se puede valorar el efecto terapéutico de los bloqueadores de Kv1.3 cuando sea necesario y detener la terapia frente a la infección, a diferencia de los agentes quimioterapéuticos o terapias de anticuerpos monoclonales dirigidos, que tardan meses en disminuir.

A pesar de grandes esfuerzos, no se han desarrollado inhibidores selectivos y potentes del canal Kv1.3 (Chandy y 30 col., 2004). El inhibidor Kv1.3 más potente es el péptido ShK de la anémona de mar del Caribe *Stichodactyla helianthus* (Pennington y col., 1995). ShK bloquea Kv1.3 (K_d, ~10 pM), suprime la proliferación de linfocitos T_{EM} a concentraciones picomolares (Wulff y col., 2003), y mejora la EAE (Beeton y col., 2001b). Un inconveniente potencial de ShK es su afinidad (K_d, 28 pM) para el canal Kv1.1 neuronal (Kalman y col., 1998). Aunque no se observaron efectos secundarios con ShK en ensayos de EAE (Beeton y col., 2001b), la entrada de altas concentraciones de 35 ShK en el cerebro puede conducir a una neurotoxicidad no deseada. Otros inhibidores, incluyendo correolida, *trans*-PAC, CP-339818, UK-78282, Psora-4, margatoxina y luteolina son menos selectivos para Kv1.3 (Chandy y col., 2004). Por lo tanto, es necesario el desarrollo de un derivado de ShK más selectivo.

Se ha desarrollado ShK(L5), un análogo sintético de ShK que bloqueó Kv1.3 con afinidad picomolar y mostró una 40 selectividad de más de 100 veces para Kv1.3 sobre Kv1.1 y otros canales. La selectividad se consiguió uniendo una L-fosfotirosina (L-pTyr) cargada negativamente a través de un enlazador hidrófilo a ShK-Arg¹. ShK(L5) suprimió la proliferación de linfocitos T_{EM} *in vitro* a concentraciones picomolares sin comprometer la función de los linfocitos indiferenciados y T_{CM}. En estudios *in vivo* de prueba de concepto, ShK(L5) mejoró la EAE provocada por la transferencia de linfocitos T_{EM} específicos de mielina a receptores de rata sin tratar y suprimió la repuesta de DTH 45 también provocada por los linfocitos T_{EM}. ShK(L5) puede aprovecharse como una terapia para la esclerosis múltiple u otras enfermedades autoinmunes mediadas por linfocitos T y B.

Materiales y métodos

50 **Síntesis de análogos de ShK.** Para los análogos Fmoc-Pmp, los grupos protectores etilo se eliminaron tratando el Fmoc-Pmp-(Etil)₂-OH con HCl acuoso 6 N a reflujo. Después de 16 h, un sólido de color blanco se eliminó por precipitación, que después se aisló por filtración y se lavó con agua hasta que los lavados fueron neutros (Hammerschmidt y Hanbauer, 2000). La eliminación parcial de los grupos protectores etilo de Pmp-fosfonato dio como resultado Pmp, Pmp-Et o Pmp(Etil)₂. Todos los derivados de aminoácidos de Fmoc se obtuvieron en Bachem 55 AG (Bubendorf, Suiza), excepto para Fmoc-D-TyrPO₃(bencil)-OH, que se obtuvo en Nova Biochem (San Diego, CA), y Fmoc-Pmp(etil)-OH y Fmoc-D-Pmp(etil)₂-OH, que se obtuvieron en Chem Impex (Wood Dale, IL). El ensamblaje en fase sólida se inició con resina Fmoc-Cys(Trt)-2-clorotritilo para minimizar la racemización potencial del residuo Cys C-terminal (Fujiwara y col., 1994). Se realizó un ensamblaje automatizado en un sintetizador peptídico ABI-431A (Applied Biosystems, Foster City, CA). Fmoc-Aeea-OH se acopló al extremo N después del ensamblaje de ShK. La

resina se dividió en nueve alícuotas. Fmoc-Tyr(PO₃Bzl)-OH, Fmoc-D-Tyr(PO₃Bzl)-OH, Fmoc-Tyr(PO₃Me₂)-OH, Fmoc-Pmp-OH, Fmoc-D-Pmp-OH, Fmoc-Pmp(etil)-OH, Fmoc-Pmp(Et)₂-OH, Fmoc-Tyr(*tert*-butil)-OH, o Fmoc-*p*-amino-L-fenilalanina(*tert*-butiloxi-carbonil)-OH se acopló, usando diisopropilcarbodiimida y 1-hidroxibenzotriazol, a una de las alícuotas de resina. La resina peptídica desbloqueada se escindió y se desprotegió con reactivo K (King y col., 1990) que contenía triisopropilsilano al 5 % durante 2 h a TA. Met(O) se redujo mediante la adición de NH₄ sólido al cóctel de escisión en t-15 min (Nicolas y col., 1995). Para los péptidos que contenían Tyr(PO₃Me₂)-OH, se usó un cóctel de escisión que contenía bromuro de trimetilsililo 1 M en TFA (ácido trifluoroacético) que contenía tioanisol como eliminador durante 18 h a 4 °C (Tian y col., 1993). La eliminación incompleta de los grupos protectores metilo es común al usar este método, y dos de las especies [*p*-fosfotirosina] y Tyr(PO₃HMe)] se purifican fácilmente por RP-HPLC. El análogo que contenía Tyr(PO₄Me₂) se escindió a través de escisión de reactivo K estándar manteniendo intactos ambos grupos metilo. En cada caso, la mezcla de escisión se filtró y el péptido en bruto se precipitó en éter dietílico enfriado con hielo. El precipitado se recogió, produciendo aproximadamente 75 mg de péptido de 200 mg de resina. El producto en bruto se disolvió en 20 ml de AcOH acuoso al 50 % y se diluyó en 0,75 l de H₂O. El pH de la solución se ajustó con NH₄OH a 8,2, y después se dejó plegarse durante una noche con la adición de glutatión (2 mM:1 mM) (reducido:oxidado). Todos los análogos se purificaron usando RP-HPLC, usando un gradiente lineal de agua frente a acetonitrilo tamponado con ácido trifluoroacético como se ha descrito previamente (Pennington y col., 1995, 1996a,b). Las fracciones puras se combinaron y se liofilizaron, dando como resultado una sal trifluoroacetato de cada péptido. La pureza de los péptidos fue mayor del 95 %. Cada muestra se confirmó por cromatografía líquida de alto rendimiento de fase inversa, análisis aminoacídico, y ionización-desorción láser asistida por matriz/espectrometría de masas de tiempo de vuelo y se ajustó para justificar el contenido peptídico antes del bioensayo. ShK y margatoxina se obtuvieron en Bachem Biosciences (King of Prussia, PA). La luteolina se adquirió en Sigma-Aldrich (St Louis, MO).

Canales iónicos. Se usó la nomenclatura IUPHAR para los canales iónicos descritos en este artículo (Gutman y col., 2003). Las células que expresan de forma estable *mKv1.1*, *rKv1.2*, *mKv1.3*, *hKv1.5* y *mKv3.1* se han descrito previamente (Grissmer y col., 1994). Las líneas celulares que expresan de forma estable otros canales iónicos de mamíferos fueron obsequios de varias fuentes: *mKv1.7* en células CHL y *hKCa2.3* en células COS-7 de Aurora Biosciences Corp. (San Diego, CA); *hKv1.4* en células LTK de Michael Tamkun (University of Colorado, Boulder, CO); *hKv2.1* en células HEK293 de Jim Trimmer (University of California, Davis, CA); *Kv11.1* (HERG) en células HEK293 de Craig January (University of Wisconsin, Madison, WI); células HEK293 que expresan *hKCa1.1* or *KCa2.1* o *hKCa3.1* de Khaled Houamed (University of Chicago, Chicago, IL); *hNav1.4* en células HEK-293 de Frank Lehmann-Horn (University of Ulm, Germany), y *Cav1.2* en células HEK-293 de Franz Hofmann (Munich, Alemania). Las células RBL-2H3 (que expresan *Kir2.1*) y las células de neuroblastoma N1E-115 (que expresan *Nav1.2*) se obtuvieron de la Colección Americana de Cultivos Tipo (Manassas, VA). *hKv1.6* y *rKv3.2* (ambas en pcDNA3) se obtuvieron en Protinac GmbH (Hamburg, Alemania) y transfectaron transitoriamente en células COS-7 con Fugene-6 (Roche, Mannheim, Alemania) de acuerdo con el protocolo de los fabricantes.

Células linfoides y líneas celulares. Se usaron gradientes de Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich) para aislar esplenocitos de ratas Lewis y células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) de la sangre de voluntarios sanos. Los linfocitos T_{EM} humanos específicos de glicoproteína de oligodendrocito de mielina o del toxoide tetánico se generaron como se ha descrito previamente (Wulff y col., 2003). La línea de linfocitos T de ratas Lewis CD4⁺ encefalitógena PAS (Beraud y col., 1993) fue una donación de Evelyne Béraud (University of Marseille, Marsella, Francia), y las células de plasmacitoma RPMI 8226 fueron una donación de Shastri Gollapudi (University of California, Irvine, CA). Las células Jurkat y Burkitt se adquirieron en la Colección Americana de Cultivos Tipo.

Análisis electrofisiológico. Los experimentos se realizaron en la configuración de célula entera de la técnica de fijación de membranas. Las corrientes de K_v se provocaron por pulsos de despolarización de 200 ms a partir de un potencial de retención de -80 a 40 mV como se ha descrito previamente (Zhou y col., 1998; Wulff y col., 2000; Bardien-Kruger y col., 2002; Kolski-Andreaco y col., 2004; Vennekamp y col., 2004). Cada bloqueador de canal se ensayó en múltiples concentraciones. La reducción medida en la corriente pico a 40 mV para cada concentración se usó para generar una curva dosis-respuesta, y la K_d y el coeficiente de Hill se determinaron con el software Origin (OriginLab Corp., Northampton, MA) como se ha descrito previamente (Zhou y col., 1998; Wulff y col., 2000; Bardien-Kruger y col., 2002; Kolski-Andreaco y col., 2004; Vennekamp y col., 2004). La K_d también se determinó a partir de las tasas *on* (T_{ON}) y *off* (T_{OFF}) para el bloqueo del canal. Después de la estabilización de la amplitud de corriente de Kv1.3 máxima, se perfundió ShK(L5) 70 pM sobre la célula, y los valores de corriente máximos trazados en función del tiempo se ajustaron a una única función exponencial para determinar T_{ON}. Después de alcanzar el bloqueo de equilibrio, la perfusión se conmutó de nuevo a una solución de baño sin bloqueador. Las corrientes máximas se trazaron como se ha descrito anteriormente para determinar T_{OFF}. K_{ON}, K_{OFF} y K_d se calcularon asumiendo una única reacción bimolecular entre ShK(L5) y Kv1.3: $K_{ON} = 1 - T_{ON} \times K_{OFF} / [T_{ON} \times$

concentración de ShK(L5)]; $K_{OFF} = 1/T_{OFF}$; $K_d = K_{OFF} / K_{ON}$ (Peter y col., 2001). Para los canales Kv11.1, el bloqueo de corriente se midió tanto en 20 como en -50 mV (corriente de cola). Para los canales K_{Ca} , $K_{ir2.1}$, y las corrientes de cloruro activadas por hinchazón, se midió el cambio en la conductancia de la pendiente por los análogos de ShK y, para las corrientes de Na^+ y Ca^{2+} , la reducción de la corriente mínima.

5

Tinción para citometría de flujo y microscopía de fluorescencia. Los fenotipos de linfocitos T de PBMC humanas, esplenocitos de rata y linfocitos T PAS se determinaron por citometría de flujo. Las PBMC se tiñeron triplemente con anticuerpo anti-CD3 conjugado con Cy-cromo (BD Pharmingen, San Diego, CA), anticuerpo anti-CD45RA conjugado con ficoeritrina (BD Pharmingen), y anticuerpo anti-CCR7 conjugado con isotiocianato de fluoresceína (R&D Systems, Minneapolis, MN). Los esplenocitos de rata y los linfocitos T teñidos con PAS se tiñeron doblemente con anticuerpo anti-CD3 conjugado con Cy-cromo y anticuerpo anti-CD45RC conjugado con isotiocianato de fluoresceína (BD Pharmingen). Las células teñidas se analizaron con un FACScan (BD Biosciences, San Jose, CA).

15 Se usaron dos enfoques para evaluar la expresión de proteína Kv1.3 en los linfocitos T PAS. En primer lugar, las células PAS se tiñeron con ShK-F6CA (10 nM; Bachem Bioscience Inc.), un análogo de ShK etiquetado con fluoróforo, y se analizaron por citometría de flujo como se ha descrito previamente (Beeton y col., 2003). Para los experimentos de competición, las células PAS se incubaron previamente con exceso de ShK(L5) no marcado (100 nM) antes de la adición de ShK-F6CA 10 nM. En segundo lugar, las células PAS se permeabilizaron y se tiñeron con anticuerpo anti-Kv1.3 (Koch y col., 1997) (donado por Hans-Gunther Knaus, Innsbruck, Austria) seguido de un anticuerpo secundario conjugado con Alexa-488 (Molecular Probes, Eugene, OR). Las células teñidas se visualizaron con un microscopio confocal Zeiss LSM-510 META (Carl Zeiss GmbH, Jena, Alemania), las intensidades de fluorescencia se midieron para las células individuales ($n = 10-15$), y el análisis estadístico se realizó usando la prueba U de Mann-Whitney.

25

Estudios funcionales. La proliferación de linfocitos T humanos y de rata se determinó con ensayos de incorporación de [3H]timidina como se ha descrito previamente (Beeton y col., 2001a,b; Wulff y col., 2003). Para las mediciones de producción de IL2, los linfocitos T PAS se activaron con MBP en presencia o ausencia de ShK o ShK(L5) durante 8 h, y los sobrenadantes de cultivo se recogieron como se ha descrito previamente (Beeton y col., 2001a). IL2 se detectó en los sobrenadantes usando el kit de IL2 de rata Quantikine (R&D Systems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El efecto de la IL2 exógena (20 unidades/ml; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) en la proliferación de linfocitos T PAS se determinó como se ha descrito previamente (Beeton y col., 2001a).

Determinación de la semivida circulante y estabilidad plasmática. Se añadieron cantidades conocidas de ShK(L5) a suero de rata Lewis, y la actividad de bloqueo en los canales Kv1.3 se ensayó por fijación de membranas para establecer una curva dosis-respuesta estándar. Las muestras de suero de ratas Lewis obtenidas en diversos momentos después de inyecciones subcutáneas o intravenosas individuales de ShK(L5) se ensayaron para comprobar la actividad de bloqueo de Kv1.3 por fijación de membranas y los niveles de ShK(L5) se determinaron a partir de la curva estándar como se ha descrito previamente (Beeton y col., 2001b). En otros experimentos, las ratas Lewis recibieron inyecciones diarias individuales de 10 μ g/kg de ShK(L5) y los niveles séricos de ShK(L5) se determinaron 24 h después de cada inyección los días 1 a 5. Para determinar la estabilidad en plasma de ShK(L5), el plasma de rata con adiciones con una cantidad conocida de ShK(L5) se incubó a 37 °C durante duraciones variables y después se ensayó para comprobar la actividad de bloqueo de Kv1.3; la cantidad de ShK(L5) residual en estas muestras se determinó a partir de la curva estándar.

45

Ensayos citotoxicidad y prueba de Ames. PBMC humanas, células PAS, Jurkat, RPMI 8226 y Burkitt se desarrollaron durante 48 h en presencia o ausencia de ShK(L5) 100 nM. Después, las células se tiñeron con el kit de viabilidad/citotoxicidad LIVE/DEAD (Molecular Probes) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, y el porcentaje de células vivas y muertas se determinó usando un lector de microplacas de fluorescencia (CytoFluor; Applied Biosystems, Foster City, CA). Se usó Triton X-100 (0,1 %) como control positivo para la muerte celular. Para la prueba de Ames, la actividad mutagénica de ShK(L5) se determinó en la cepa de ensayo de *Salmonella typhimurium* TA97a por Nelson Laboratories (Salt Lake City, UT).

Estudios EKG para evaluar la toxicidad cardiaca. Se usaron estudios electrocardiográficos con transmisores EKG implantados (Data Sciences International, Arden Hills, MN) para el análisis de la variabilidad de la frecuencia cardiaca en animales que recibieron ShK(L5) o vehículo. Los protocolos experimentales se revisaron y se aprobaron por el Institutional Animal Care and Use Committee de UC Davis. Seis ratas Lewis (9-11 semanas de edad; peso = 219 ± 9 g) se anestesiaron con una mezcla de ketamina (80 mg/kg) y xilazina (7,5 mg/kg) administrada por inyección intramuscular. Los transmisores EKG se colocaron en la cavidad peritoneal de cada rata y se tunelaron dos

electrodos EKG por vía subcutánea al hombro derecho y al caudal del espacio xifoides hasta la caja torácica. Se administró un analgésico, carprofeno (5 mg/kg, subcutáneo), al final de la cirugía. Dos semanas después de la cirugía, se realizó un registro EKG inicial en las ratas durante 2 h (día 1). Después, se inyectó el vehículo por vía subcutánea (PBS + suero de rata al 2 %) y se continuó el registro durante 8 h más. Después, los animales se devolvieron a sus jaulas. El día 2, se realizó un registro EKG inicial durante 2 h después de lo cual, se inyectó por vía subcutánea ShK(L5) (10 µg/kg disuelto en vehículo) y el registro EKG continuó durante 8 h más. Los datos registrados de 1,5 a 3,5 h después de las inyecciones se usaron para el análisis de los parámetros de variabilidad de la frecuencia cardíaca estándar tanto en los dominios de tiempo como de frecuencia usando el software Nevokard (Bio-Impedance Technology, Inc., Chapel Hill, NC).

10

Estudios de toxicidad subcrónica. Ratas Lewis (9-11 semanas de edad; peso, 199 ± 7 g) recibieron inyecciones subcutáneas de ShK(L5) 10 µg/kg/día ($n = 6$) o solución salina ($n = 6$) durante 2 semanas. Las ratas se pesaron a diario. El Comparative Biology Laboratory en la University of California, Davis realizó el análisis químico (COBAS MIRA Plus; Roche Diagnostic Systems, Branchburg, NJ) y hematológico (analyzer de hematología multiespecie HEMAVET® 850; CDC Technologies, Oxford, CT) en muestras sanguíneas extraídas al final de 2 semanas. Suspensiones celulares individuales preparadas a partir de timos y bazo extraídos de seis animales a los que se les dio ShK(L5) y seis a los que se les dio solución salina se tiñeron con anticuerpos específicos para diversos marcadores de linfocitos T y B (BD Pharmingen) y se analizaron por citometría de flujo.

15

Prevención y tratamiento de EAE adoptiva aguda y prevención de DTH en ratas Lewis. Se adquirieron ratas Lewis endógamas hembra de 9 a 11 semanas de edad en Harlan-Sprague-Dawley (Indianapolis, IN) y se alojaron en condiciones de barrera con comida para roedores irradiada y agua acidificada *ad libitum*. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con las directrices del National Institutes of Health y se aprobaron por el Institutional Animal Care and Use Committee en la University of California, Irvine. ShK(L5) se disolvió en PBS + suero de rata Lewis al 2 % (solución salina) para inyección subcutánea. Se indujo EAE adoptiva aguda como se ha descrito previamente (Beeton y col., 2001a,b) con 6×10^6 células PAS activadas por (MBP) de proteína básica de mielina. Se extrajo MBP de médula espinal de cobayas congeladas (Harlan Bioproducts, Indianapolis, IN) como se ha descrito previamente (Deibler y col., 1972). Las ratas se pesaron a diario y se observaron dos veces al día para evaluar los signos clínicos de la EAE. Para los ensayos de prevención, las ratas recibieron 10 µg/kg/día de ShK(L5) desde el día 0 a 5, mientras que las ratas de control recibieron solución salina. Para los ensayos de tratamiento, la administración de ShK(L5) (10 µg/kg/día) o solución salina se comenzó después de la aparición de la enfermedad (las ratas tenían la cola caída, estaban encorvadas, y habían perdido ≥ 6 % de su peso durante 24 h) y se continuó durante 3 días.

25

30

Para los ensayos de DTH, las ratas Lewis se inmunizaron con una emulsión de ovalbúmina en adyuvante completo de Freund (Difco, Detroit, MI). Siete días después, recibieron una inyección de ovalbúmina disuelta en solución salina en el pabellón auricular de una oreja y solución salina en la otra oreja. Después, las ratas recibieron inyecciones subcutáneas de ShK(L5) (10 µg/kg/día) o vehículo (PBS + suero de rata Lewis al 2 %). La hinchazón de la oreja se midió 24 y 48 h más tarde usando un micrómetro cargado con resorte (Mitutoyo, Spokane, WA).

35

40 Resultados

ShK(L5), un análogo de ShK novedoso que muestra una selectividad de 100 veces para Kv1.3 sobre Kv1.1. ShK bloquea el canal Kv1.1 neuronal y el canal Kv1.3 con una potencia aproximadamente equivalente. Por lo tanto, la neurotoxicidad es una preocupación bajo las circunstancias que compromete la barrera hematoencefálica y permite la entrada de cantidades suficientes de ShK para bloquear los canales Kv1.1. La estrategia para diseñar un inhibidor específico de Kv1.3 se guió por el hallazgo de que fluoresceína-6-carboxilato (F6CA) que contiene ShK-F6CA unido a través de un enlazador Aeea de 20 Å de largo al extremo N de ShK mostró 80 veces de selectividad para Kv1.3 sobre Kv1.1 (Beeton y col., 2003). Dado que F6CA puede existir como un carboxilato restringido o también como una lactona ciclada, no estaba claro si la especificidad a Kv1.3 de ShK-F6CA fue un resultado de la carga negativa de F6CA, la hidrofobicidad creada por este núcleo de fluoresceína voluminoso grande, el apilamiento electrónico π - π planar potencial, o una combinación de todas estas contribuciones potenciales. Para distinguir entre estas posibilidades y con la intención de desarrollar un inhibidor selectivo a Kv1.3 no fluorescente, se generó una serie de 12 análogos de ShK N-terminalmente sustituidos para probar algunas de estas interacciones. Uniendo tirosina, fenilalanina o sus derivados (variables en carga, tamaño e hidrofobicidad) a través de un enlazador Aeea al extremo N de ShK, se pudo probar los efectos de carga e hidrofobicidad para comprender mejor la mejora de selectividad observada con la sustitución de F6CA.

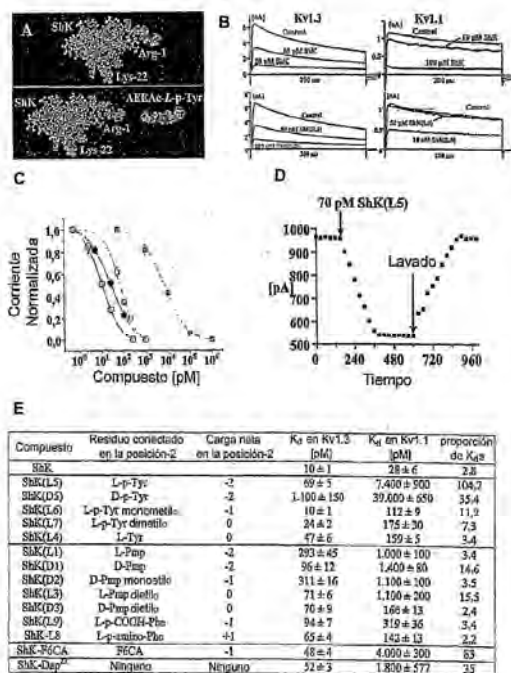
45

50

55

En el ejemplo mostrado en la figura 1A, L-fosfotirosina (L-*p*Tyr), un aminoácido aromático modificado post-traduccionalmente negativamente cargado (carga neta -2), se unió a través del enlazador AEEA a ShK-Arg¹ para

generar un análogo novedoso denominado ShK(L5). ShK y ShK(L5) se ensayaron en los canales Kv1.3 y Kv1.1 expresados de forma estable en células L929. La figura 1B muestra los efectos de ShK y ShK(L5) en corrientes de Kv1.3 y Kv1.1 provocadas por pulsos de despolarización de 200 ms de un potencial de retención de -80 a 40 mV. Ambos péptidos bloquearon de forma reversible Kv1.3 y Kv1.1 de una manera dependiente de la dosis con 5 coeficientes de Hill de 1 (figura 1, B-D). Los valores de K_d se determinaron a partir de las curvas dosis-respuesta mostradas en la figura 1C usando el software Origin. ShK bloqueó Kv1.3 ($K_d = 10 \pm 1$ pM) y Kv1.1 ($K_d = 28 \pm 6$ pM) con una potencia aproximadamente equivalente según se esperó (figura 1C). Por el contrario, ShK(L5) fue selectivo 100 veces para Kv1.3 ($K_d = 69 \pm 5$ pM) sobre Kv1.1 ($K_d = 7,4 \pm 0,8$ nM) (figura 1, B y C). El transcurso de tiempo del bloqueo de corriente de Kv1.3 por ShK(L5) y su lavado se muestra en la figura 1D. La constante temporal (T_{ON}) de absorción de ShK(L5) fue 131 ± 21 s ($n = 7$), mientras que la constante temporal (T_{OFF}) para el lavado peptídico fue de 150 ± 28 s ($n = 4$). La K_d (57 ± 7 pM) calculada a partir de los valores de K_{ON} ($15 \times 10^6 \pm 0,5 \times 10^6$ M⁻¹s⁻¹) y K_{OFF} (0.0059 ± 0.0013 s⁻¹) es consistente con la K_d (69 ± 5 pM) determinada con el uso del software Origin.



15 **Figura 1.**

Generación de un bloqueador de Kv1.3 selectivo. A, modelo molecular de ShK basado en la estructura de RMN publicada. El Lys²², crítico para el bloqueo de canal, se resalta en color naranja. L-pTyr se unió al grupo α-amino de Arg¹ de ShK (resaltado en color cian) a través de un enlazador Aeea (derecha). Las estructuras del enlazador y L-pTyr se modelaron con AM1 en Hyperchem. B, efecto de ShK (superior) y ShK(L5) (inferior) en corrientes de Kv1.3 y Kv1.1 en células transfectadas de forma estable. C, inhibición dependiente de la dosis de Kv1.3 (símbolos abiertos) y Kv1.1 (símbolos cerrados) por ShK (azul) y ShK(L5) (rojo). Los valores de K_d en Kv1.3 = 10 ± 1 pM (ShK) y 69 ± 5 pM (ShK(L5)); valores de K_d en Kv1.1 = 28 ± 6 pM (ShK) y $7,4 \pm 0,8$ nM (ShK(L5)). D, transcurso de tiempo de absorción y lavado de ShK(L5) en Kv1.3. Las células se mantuvieron a un potencial de retención de -80 mV y se despolarizaron durante 200 ms a 40 mV cada 30 s. E, valores de K_d mostrados para la inhibición de Kv1.3 y Kv1.1 por análogos de ShK. Los valores de K_d para ShK-F6CA y ShK-Dap²² proceden de fuentes publicadas (Kalman y col., 1998; Beeton y col., 2003; Chandy y col., 2004).

Se ensayaron otros análogos de ShK en los canales Kv1.3 y Kv1.1 (figura 1E). ShK(D5) que contenía D-fosfotirosina fue selectivo 35 veces para Kv1.3 sobre Kv1.1, pero fue de un orden de magnitud menos potente que ShK(L5). ShK(L6) que contenía L-pTyr-monometilo mostró una especificidad moderada (11 veces) para Kv1.3, mientras que los análogos de ShK que contenían L-pTyr-dimetilo o L-Tyr no fueron selectivos para Kv1.3 sobre Kv1.1 (figura 1E). Los análogos que contenían fenilalanina o sus derivados (variables en masa entera, densidad de π electrones y

carga) fueron moderadamente específicos o no específicos para Kv1.3 sobre Kv1.1 (figura 1E). La especificidad de 100 veces de ShK(L5) para Kv1.3 sobre Kv1.1 es mayor que la de ShK-F6CA (80 veces), ShK(D5) (35 veces), ShK-Dap²² (33 veces), o cualquier otro análogo de ShK ensayado (figura 1C).

- 5 **ShK(L5) es un inhibidor de Kv1.3 altamente específico.** Se evaluó la especificidad de ShK(L5) en un panel de 20 canales iónicos (Tabla 1). ShK(L5) bloqueó el canal Kv1.3 en linfocitos T con una K_d (76 pM) equivalente a su K_d en el canal clonado (69 pM). Fue selectivo 100 veces para Kv1.3 sobre Kv1.1, selectivo 260 veces sobre Kv1.6, selectivo 280 veces sobre Kv3.2, selectivo 680 veces sobre Kv1.2 y selectivo >1000 veces sobre todos los demás canales ensayados. Cabe destacar que fue selectivo para Kv1.3 1600 veces sobre KCa3.1, el canal de K^+ activado por calcio que regula la activación de las células indiferenciadas y linfocitos T_{CM} humanos (Wulff y col., 2003). El ShK nativo fue menos selectivo que ShK(L5). ShK fue selectivo 2,8 veces para Kv1.3 ($K_d = 10 \pm 1$ pM) sobre Kv1.1 ($K_d = 28 \pm 6$ pM), selectivo 20 veces sobre Kv1.6 (200 ± 20 pM), selectivo 500 veces sobre Kv3.2 ($K_d = 5000 \pm 1000$ pM), y selectivo >1000 veces sobre Kv1.2 (10 ± 1 nM) y KCa3.1 ($K_d = 28 \pm 3$ nM). Margatoxina, un péptido procedente del veneno de escorpión que se ha promocionado como un inhibidor de Kv1.3 específico (Lin y col., 1993; Koo y col., 1997; Middleton y col., 2003) también fue no específica. Fue selectivo 5 veces para Kv1.3 (110 ± 12 pM) sobre Kv1.2 ($K_d = 520 \pm 1$ pM), selectivo 9 veces sobre Kv1.1 (10 ± 1 nM), y selectivo >1000 veces sobre Kv1.6 y Kv3.2 ($K_d > 100$ nM). La luteolina, un nutracéutico vendido para enfermedades autoinmunes (<http://www.lutimax.com>) sobre la base de que es un inhibidor de Kv1.3 (Lahey y Rajadhyaksha, 2004), bloqueó débilmente Kv1.3 ($K_d = 65 \pm 5$ μ M) y no mostró ninguna selectividad sobre Kv1.1 ($K_d = 77 \pm 5$ μ M), Kv1.2 ($K_d = 63 \pm 4$ μ M), o Kv1.5 ($K_d = 41 \pm 3$ μ M). La exquisita especificidad de ShK(L5) para Kv1.3, junto con su afinidad picomolar para el canal, le hace un inmunosupresor potencialmente atractivo.

TABLA 1
Selectividad de ShK(L5)

Canales	K_d de ShK(L5) pM
Kv1.1	7000 \pm 1000
Kv1.2	48.000 \pm 7000
Kv1.3 (clonado)	69 \pm 5
Kv1.3 (nativo)	76 \pm 8
Kv1.4	137.000 \pm 3000
Kv1.5	100.000 (N.E.)
Kv1.6	18.000 \pm 3000
Kv1.7	100.000 (N.E.)
Kv2.1	100.000 (N.E.)
Kv3.1	100.000 (N.E.)
Kv3.2	20.000 \pm 2000
Kir2.1	100.000 (N.E.)
Kv11.1 (HERG)	100.000 (N.E.)
KCa1.1	100.000 (N.E.)
KCa2.1	100.000 (N.E.)
KCa2.3	100.000 (N.E.)
KCa3.1	115.000 \pm 5000
Nav1.2	100.000 (N.E.)
Nav1.4	100.000 (N.E.)
Canal Cl ⁻ de linfocitos T activados por hinchazón	100.000 (N.E.)
Cav1.2	100.000 (N.E.)
- N.E., ningún efecto	

25

- ShK(L5) suprime preferiblemente y de forma persistente la proliferación de linfocitos T_{EM} humanos.** Para evaluar la actividad inmunosupresora *in vitro* de ShK(L5), se comparó su capacidad para suprimir la proliferación estimulada por el anticuerpo anti-CD3 de las líneas de linfocitos T_{EM} humanos frente a las PBMC humanas que contienen una mezcla de linfocitos indiferenciados y T_{CM}. La citometría de flujo confirmó los fenotipos de la superficie celular de las dos poblaciones estudiadas. Las líneas T_{EM} fueron >90 % de CCR7⁻CD45RA⁺ (figura 2A), mientras que las PBMC contenían un 65 % de linfocitos CCR7⁺CD45RA⁺ (indiferenciados) y un 18 % de linfocitos CCR7⁺CD45RA⁻ (T_{CM}) (figura 2B). La figura 2C muestra que ShK(L5) y ShK eran 60 veces más eficaces en la supresión de la proliferación de linfocitos T_{EM} ($CI_{50} = \sim 80$ pM) en comparación con las PBMC ($CI_{50} = 5$ nM, $p < 0,05$). La sensibilidad inferior de las PBMC puede explicarse por una rápida regulación por aumento de los canales KCa3.1 en las células

30

indiferenciadas y los linfocitos T_{CM} tras la estimulación como se ha indicado previamente (Ghanshani y col., 2000; Wulff y col., 2003). De acuerdo con esta interpretación, las PBMC activadas durante 48 h para regular por aumento la expresión de KCa3.1, después en reposo durante 12 h y activadas de nuevo con el anticuerpo anti-CD3, fueron completamente resistentes al bloqueo de ShK(L5) (figura 2D, flecha superior). Las PBMC que se habían suprimido por ShK(L5) durante la primera ronda de estimulación mostraron una resistencia idéntica a ShK(L5) cuando las células se lavaron, reposaron y se estimularon de nuevo con el anticuerpo anti-CD3. Estos resultados corroboran un informe anterior que mostraba que las células indiferenciadas y los linfocitos T_{CM} escapan de los inhibidores de Kv1.3 por la regulación por aumento de los canales KCa3.1 (Wulff y col., 2003). Por lo tanto, ShK(L5) suprime preferiblemente y de forma persistente la proliferación de linfocitos T_{EM}.

10

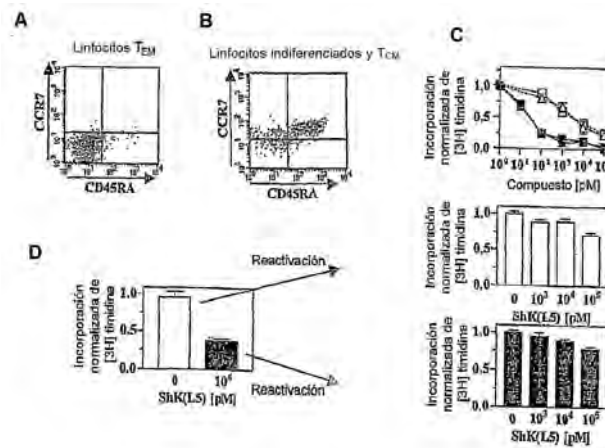


Figura 2.

ShK(L5) suprime preferiblemente la proliferación de linfocitos T_{EM} humanos. Las PBMC humanas (A) y una línea T_{EM} humana (B) se tiñeron con anticuerpos contra CD3, CD45RA y CCR7. Las intensidades de tinción de CD45RA y CCR7 se determinaron por citometría de flujo en la población regulada por CD3⁺. C, inhibición dependiente de la dosis por ShK (azul) y ShK(L5) (rojo) de la incorporación de [³H] timidina por las PBMC (símbolos abiertos, una mezcla de células indiferenciadas/linfocitos T_{CM}) y linfocitos T_{EM} (símbolos cerrados) estimulados durante 48 h con anticuerpo anti-CD3. D, PBMC humanas previamente activadas (células indiferenciadas/linfocitos T_{CM}) que regulan por aumento la expresión de KCa3.1 (Ghanshani y col., 2000) que se vuelven resistentes a la inhibición de ShK(L5) cuando se reactivan con el anticuerpo anti-CD3. Se ha demostrado previamente que estas células se vuelven sensibles al inhibidor específico de K_{Ca}3.1 TRAM-34 (Ghanshani y col., 2000).

ShK(L5) inhibe la proliferación de y la producción de IL2 por los linfocitos T_{EM} de rata; la IL2 exógena anula parcialmente la supresión. Como un preámbulo para evaluar la eficacia terapéutica de ShK(L5), se examinó su capacidad para suprimir la proliferación de la línea de linfocitos T de memoria, PAS, que provoca una enfermedad tipo EM en ratas (Beraud y col., 1993). Como un control, se usaron linfocitos T de bazo de rata. Para confirmar el estado de diferenciación de las dos poblaciones celulares, se evaluó la expresión de CD45RC, un marcador de linfocitos T indiferenciados (Bunce y Bell, 1997). Los linfocitos T esplénicos de rata fueron un 76 % de CD45RC⁺ (es decir, principalmente células indiferenciadas), mientras que las células PAS fueron CD45RC⁻, lo que sugiere que son células de memoria (figura 3A). Para determinar si las células PAS están en el estado T_{EM} o T_{CM}, se examinó la expresión de Kv1.3 antes y 48 h después de la activación. Se espera que los linfocitos T_{EM}, pero no los linfocitos T_{CM}, regulen por aumento significativamente los niveles de Kv1.3 tras la estimulación (Beeton y col., 2001b, 2003). Los experimentos de fijación de membranas revelaron un llamativo aumento en la amplitud de corriente de Kv1.3 después de la estimulación con MBP de las células PAS coherente con la de sus linfocitos T_{EM} (figura 3B). Como una medida independiente del número de canales Kv1.3 en células PAS, se usó ShK-F6CA, un análogo de SHK marcado de forma fluorescente que se une específicamente a Kv1.3 (Beeton y col., 2003). La intensidad de tinción ShK-F6CA determinada por citometría de flujo refleja el número de tetrámeros de Kv1.3 expresados en la superficie celular (Beeton y col., 2003). La intensidad de tinción de ShK-F6CA (10 nM) aumentó con la activación por MBP de las células PAS, y un exceso de ShK(L5) no etiquetado (100 nM) inhibió de forma competitiva la tinción de ShK-F6CA (figura 3C). Como una prueba final, se realizó microscopía confocal en células PAS inactivas y estimuladas por MBP que se han fijado y teñido con un anticuerpo específico de Kv1.3. De acuerdo con los datos en la figura 3, B y C, los linfocitos T PAS en reposo tenían una intensidad de tinción de Kv1.3 de 4,4 ± 0,6, y este valor aumentó a

40

$10,6 \pm 2,3$ ($p < 0,005$) después de la activación inducida por antígeno (figura 3D), que mostraba un aumento en la expresión de proteína de Kv1.3 después de la activación. Por lo tanto, las células PAS activadas por MBP son linfocitos $CD45RC^- Kv1.3^{high} T_{EM}$, mientras que en los linfocitos T esplénicos de rata usados en estos experimentos están predominantemente en el estado indiferenciado.

5

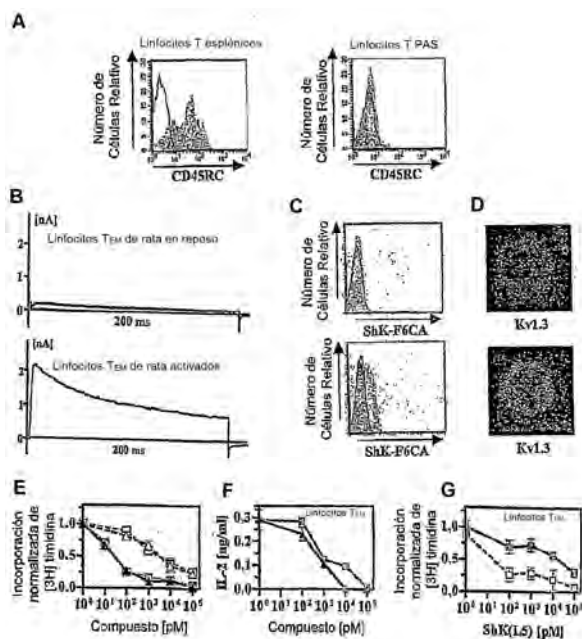


Figura 3.

ShK(L5) suprime preferiblemente la proliferación de linfocitos T_{EM} de rata. A, tinción con CD45RC de linfocitos T esplénicos de rata (izquierda) y linfocitos T PAS (derecha) detectados por citometría de flujo. B, corrientes de Kv1.3 mostradas por linfocitos T PAS inactivos (superior) y activados por el antígeno de mielina (inferior). C, perfiles de citometría de flujo de tinción con ShK-F6CA en linfocitos T PAS inactivos (superior) y activados por antígeno de mielina (inferior). Células no teñidas (líneas de color negro) y células teñidas con ShK-F6CA (relleno de color verde). La competición de la tinción con ShK-F6CA por ShK(L5) no marcado se rellena de color rojo. D, imágenes confocales de la inmunotinción de Kv1.3 en linfocitos T PAS inactivos (superior) y activados con antígeno de mielina (inferior). El análisis estadístico se realizó usando la prueba U de Mann-Whitney. E, inhibición dependiente de la dosis por ShK (azul) y ShK(L5) (rojo) de la incorporación de $[^3H]$ timidina por células de rata indiferenciadas/linfocitos T_{CM} (símbolos abiertos) y linfocitos T_{EM} (símbolos cerrados) activados con Con A ($1 \mu g/ml$). F, inhibición dependiente de la dosis por ShK (azul) y ShK(L5) (rojo) de la secreción de IL2 por los linfocitos T PAS 7 h después de la estimulación con MBP. G, la inhibición inducida por ShK(L5) de la incorporación de $[^3H]$ timidina activada por el antígeno de mielina por los linfocitos T PAS (símbolos abiertos) se invierte por la adición de 20 unidades/ml de IL2 (símbolos cerrados).

La proliferación activada por MBP de las células PAS se suprimió ~ 1000 veces más eficazmente por ShK(L5) y ShK ($CI_{50} = \sim 80$ pM) que la proliferación inducida por mitógeno de linfocitos T esplénicos de rata (figura 3E, $CI_{50} \approx 100$ nM; $p < 0,05$). Estos resultados corroboran los hallazgos con linfocitos T humanos (figura 2). GShK(L5) inhibió la producción de IL2 inducida por MBP por células PAS (figura 3F), y la IL2 exógena parcialmente anuló la supresión de ShK(L5) de la proliferación de células PAS (figura 3G). Estudios anteriores indicaron hallazgos similares con inhibidores de Kv1.3 menos específicos en linfocitos T humanos, de rata o de cerdo enano (Chandy y col., 1984; Koo y col., 1997; Beeton y col., 2001a). En resumen, ShK(L5) es un inhibidor potente y selectivo de linfocitos T_{EM} humanos y de rata y, por lo tanto, puede tener uso terapéutico en enfermedades autoinmunes dirigiéndose preferiblemente a los linfocitos T_{EM} que contribuyen a la patogénesis de estos trastornos (Chandy y col., 2004).

Valores plasmáticos de ShK(L5) después de una administración subcutánea. Antes de embarcarse en estudios *in vivo* en un modelo de EAE de rata, se usó un bioensayo de fijación de membranas para averiguar si los niveles

circulantes de ShK(L5) después de la inyección subcutánea fueron suficientes para inhibir los linfocitos T_{EM} . Se ensayaron muestras de suero de ratas tratadas con ShK(L5) y de control para bloquear la actividad en los canales Kv1.3. El suero de control no mostró ninguna actividad de bloqueo detectable, indicando una ausencia de bloqueadores de canal endógeno. Para estandarizar el ensayo, se añadieron cantidades conocidas de ShK(L5) al suero de rata, y estas muestras se ensayaron en canales Kv1.3. Las muestras de suero con adiciones bloquearon las corrientes de Kv1.3 de una forma dependiente de la dosis (K_d , 77 ± 9 pM) que fue indistinguible del efecto de ShK(L5) en ausencia de suero (figura 4A). Los niveles de ShK(L5) en animales tratados se determinaron por comparación con la curva estándar. ShK(L5) fue detectable en suero 5 min después de una única inyección subcutánea de 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (figura 4B). Los niveles pico (12 nM) se alcanzaron en 30 min y después el nivel cayó hasta un valor inicial de aproximadamente 300 pM durante 420 min (figura 4B). La desaparición de ShK(L5) de la sangre pudo ajustarse por un único exponencial (figura 4C). La semivida circulante se estimó en ~ 50 min.

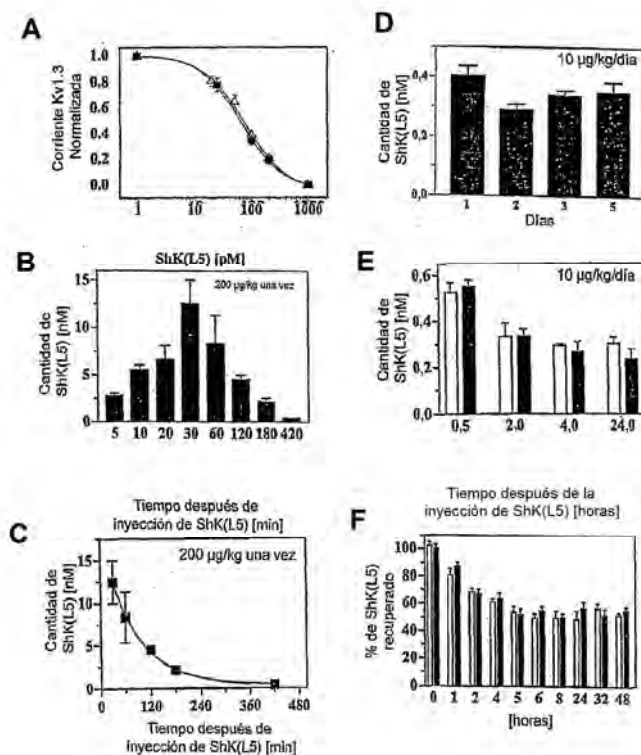


Figura 4.

15

Semivida circulante y estabilidad de ShK(L5). A, se añadieron cantidades conocidas de ShK(L5) a suero de rata (■) o a PBS (▲) y la actividad de bloqueo se determinó en canales Kv1.3 expresados de forma estable en células L929. B, una única dosis de 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de ShK(L5) se inyectó por vía subcutánea a cuatro ratas. Se extrajo sangre en los momentos indicados y el suero se ensayó por fijación de membranas para determinar la cantidad de ShK(L5). C, datos ajustados a un único decaimiento exponencial. Semivida ≈ 50 min. D, cinco ratas Lewis recibieron inyecciones subcutáneas a diario individuales de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ de ShK(L5) durante 5 días. Se extrajo sangre cada mañana (24 h después de la inyección previa) y se ensayó para el bloqueo de la actividad en los canales Kv1.3 por fijación de membranas. E, las ratas recibieron una única dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de ShK(L5) por vía subcutánea (barras blancas; $n = 4$) o intravenosa (barras negras; $n = 4$). Se extrajo sangre en los momentos indicados. El suero se ensayó por fijación de membranas para determinar la cantidad de ShK(L5) en sangre. F, una dosis de hemi-bloqueo de ShK(L5) al plasma de rata (□) o a PBS que contenía plasma de rata al 2% (■) y se incubó a 37 °C durante una duración variable. Las alícuotas se recogieron en los momentos indicados y la actividad de bloqueo se determinó en los canales Kv1.3.

30 Dado que el nivel sérico máximo después de 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (12 nM) excede significativamente el requisito para el

bloqueo selectivo de los canales Kv1.3 y la función de los linfocitos T_{EM}, se ensayaron dosis inferiores. Después de una única inyección de 10 µg/kg, la concentración sérica máxima de ShK(L5) alcanzó ≈500 pM en 30 min (datos no mostrados), una concentración suficiente para bloquear >90 % de Kv1.3 pero sin afectar a Kv1.1. La administración a diario repetida de esta dosis (10 µg/kg/día) dio como resultado niveles en estado estable de ~300 pM (medidos 5 24 h después de la inyección; figura 4D), que es suficiente para causar una supresión del 60 al 70 % de linfocitos T_{EM} con poco efecto sobre las células indiferenciadas/linfocitos T_{CM}. El nivel en "estado estable" es inesperado dada la semivida circulante estimada de ~50 min e indica que ShK(L5) se "acumula" en una administración repetida. Para determinar si el "depósito" estaba en la piel o en otra parte en el cuerpo, se midieron los niveles en sangre de ShK(L5) 10 h después de que las ratas recibieran inyecciones intravenosas o subcutáneas individuales de 10 µg/kg 10 de ShK(L5). El péptido desapareció con el mismo transcurso de tiempo después de la administración por cualquier ruta (figura 4E) indicando que la piel no es responsable del nivel en estado estable de 300 pM de ShK(L5) alcanzado después de una única inyección diaria de 10 µg/kg (figura 4D), y el depósito o los depósitos residen en otra parte.

El éxito al conseguir un nivel en estado estable de 300 pM de ShK(L5) después de inyecciones individuales a diario 15 de 10 µg/kg/día sugiere que el péptido puede ser estable *in vivo*. Para examinar su estabilidad, se incubó ShK(L5) en plasma de rata o en PBS que contenía plasma de rata al 2% a 37 °C durante duraciones variables y después se midió la actividad de bloqueo de Kv1.3. En ambos conjuntos de muestras con adiciones (plasma y PBS) se observó una reducción del 50 % en la actividad de bloqueo de Kv1.3 en aproximadamente 5 h, presumiblemente debido a la unión del péptido a la superficie plástica del tubo, y después el nivel permaneció estable durante los siguientes 20 días (figura 4F). Como un ensayo de estabilidad añadido, se comparó la actividad de bloqueo de Kv1.3 frente a la actividad de bloqueo de Kv1.1 de sueros de ratas tratadas con ShK(L5). Si ShK(L5) se modifica *in vivo*, por 25 desfosforilación de pTyr o escisión de la cadena lateral Aeea-pTyr, producirá ShK(L4) y ShK, respectivamente, ninguno de los cuales es selectivo para Kv1.3 sobre Kv1.1 (figura 1E). Las muestras en suero de animales tratados con ShK(L5) mostraron la misma selectividad para Kv1.3 sobre Kv1.1 que ShK(L5), indicando que el péptido no experimenta las modificaciones que se han indicado anteriormente. Tomados en conjunto, estos resultados indican que ShK(L5) es notablemente estable en plasma y alcanza concentraciones en suero farmacológicamente relevantes después de inyecciones subcutáneas diarias individuales de 10 µg/kg.

Estudios de toxicidad. Se realizaron varios ensayos *in vitro* e *in vivo* para determinar si ShK(L5) muestra alguna 30 toxicidad (Tabla 2). Las células linfoides humanas y de rata incubadas durante 48 horas con una concentración (100 nM) de ShK(L5) >1200 veces mayor que la dosis de hemi-bloqueo de Kv1.3 o la Cl₅₀ para la supresión de T_{EM} (70-80 pM), mostraron una citotoxicidad mínima. La misma alta concentración de ShK(L5) fue negativa en el ensayo de Ames en la cepa de ensayo TA97A, sugiriendo que no es un mutagen. Ningún ensayo *in vitro* pudo detectar una toxicidad significativa.

35

TABLA 2

Estudio de toxicidad de ShK(L5). Los datos se expresan como media ± D.E.

Pruebas <i>in vitro</i>		ShK(L5) 100 nM	
Citotoxicidad (% de células muertas)			
PBMC humanas		7,5 ± 4,3	
Linfocitos T PAS		8,1 ± 0,8	
Células Jurkat		5,5 ± 3,3	
Linfoma de Burkitt		3,1 ± 0,9	
Mieloma RPMI 8226		6,5 ± 2,1	
Ensayo de Ames		Negativo	
Ensayos <i>in vivo</i> agudos		Solución salina	SHK(L5) 10 µg/kg
Electrocardiograma*			
Frecuencia cardiaca		302 ± 13	311 ± 20
SDNN		13,3 ± 3,0	17,8 ± 4,4
% CV		6,7 ± 1,4	92 ± 2,2
SDANN _{5min}		5,0 ± 2,0	6,9 ± 2,3
rMSSD		6,8 ± 2,2	9,8 ± 3,5
HF (n.u.)		71 ± 21	79 ± 37
HF (%)		50 ± 8	53 ± 10
LF (n.u.)		68 ± 4	64 ± 10
LF (%)		50 ± 8	47 ± 10
LF/HF		1,1 ± 0,4	1,3 ± 0,7

Ensayos sub-crónicos <i>in vivo</i>	Solución salina	ShK(L5) 10 µg/kg/día durante 2 semanas
Aumento de peso (%)	72 ± 1,8	62 ± 1,7
Recuento sanguíneo completo		
Hematocrito (%)	403 ± 1,4	39,0 ± 4,9
Hemoglobina (g/dl)	15,3 ± 0,5	15,0 ± 1,5
MCV (fl)	48,5 ± 0,2	48,3 ± 0,3
MCH (pg)	18,5 ± 0,8	18,5 ± 0,6
MCHC (g/dl)	38,0 ± 1,8	38,4 ± 1,3
Glóbulos blancos totales (x 10 ³ mm ⁻³)	7,1 ± 2,1	7,1 ± 2,5
Glóbulos rojos totales (x 10 ⁶ mm ⁻³)	8,3 ± 0,3	8,1 ± 1,0
Plaquetas totales (x 10 ³ mm ⁻³)	656 ± 214	606 ± 106
Química sanguínea		
Fosfatasa alcalina (U/l)	170 ± 26	150 ± 18
Glucosa (mg/dl)	139 ± 21	150 ± 18
Nitrógeno ureico en sangre (mg/dl)	17,1 ± 2,6	15,0 ± 1,7
Creatinina (mg/dl)	0,6 ± 0	0,6 ± 0,1
Albumina (g/dl)	5,0 ± 0,3	4,5 ± 0,4
Poblaciones celulares tímicas (%).		
CD4 ⁻ CD8 ⁻	3,6 ± 1,1	43 ± 0,7
CD4 ⁺ CD8 ⁺	77,8 ± 6,1	76,8 ± 4,1
CD4 ⁺ CD8 ⁻	8,5 ± 1,7	11,2 ± 2,0
CD4 ⁻ CD8 ⁺	10,0 ± 3,3	7,6 ± 1,3
CD3 ⁺	89,5 ± 1,6	93,2 ± 3,5
Poblaciones esplénicas (%)		
CD3 ⁺	72,4 ± 4,4	65,4 ± 0,1
CD3 ⁺ CD45RC ⁺	35,6 ± 2,6	39,8 ± 1,1
CD3 ⁺ CD45RC ⁻	23,6 ± 2,3	26,5 ± 1,3
CD3 ⁺ CD4 ⁺	62,7 ± 0,1	66,6 ± 1,2
CD3 ⁺ CD8 ⁺	26,9 ± 0,1	25,0 ± 0,2
IgM ⁺	38,8 ± 1,5	33,3 ± 0,3

^a Ensayado con pruebas *t*, *P* < 0,05 en todos los parámetros.
- SDNN, Desviación estándar de todos los intervalos RR normal-normal; % CV, 100 x SDNN/intervalo RR medio; SDANN_{5 min}, desviación estándar de la media de los intervalos RR normales para cada periodo de 5 min; rMSSD, media cuadrática de diferencia sucesiva; HF (n.u.), energía de alta frecuencia (0,75-2,5 Hz) en unidad normalizada; LF (n.u.), energía de baja frecuencia (0,2-0,75 Hz) en unidad normalizada; MCV, volumen corpuscular medio; MCH, hemoglobina corpuscular media; MCHC, concentración de hemoglobina corpuscular media.

El bloqueo inducido por fármacos de los canales Kv11.1 (HERG) ha contribuido a una mayor toxicidad cardiaca y la retirada de varios medicamentos del mercado. ShK(L5) no tiene ningún efecto sobre los canales Kv11.1 a 100 nM (>1430 veces la *K_d* para Kv1.3), y, por lo tanto, el régimen terapéutico escogido (10 µg/kg/día, 300 pM de nivel 5 circulante en estado estable) no debería causar cardiotoxicidad. Como un ensayo adicional, se realizó un análisis de variabilidad de la frecuencia cardiaca en ratas conscientes a las que se administró vehículo (PBS + suero de rata al 2 %) el día 1, seguido de 10 µg/kg/día de ShK(L5) el día 2. ShK(L5) no tuvo ningún efecto sobre la frecuencia cardiaca ni los parámetros HRV estándar (variabilidad de la frecuencia cardiaca) tanto en el dominio de tiempo como de frecuencia (Task Force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing 10 Electrophysiology, 1996).

Estimulados por los experimentos de toxicidad aguda, se realizó un estudio de toxicidad subcrónica en el que se administraron inyecciones subcutáneas diarias a ratas de 10 µg/kg de ShK(L5) o vehículo durante 2 semanas (*n* = 6 en cada grupo). Los animales tratados con ShK(L5) ganaron peso en el mismo grado que las ratas que recibieron 15 vehículo (Tabla 2). El análisis hematológico y de química de sangre no mostró ninguna diferencia entre las ratas tratadas con ShK(L5) y con vehículo, y el análisis citométrico de flujo no reveló diferencias en las proporciones de subconjuntos de timocitos o linfocitos (Tabla 2). En conjunto, estos estudios sugieren que ShK(L5) es seguro.

Parar determinar el índice de seguridad terapéutica, se administró una dosis 60 veces superior (600 µg/kg/día) de 20 ShK(L5) a ratas sanas durante 5 días y no se observó ningún signo clínico de toxicidad, y no se percibió toxicidad

cuando ratas sanas recibieron una única inyección de 1000 µg/kg de ShK(L5). La situación es menos optimista cuando la barrera hematoencefálica está comprometida, como sucede en EAE y EM. Las ratas con EAE que recibieron ShK(L5) 10 µg/kg/día durante 10 días, no mostraron signos de toxicidad. Por el contrario, el 40 % de las ratas (5 de 12) a las que se administraron 600 µg/kg/día durante 5 días, murieron el quinto día cuando desarrollaron 5 signos clínicos de EAE (DL_{50} extrapolada = 750 µg/kg/día). Ya que la concentración pico de ShK(L5) en el suero (12 nM) después de administración de una única inyección de 200 µg/kg es suficiente para bloquear >50 % de los canales Kv1.1, la toxicidad observada en ratas con EAE a las que se administraron 600 µg/kg/día de ShK(L5) está causada probablemente a la entrada en el cerebro de cantidades suficientes de ShK(L5) para bloquear Kv1.1. Por lo tanto, el índice de seguridad terapéutica eficaz de ShK(L5) excede ampliamente de 100 en situaciones en las que la 10 barrera hematoencefálica no está comprometida (como se observa en enfermedades autoinmunes que NO afectan al sistema nervioso central), mientras que el índice de seguridad terapéutico es de 75 cuando se rompe la barrera hematoencefálica.

ShK(L5) previene y trata EAE adoptiva aguda y previene DTH en ratas Lewis. Se evaluó ShK(L5) para 15 comprobar la actividad inmunosupresora *in vivo* en dos modelos animales. Se ensayó su capacidad para prevenir y tratar EAE aguda inducida por la transferencia de linfocitos T_{EM} PAS activados por MBP en ratas Lewis (Beeton y col., 2001a,2001b; Beraud y col., 1993), así como para suprimir la reacción de DTH mediada por los linfocitos T_{EM} (Soler y col., 2003). Las células PAS se activaron con MBP durante 48 h *in vitro* y después se transfirieron de forma adoptiva ($6-8 \times 10^6$ células viables) a ratas Lewis. Para el ensayo de prevención, después, las ratas recibieron 20 inyecciones subcutáneas de solución salina (ratas de control) o ShK(L5) (10 µg/kg/día) durante 5 días. En el primer ensayo de prevención, las ratas de control desarrollaron EAE leve (puntuación clínica máxima promedio $2,0 \pm 1,2$) con una aparición media de $5,6 \pm 0,6$ días (no mostrado). ShK(L5) redujo la gravedad de la enfermedad (puntuación clínica máxima promedio, $0,7 \pm 0,6$, $p < 0,05$). En el segundo ensayo de prevención, las ratas de control desarrollaron EAE más grave (puntuación clínica máxima promedio $3,2 \pm 0,4$) con una aparición media de $4,8 \pm 25$ 0,4 días (figura 5A). ShK(L5) redujo significativamente la gravedad de la enfermedad (puntuación clínica máxima promedio $0,6 \pm 0,4$, $p < 0,007$), pero no retrasó significativamente la aparición de la enfermedad ($5,5 \pm 0,7$ días; $p = 0,07$). No se apreciaron signos de toxicidad en estos estudios.

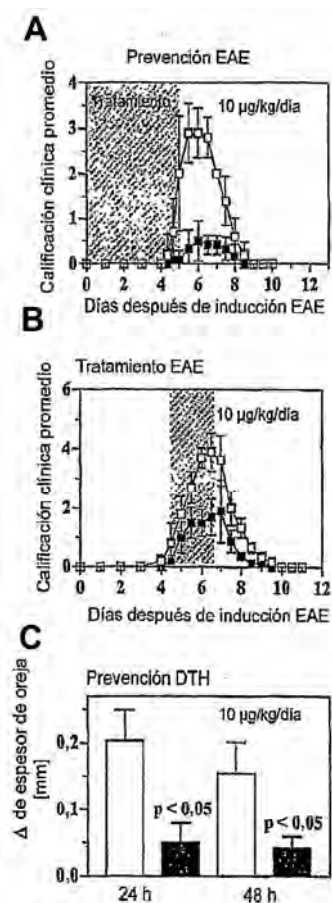


Figura 5.

- ShK-L5 previene DTH y EAE adoptiva aguda en ratas Lewis. A, prevención de EAE. Los linfocitos T PAS se activaron *in vitro*, se lavaron y se inyectaron por vía intraperitoneal el día 0. Puntuación clínica de EAE: 0 = sin signos clínicos, 0,5 = cola caída distal, 1 = cola caída, 2 = paraparesia o ataxia leve, 3 = paraparesia moderada, 4 = parálisis completa de las extremidades posteriores, 5 = 4 + incontinencia, 6 = muerte. A las ratas ($n = 6$ /grupo) se les inyectó por vía subcutánea vehículo (□; $n = 6$) o ShK(L5) (■; $n = 6$; 10 µg/kg/día) del día 0 al día 5. B, tratamiento de EAE. Los linfocitos T PAS se activaron *in vitro*, se lavaron y se inyectaron por vía intraperitoneal el día 0. El tratamiento con ShK(L5) a 10 µg/kg/día se inició cuando las ratas desarrollaron signos clínicos de EAE y se continuó durante 3 días. C, la reacción de DTH se provocó contra ovalbúmina y las ratas ($n = 6$ /grupo) se trataron con ShK(L5) 10 µg/kg/día durante 2 días, después de lo cual se midió la hinchazón de la oreja. El análisis estadístico se realizó usando la prueba *U* de Mann-Whitney.
- 15 En el ensayo de tratamiento (figura 5B), a las ratas se les inyectaron células PAS activadas con MBP, se les administró una solución salina o 10 µg/kg/día de ShK(L5) cuando desarrollaron inicialmente signos de EAE (cola caída, postura jorobada y pérdida del 6 % o más de su peso durante 24 horas), y la terapia continuó durante tres días. Los signos clínicos de EAE alcanzaron su punto máximo el día 6 en el grupo de control (puntuación = $3,9 \pm 0,7$) y el día 7 en el grupo tratado (puntuación = $1,9 \pm 0,9$; $p < 0,05$).
- 20 Como una evaluación independiente de la actividad inmunosupresora de ShK(L5) *in vivo*, también se examinó su eficacia en la inhibición de la reacción de DTH que está mediada predominantemente por los linfocitos T_{EM} de tropismo cutáneo (Soler y col., 2003). Las ratas Lewis inmunizadas con ovalbúmina y adyuvante se estimularon 7 días más tarde con ovalbúmina en una oreja y solución salina en la otra oreja. Después, las ratas recibieron 25 inyecciones de solución salina (ratas de control) o ShK(L5) (10 µg/kg/día) y se midió el grosor de la oreja como una

indicación de DTH. Todas las ratas de control desarrollaron hinchazón de oreja 24 y 48 h después de la estimulación con ovalbúmina, mientras que la reacción de DTH fue sustancialmente más moderada en los animales tratados con ShK(L5) (figura 5C). Por lo tanto, ShK(L5) inhibe la respuesta de DTH mediada por T_{EM}, y previene y mejora la EAE adoptiva grave inducida por linfocitos T_{EM} activados con mielina.

5

Análisis

Se ha desarrollado un inhibidor de Kv1.3 altamente específico uniendo el aminoácido cargado negativamente L-pTyr al extremo N de ShK a través de un enlazador hidrófilo de 20 A. ShK(L5) bloquea Kv1.3 con una K_d de 69 pM y muestra una selectividad para Kv1.3 de 100 veces sobre Kv1.1, 260 veces sobre Kv1.6, 280 veces sobre Kv3.2, 680 veces sobre Kv1.2, y >1000 veces sobre todos los demás canales ensayados. Otros bloqueadores conocidos de Kv1.3 son significativamente menos selectivos que ShK(L5). Margatoxina, un péptido del veneno de escorpión *Centruroides margaritatus*, suprime la DTH en cerdos enanos (Koo y col., 1997), pero muestra únicamente una selectividad de 5 veces para Kv1.3 (K_d, 110 pM) sobre Kv1.2 (K_d, 520 pM) y una selectividad de 9 veces sobre Kv1.1 (K_d, 10 nM). La kaliotoxina del escorpión *Androctonus mauritanicus* suprime la DTH en ratas y mejora la EAE (Beeton y col., 2001a) y la resorción ósea inflamatoria en enfermedad periodontal experimental (Valverde y col., 2004), pero es menos potente (Kv1.3 K_d, 650 pM) y menos selectiva (Grissmer y col., 1994) que ShK(L5). Los primeros bloqueadores de Kv1.3 de molécula pequeña con afinidad nanomolar que se descubrieron - iminodihidroquinolinas WIN-17317 y CP-339818 y la bencidril piperidina UK-78282 - también bloquean los canales de sodio (Wanner y col., 1999) y el canal Kv1.4 neuronal (Hanson y col., 1999). Los inhibidores de Kv1.3 de molécula pequeña desarrollados por Merck - correolida (Felix y col., 1999; Hanner y col., 1999; Koo y col., 1999; Bao y col., 2005), benzamidas sustituidas con ciclohexilo (Schmalhofer y col., 2002) y candelalidas A-C (Singh y col., 2001) - son escasamente selectivos para Kv1.3. Psora-4, el bloqueador de Kv1.3 de molécula pequeña más potente (K_d, 3 nM) es únicamente selectivo de 16 a 20 veces para Kv1.3 sobre Kv1.1 y Kv1.2, y selectivo 2,5 veces sobre el canal Kv1.5 cardíaco (Vennekamp y col., 2004). La luteolina, un flavonoide que mejora la EAE en ratas (Hendriks y col., 2004), se vende como un nutraceutico (<http://www.lutimax.com>; <http://www.synorx.com>), aparentemente debido a su capacidad para bloquear los canales Kv1.3 (Lahey y Rajadhyaksha, 2004). Sin embargo, la luteolina es un inhibidor de Kv1.3 débil (K_d, 65 μM) y no es selectivo para Kv1.3 sobre Kv1.1, Kv1.2, o Kv1.5. Ningún otro bloqueador de molécula pequeña de Kv1.3 conocido - sulfamidebenzamidoindanos (Castle y col., 2000), diclorofenilpirazolopirimidinas (Atwal y col., 2001), furoquinolina Ibu-8 (Butenschon y col., 2001), tetrafenilporfirinas (Gradl y col., 2003), 3-alkil- y 3-aryl-7H-furo[3,2-g]cromen-7-onas (Wernekenschnieder y col., 2004), y derivados de kelinona y calcona (Baell y col., 2004), caribdotoxina, noxiustoxina, (Grissmer y col., 1994), agitoxina-2 (Garcia y col., 1994), BgK (Cotton y col., 1997), *Pandinius imperator* toxina 1 (Peter y col., 2001), HsTx1 - es tan potente ni tan selectivo como ShK(L5). Debido a su falta de selectividad para Kv1.3, estos bloqueadores pueden ser potencialmente neurotóxicos si entran en el sistema nervioso central a concentraciones suficientes para bloquear los canales neuronales. El único inhibidor de Kv1.3 con una potencia y especificidad para Kv1.3 comparable con ShK(L5) es el análogo sintético recientemente descrito (OSK1-Lys¹⁶Asp²⁰) de la toxina OSK1 del escorpión *Orthochirus scrobiculosus* (Mouhat y col., 2005), pero su actividad como inmunomodulador sigue siendo indeterminada.

40

La exquisita especificidad para Kv1.3 de ShK(L5) le convierte en una atractiva expectativa de fármaco. ShK(L5) es notablemente estable en plasma y alcanzó niveles en sangre en estado estable de ~300 pM después de inyecciones subcutáneas repetidas a diario individuales de 10 μg/kg. Esta concentración en sangre de ShK(L5) es suficiente para bloquear >90 % de los canales Kv1.3 sin afectar a otros canales iónicos y causar una supresión del 60 al 70 % de linfocitos T_{EM} mientras que se conservan los linfocitos indiferenciados/linfocitos T_{CM}. Una concentración de ShK(L5) mayor de 1200 veces su dosis farmacológica no fue citotóxica o mutagénica *in vitro*. ShK(L5) no bloqueó el canal Kv11.1 (HERG) K⁺ cardíaco responsable del síndrome QT largo inducido por fármaco (Recanatini y col., 2005), y la administración *in vivo* de ShK(L5) a concentraciones farmacológicas (10 μg/kg/día) no alteró la función cardíaca en ratas sanas en base a una monitorización EKG continua. La administración *in vivo* repetida de 10 μg/kg/día de ShK(L5) durante 2 semanas no cambió los perfiles de la química clínica o hematológicos. Los animales sanos a los que se les administró una inyección individual de 1000 μg/kg/día de ShK(L5) (100 veces la dosis farmacológica) o inyecciones repetidas de 600 μg/kg/día durante 5 días (60 veces la dosis farmacológica), no mostraron ningún signo visible de toxicidad. Estos resultados indican que pueden conseguirse niveles en sangre farmacológicamente relevantes después de inyecciones subcutáneas a diario individuales de ShK(L5), y el índice de seguridad terapéutica eficaz en ratas sanas excede de 100.

55

ShK(L5) puede tener uso como un producto terapéutico en enfermedades autoinmunes dirigiéndose preferiblemente a los linfocitos T_{EM} autorreactivos continuamente activados que se han implicado en EM, diabetes mellitus tipo 1, artritis reumatoide y psoriasis (Ezawa y col., 1997; Lovett-Racke y col., 1998; Scholz y col., 1998; Friedrich y col.,

2000;Markovic-Plese y col., 2001; Viglietta y col., 2002; Soler y col., 2003; Wulff y col., 2003). ShK(L5) suprimió la proliferación de linfocitos T_{EM} humanos y de rata (CI₅₀ = ~80 pM en ambos casos) e inhibió la producción de IL2 a concentraciones picomolares (figuras 2 y 3). La IL2 exógena anuló parcialmente este bloqueo. Los linfocitos indiferenciados/T_{CM} humanos fueron inicialmente 60 veces menos sensibles a ShK(L5) que los linfocitos T_{EM} humanos, y se volvieron completamente resistentes al bloqueador durante la activación (figura 2), presumiblemente por la regulación por aumento de K_{Ca}3.1 (Ghanshani y col., 2000; Wulff y col., 2003). Los linfocitos indiferenciados/T_{CM} de rata fueron 1000 veces menos sensibles a ShK(L5) que los linfocitos T_{EM}. Esta variación de especies en la sensibilidad a ShK(L5) de los linfocitos indiferenciados/T_{CM} en comparación con los linfocitos T_{EM} - 60 veces inferior en seres humanos y 1000 veces inferior en ratas - puede explicarse por diferencias en la expresión del canal de K⁺ entre linfocitos indiferenciados/T_{CM} humanos y de rata. Los linfocitos indiferenciados/T_{CM} humanos inactivos expresan más canales Kv1.3 por célula (250-400) que los canales K_{Ca}3.1 (10-20) y, por lo tanto, se inhiben de forma más potente por los bloqueadores de Kv1.3 que los bloqueadores de K_{Ca}3.1 (Ghanshani y col., 2000; Wulff y col., 2003). Los linfocitos indiferenciados/T_{CM} de rata inactivos, por el contrario, expresan más canales K_{Ca}3.1 por célula (10-20) que los canales Kv1.3 (1-10), y son más sensibles a K_{Ca}3.1 que los bloqueadores de Kv1.3 (Beeton y col., 2001b). La diferencia rata/humano en la expresión de canal puede cimentar la sensibilidad diferencial de los linfocitos indiferenciados/T_{CM} de rata (CI₅₀ = 100 nM) y los linfocitos indiferenciados/T_{CM} humanos (CI₅₀ = 5 nM) a ShK(L5). En resumen, ShK(L5) suprime preferiblemente los linfocitos T_{EM}, mientras que los linfocitos indiferenciados/T_{CM} son menos sensibles al bloqueador para comenzar y después rápidamente escapan a la supresión regulando por ascenso los canales K_{Ca}3.1 (Ghanshani y col., 2000; Beeton y col., 2001b; Wulff y col., 2003).

Los linfocitos B de memoria de conmutación de clase humanos (por ejemplo, CD27⁺IgG⁺IgD⁻) están implicados en la patogenicidad de las enfermedades autoinmunes (Iglesias y col., 2001; O'Connor y col., 2001; Corcione y col., 2004). Los bloqueadores de Kv1.3 suprimen preferiblemente la proliferación de linfocitos B de memoria tardía, mientras que los linfocitos B de memoria indiferenciados y tempranos (CD27⁺IgD⁺) son significativamente menos sensibles (Wulff y col., 2004). Por lo tanto, ShK(L5) puede suprimir la función de los linfocitos T_{EM} y los linfocitos B de memoria de conmutación de clase que contribuyen al desarrollo de trastornos autoinmunes. Es motivo de preocupación la importante función de los linfocitos B de memoria de conmutación de clase en la inmunidad humoral (producción de anticuerpos IgG) y la disminución de la capacidad de montar respuestas inmunes viables a desafíos bacterianos que pueden surgir como resultado de la supresión basada en canal de estas células. Es una suerte que los linfocitos B de memoria de conmutación de clase humanos sean menos sensibles al bloqueo por ShK (CI₅₀ = 1-4 nM) que los linfocitos T_{EM} humanos (CI₅₀ = 80-400 pM), ya que expresan mayores números de canales Kv1.3 en el resto (~2000/célula) que los linfocitos T_{EM} (250-400/célula) (Wulff y col., 2004). Por lo tanto, puede ser posible valorar la dosis de bloqueadores de Kv1.3 para suprimir preferiblemente uno o ambos grupos de células de memoria durante la terapia de una enfermedad autoinmune.

Se evaluó ShK(L5) en dos modelos de rata de una enfermedad inducida por linfocitos T_{EM}, EAE inducida por transferencia adoptiva de linfocitos T_{EM} específicos de mielina (Beeton y col., 2001b) y DTH causada por linfocitos T de tropismo cutáneo (Soler y col., 2003). ShK(L5) evitó la EAE si se administró en forma de una inyección diaria individual (10 µg/kg/día) desde el momento de la transferencia celular adoptiva, y redujo significativamente la gravedad de la enfermedad cuando se inició la terapia en la aparición de los síntomas. No se observó toxicidad en las ratas de EAE tratadas, lo que sugería que las concentraciones en sangre y tisulares de ShK(L5) conseguidas con este régimen de tratamiento no son suficientes para bloquear los canales neuronales, incluyendo los canales K_V heteromultiméricos que contienen subunidades de Kv1.3 (Koch y col., 1997). ShK(L5) también fue eficaz en la supresión de DTH. Estos estudios de prueba de concepto demuestran la eficacia terapéutica de ShK(L5) en la mejora de enfermedades mediadas por linfocitos T_{EM} en modelo de rata. Se determinó el índice de seguridad terapéutica de ShK(L5) en ratas con EAE (cuando la barrera hematoencefálica está probablemente comprometida) administrando inyecciones diarias de una dosis (600 µg/kg/día) 60 veces mayor que la dosis terapéuticamente eficaz. El cuarenta por ciento de las ratas con EAE que recibieron esta dosis murieron el quinto día (DL₅₀ extrapolada = 750 µg/kg/día durante 5 días), lo que corresponde a un índice de seguridad terapéutica de aproximadamente 75.

En conclusión, ShK(L5) es un bloqueador de Kv1.3 más selectivo que cualquier otro inhibidor conocidos, y puede ser beneficioso en enfermedades autoinmunes mediante el direccionamiento de tanto linfocitos T_{EM} como linfocitos B de memoria de conmutación de clase. Su afinidad picomolar para Kv1.3 y la notable estabilidad en plasma junto con su índice de seguridad terapéutica en ratas sanas (>100), así como en ratas con EAE (~75) son buena señal para su uso potencial como un inmunomodulador terapéutico. Las inyecciones subcutáneas diarias individuales de ShK(L5) son eficaces en la mejora de EAE y en la prevención de DTH, indicando que esta ruta de administración peptídica será compatible con la terapia.

Agradecimientos

Agradecemos a Paul Munch, Suresh Raman y Daniel Homerick su excelente asistencia técnica.

5 Referencias

- Atwal KS, Vaccaro W, Lloyd J, Finlay H, Yan L, and Bhandaru RS (2001) inventors, Bristol-Myers Squibb, assignee. *Heterocyclic dihydropyrimidines as potassium channel inhibitors*. World patent WO0140231. 2001 Jun 7.
- 10 Baell JB, Gable RW, Harvey AJ, Toovey N, Herzog T, Hansel W, and Wulff H (2004) Khellinone derivatives as blockers of the voltage-gated potassium channel Kv1.3: synthesis and immunosuppressive activity. *J Med Chem* 47: 2326-2336.
- Bagdány M, Batista CVF, Valdez-Cruz NA, Somodi S, Rodriguez de la Vega RC, Licea AF, Gáspár R, Possani LD, and Panyi G (2005) Anurotoxin, a new scorpion toxin of the α -KTx 6 subfamily, is highly selective for Kv1.3 over IKCa1 ion channels of human T lymphocytes. *Mol Pharmacol* 67: 1-11.
- 15 Bao J, Miao S, Kayser F, Kotliar AJ, Baker RK, Doss GA, Felix JP, Bugianesi RM, Slaughter RS, and Kaczorowski GJ (2005) Potent Kv1.3 inhibitors from correolide-modification of the C18 position. *Bioorg Med Chem Lett* 15: 447-451.
- Bardien-Kruger S, Wulff H, Arieff Z, Brink P, Chandy KG, and Corfield V (2002) Characterisation of the human voltage-gated potassium channel gene, KCNA7, a candidate gene for inherited cardiac disorders and its exclusion as cause of progressive familial heart block I (PFHBI). *Eur J Hum Genet* 10: 36-43.
- Beeton C, Barbaria J, Giraud P, Devaux J, Benoliel A, Gola M, Sabatier J, Bernard D, Crest M, and Beraud E (2001a) Selective blocking of voltage-gated K⁺ channels improves experimental autoimmune encephalomyelitis and inhibits T cell activation. *J Immunol* 166: 936-944.
- 25 Beeton C, Wulff H, Barbaria J, Clot-Faybessé O, Pennington M, Bernard D, Cahalan M, Chandy K, and Beraud E (2001b) Selective blockade of T lymphocyte K⁺ channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 13942-13947.
- Beeton C, Wulff H, Singh S, Botsko S, Crossley G, Gutman GA, Cahalan MD, Pennington MW, and Chandy KG (2003) A novel fluorescent toxin to detect and investigate Kv1.3 channel up-regulation in chronically activated T lymphocytes. *J Biol Chem* 278: 9928-9937.
- 30 Beraud E, Balzano C, Zamora AJ, Varriale S, Bernard D, and Ben-Nun A (1993) Pathogenic and non-pathogenic T lymphocytes specific for the encephalitogenic epitope of myelin basic protein: functional characteristics and vaccination properties. *J Neuroimmunol* 47: 41-53.
- Bunce C and Bell EB (1997) CD45RC isoforms define two types of CD4 memory T cells, one of which depends on persisting antigen. *J Exp Med* 185: 767-776.
- 35 Butenschon I, Moller K, and Hansel W (2001) Angular methoxy-substituted furo- and pyranoquinolinones as blockers of the voltage-gated potassium channel Kv1.3. *J Med Chem* 44: 1249-1256.
- Castle NA, Hollinshead SP, Hughes PF, Mendoza GS, Searafin J, Wilson JW, Amato GS, Beaudoin S, Gross M, and McNaughton-Smith G (2000) inventors, ICAgen and Eli Lilly & Company, assignee. *Potassium channel inhibitors*. U.S. patent 6,083,986. 2000 Jul 4.
- 40 Chandy KG, DeCoursey TE, Cahalan MD, McLaughlin C, and Gupta S (1984) Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation. *J Exp Med* 160: 369-385.
- Chandy KG, Wulff H, Beeton C, Pennington M, Gutman GA, and Cahalan MD (2004) K⁺ channels as targets for specific immunomodulation. *Trends Pharmacol Sci* 25: 280-289.
- 45 Corcione A, Casazza S, Ferretti E, Giunti D, Zappia E, Pistorio A, Gambini C, Mancardi GL, Uccelli A, and Pistorio V (2004) Recapitulation of B cell differentiation in the central nervous system of patients with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 11064-11069.
- Cotton J, Crest M, Bouet F, Alessandri N, Gola M, Forest E, Karlsson E, Castaneda O, Harvey AL, Vita C, et al. (1997) A potassium-channel toxin from the sea anemone *Bunodosoma granulifera*, an inhibitor for Kv1 channels. Revision of the amino acid sequence, disulfide-bridge assignment, chemical synthesis, and biological activity. *Eur J Biochem* 244: 192-202.
- 50 Deibler GE, Martenson RE, and Kies MW (1972) Large scale preparation of myelin basic protein from central nervous tissue of several mammalian species. *Prep Biochem* 2: 139-165.
- Ezawa K, Yamamura M, Matsui H, Ota Z, and Makino H (1997) Comparative analysis of CD45RA- and CD45RO-positive CD4⁺ T cells in peripheral blood, synovial fluid and synovial tissue in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Acta Med Okayama* 51: 25-31.
- 55 Felix JP, Bugianesi RM, Schmalhofer WA, Borris R, Goetz MA, Hensens OD, Bao JM, Kayser F, Parsons WH, Rupprecht K, et al. (1999) Identification and biochemical characterization of a novel nortriterpene inhibitor of the human lymphocyte voltage-gated potassium channel, Kv1.3. *Biochemistry* 38: 4922-4930.

- Friedrich M, Krammig S, Henze M, Docke WD, Sterry W, and Asadullah K (2000) Flow cytometric characterization of lesional T cells in psoriasis: intracellular cytokine and surface antigen expression indicates an activated, memory/effector type 1 immunophenotype. *Arch Dermatol Res* 292: 519-521.
- 5 Fujiwara Y, Akaji K, and Kiso Y (1994) Racemization-free synthesis of C-terminal cysteine-peptide using 2-chlorotrityl resin. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 42:724-726.
- Garcia ML, Garcia-Calvo M, Hidalgo P, Lee A, and MacKinnon R (1994) Purification and characterization of the three inhibitors of voltage-dependent K⁺ channels from *Leiurus quinquestriatus* var. *hebraeus* venom. *Biochemistry* 33:6834-6839.
- 10 Ghanshani S, Wulff H, Miller MJ, Rohm H, Neben A, Gutman GA, Cahalan MD, and Chandy KG (2000) Up-regulation of the IKCa1 potassium channel during T-cell activation: molecular mechanism and functional consequences. *J Biol Chem* 275: 37137-37149.
- Gradl SN, Felix JP, Isacoff EY, Garcia ML, and Trauner D (2003) Protein surface recognition by rational design: nanomolar ligands for potassium channels. *J Am Chem Soc* 125: 12668-12669.
- 15 Grissmer S, Nguyen AN, Aiyar J, Hanson DC, Mather RJ, Gutman GA, Karmilowicz MJ, Auperin DD, and Chandy KG (1994) Pharmacological characterization of five cloned voltage-gated K⁺ channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol Pharmacol* 45: 1227-1234.
- Gutman GA, Chandy KG, Adelman JP, Aiyar J, Bayliss DA, Clapham DE, Covarrubias M, Desir GV, Furuichi K, Ganetzky B, et al. (2003) International Union of Pharmacology. XLI. compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol Rev* 55: 583-586.
- 20 Hammerschmidt F and Hanbauer M (2000) Transformation of arylmethylenamines into alpha-aminophosphonic acids via metalated phosphoramidates: rearrangements of partly configurationally stable N-phosphorylated alpha-aminocarbanions. *J Org Chem* 65: 6121-6131.
- Hanner M, Schmalhofer WA, Green B, Bordallo C, Liu J, Slaughter RS, Kaczorowski GJ, and Garcia ML (1999) Binding of correolide to Kv1 family potassium channels. *J Biol Chem* 274: 25237-25244.
- 25 Hanson DC, Nguyen A, Mather RJ, Rauer H, Koch K, Burgess LE, Rizzi JP, Donovan CB, Bruns MJ, Canniff PC, et al. (1999) UK-78,282, a novel piperidine compound that potently blocks the Kv1.3 voltage-gated potassium channel and inhibits human T cell activation. *Br J Pharmacol* 126: 1707-1716.
- Hendriks JJA, Alblas J, van der Pol SMA, van Tol EAF, Dijkstra CD, and de Vries HE (2004) Flavonoids influence monocytic GTPase activity and are protective in experimental allergic encephalitis. *J Exp Med* 200: 1667-1672.
- 30 Iglesias A, Bauer J, Litzemberger T, Schubart A, and Lington C (2001) T- and B-cell responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Glia* 36: 220-234.
- Kalman K, Pennington MW, Lanigan MD, Nguyen A, Rauer H, Mahnir V, Paschetto K, Kem WR, Grissmer S, Gutman GA, et al. (1998) ShK-Dap²², a potent Kv1.3-specific immunosuppressive polypeptide. *J Biol Chem* 273: 32697-32707.
- 35 King DS, Fields CG, and Fields GB (1990) A cleavage method which minimizes side reactions following Fmoc solid phase peptide synthesis. *Int J Pept Protein Res* 36: 255-266.
- Koch RO, Wanner SG, Koschak A, Hanner M, Schwarzer C, Kaczorowski GJ, Slaughter RS, Garcia ML, and Knaus HG (1997) Complex subunit assembly of neuronal voltage-gated K⁺ channels. Basis for high-affinity toxin interactions and pharmacology. *J Biol Chem* 272: 27577-27581.
- 40 Kolski-Andreaco A, Tomita H, Shakkottai VG, Gutman GA, Cahalan MD, Gargus JJ, and Chandy KG (2004) SK3-1C, a dominant-negative suppressor of SK_{Ca} and IK_{Ca} channels. *J Biol Chem* 279: 6893-6904.
- Koo GC, Blake JT, Shah K, Staruch MJ, Dumont F, Wunderler D, Sanchez M, McManus OB, Sirotna-Meisher A, Fischer P, et al. (1999) Correolide and derivatives are novel immunosuppressants blocking the lymphocyte Kv1.3 potassium channels. *Cell Immunol* 197: 99-107.
- 45 Koo GC, Blake JT, Talento A, Nguyen M, Lin S, Sirotna A, Shah K, Mulvany K, Hora D Jr, Cunningham P, et al. (1997) Blockade of the voltage-gated potassium channel Kv1.3 inhibits immune responses in vivo. *J Immunol* 158: 5120-5128.
- 50 Koschak A, Bugianesi RM, Mitterdorfer J, Kaczorowski GJ, Garcia ML, and Knaus HG (1998). Subunit composition of brain voltage-gated potassium channels determined by hongotoxin-1, a novel peptide derived from *Centruroides limbatus* venom. *J Biol Chem*. 273: 2639-2644.
- Lahey T and Rajadhyaksha VJ (2004) 3-Deoxyflavonoid inhibition of T-lymphocyte activation and therapeutic use, pp 19, US patent 2004102386.
- 55 Lin CS, Boltz RC, Blake JT, Nguyen M, Talento A, Fischer PA, Springer MS, Sigal NH, Slaughter RS, Garcia ML, et al. (1993) Voltage-gated potassium channels regulate calcium-dependent pathways involved in human T lymphocyte activation. *J Exp Med* 177: 637-645.
- Lovett-Racke AE, Trotter JL, Lauber J, Perrin PJ, June CH, and Racke MK (1998) Decreased dependence of myelin basic protein-reactive T cells on CD28-mediated costimulation in multiple sclerosis patients: a

- marker of activated/memory T cells. *J Clin Investig* 101: 725-730.
- Markovic-Plese S, Cortese I, Wandinger KP, McFarland HF, and Martin R (2001) CD4⁺CD28⁻ costimulation-independent T cells in multiple sclerosis. *J Clin Investig* 108: 1185-1194.
- 5 Middleton RE, Sanchez M, Linde AR, Bugianesi RM, Dai G, Felix JP, Koprak SL, Staruch MJ, Bruguera M, Cox R, et al. (2003) Substitution of a single residue in Stichodactyla helianthus peptide, ShK-Dap²², reveals a novel pharmacological profile. *Biochemistry* 42: 13698-13707.
- Mouhat S, Visan V, Ananthakrishnan S, Wulff H, Andreotti N, Grissmer S, Darbon H, De Waard M, and Sabatier JM (2005) K⁺ channel types targeted by synthetic OSK1, a toxin from *Orthochirus scrobiculosus* scorpion venom. *Biochem J* 385: 95-104.
- 10 Nicolas E, Vilaseca M, and Giralt E (1995) A study of the use of NH₄I for the reduction of methionine sulphoxide in peptides containing cysteine and cystine. *Tetrahedron* 51: 5701-5710.
- O'Connor K, Bar-Or A, and Hafler DA (2001) The neuroimmunology of multiple sclerosis: possible roles of T and B lymphocytes in immunopathogenesis. *J Clin Immunol* 21: 81-92.
- Pennington M, Byrnes M, Zaydenberg I, Khaytin I, de Chastonay J, Kraffe D, Hill R, Mahnir V, Volberg W, Gorczyca W, et al. (1995) Chemical synthesis and characterization of ShK toxin: a potent potassium channel inhibitor from a sea anemone. *Int J Pept Protein Res* 346: 354-358.
- 15 Pennington M, Mahnir V, Khaytin I, Zaydenberg I, Byrnes M, and Kem W (1996a) An essential binding surface for ShK toxin interaction with rat brain potassium channels. *Biochemistry* 35: 16407-16411.
- Pennington M, Mahnir V, Kraffe D, Zaydenberg I, Byrnes M, Khaytin I, Crowley K, and Kem W (1996b) Identification of three separate binding sites on ShK toxin, a potent inhibitor of voltage-dependent potassium channels in human T-lymphocytes and rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 219: 696-701.
- Peter MJ, Varga Z, Hajdu P, Gaspar RJ, Damjanovich S, Horjales E, Possani LD, and 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.
- 25 Recanatini M, Poluzzi E, Masetti M, Cavalli A, and De Ponti F (2005) QT prolongation through hERG K⁺ channel blockade: current knowledge and strategies for the early prediction during drug development. *Med Res Rev* 25:133-166.
- Regaya I, Beeton C, Ferrat G, Andreotti N, Darbon H, De Waard M, and Sabatier JM (2004) Evidence for domain-specific recognition of SK and Kv channels by MTX and HsTX1 scorpion toxins. *J Biol Chem* 279: 55690-55696.
- 30 subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature (Lond)* 401: 708-712.
- Schmalhofer WA, Bao J, McManus OB, Green B, Matyskiela M, Wunderler D, Bugianesi RM, Felix JP, Hanner M, Linde-Arias AR, et al. (2002) Identification of a new class of inhibitors of the voltage-gated potassium channel, Kv1.3, with immunosuppressant properties. *Biochemistry* 41: 7781-7794.
- 35 Scholz C, Patton KT, Anderson DE, Freeman GJ, and Hafler DA (1998) Expansion of autoreactive T cells in multiple sclerosis is independent of exogenous B7 costimulation. *J Immunol* 160: 1532-1538.
- Singh S, Zink DL, Dombrowski AW, Dezeny G, Bills GF, Felix J, Slaughter RS, and Goetz MA (2001) Candelalides A-C: novel diterpenoid pyrones from fermentations of *Sesquicillium candelabrum* as blockers of the voltage-gated potassium channel Kv1.3. *Org Lett* 3: 247-250.
- 40 Soler D, Humphreys TL, Spinola SM, and Campbell JJ (2003) CCR4 versus CCR10 in human cutaneous TH lymphocyte trafficking. *Blood* 101: 1677-1682.
- Task Force of the European Society of Cardiology the North American Society of Pacing Electrophysiology (1996) Heart Rate variability: standards of measurement, physiological interpretation and clinical use. *Circulation* 93: 1043-1065.
- 45 Tian Z, Gu C, Roeske RW, Zhou M, and Van Etten RL (1993) Synthesis of phosphotyrosine-containing peptides by solid-phase method. *Int J Peptide Protein Res* 42: 155-158.
- Valverde P, Kawai T, and Taubman M (2004) Selective blockade of voltage-gated potassium channels reduces inflammatory bone resorption in experimental periodontal disease. *J Bone Miner Res* 19: 155-164.
- 50 Vennekamp J, Wulff H, Beeton C, Calabresi PA, Grissmer S, Hansel W, and Chandy KG (2004) Kv1.3 blocking 5-phenylalkoxy-psoralens: a new class of immunomodulators. *Mol Pharmacol* 65: 1364-1374.
- Viglietta V, Kent SC, Orban T, and Hafler DA (2002) GAD65-reactive T cells are activated in patients with autoimmune type 1a diabetes. *J Clin Investig* 109: 895-903.
- 55 Wanner SG, Glossmann H, Knaus HG, Baker R, Parsons W, Rupprecht KM, Brochu R, Cohen CJ, Schmalhofer W, Smith M, et al. (1999) WIN 17317-3, a new high-affinity probe for voltage-gated sodium channels. *Biochemistry* 38: 11137-11146.
- Wernekenschnieder A, Korner P, and Hansel W (2004) 3-Alkyl- and 3-aryl-7H-furo[3,2-g]chromen-7-ones as blockers of the voltage-gated potassium channel Kv1.3. *Pharmazie* 59: 319-320.
- Wulff H, Calabresi P, Allie R, Yun S, Pennington MW, Beeton C, and Chandy KG (2003) The voltage-gated

Kv1.3 K⁺ channel in effector memory T cells as new target for MS. *J Clin Invest* 111: 1703-1713.
 Wulff H, Knaus H, Pennington M, and Chandy KG (2004) K⁺ channel expression during B cell differentiation: implications for immunomodulation and autoimmunity. *J Immunol* 173: 776-786.
 Wulff H, Miller MJ, Haensel W, Grissmer S, Cahalan MD, and Chandy KG (2000) Design of a potent and selective inhibitor of the intermediate-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel, IKCa1: a potential immunosuppressant. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 8151-8156.
 Zhou W, Cayabyab FS, Pennefather PS, Schlichter LC, and DeCoursey TE (1998) HERG-like K⁺ channels in microglia. *J Gen Physiol* 111: 781-794

10 **Dirección de correspondencia:** Solicitudes de reimpresión: K. George Chandy, M.D., Ph.D., Department of Physiology and Biophysics, Medical School, 291 Irvine Hall, University of California, Irvine, Irvine, CA 92697-4561. Tel: 949-824-7435, Fax: 949-824-3143, correo electrónico: ydnahcg@icu.ude

Las siguientes son cláusulas numeradas.

15

1. Una composición de materia que comprende ShK unida a una entidad química orgánica o inorgánica que tiene una carga aniónica.
2. Una composición de acuerdo con la cláusula 1, en la que la entidad química se selecciona entre el grupo que consiste en:

20

aminoácidos;
 polipéptidos;
 residuos aminoacídicos;
 residuos aminoacídicos sintéticos;
 25 treonina;
 derivados de treonina;
 fosfo-treonina;
 serina;
 derivados de serina;
 30 fosfo-serina;
 ácido glutámico;
 derivados de ácido glutámico;
 gammacarboxi-ácido glutámico;
 ácido aspártico;
 35 derivados de ácido aspártico;
 compuestos o grupos inorgánicos;
 compuestos o grupos orgánicos;
 anhídrido succínico; y
 anhídrido ftálico.

40

3. Una composición de acuerdo con la cláusula 1, en la que la toxina ShK se obtiene a partir de una fuente natural.

4. Una composición de acuerdo con la cláusula 1, en la que la toxina ShK es sintética.

5. Una composición de acuerdo con la cláusula 1, en la que la entidad química se une a un extremo N del polipéptido de ShK.

45

6. Una composición de acuerdo con la cláusula 5, en la que la entidad química se une a un extremo N de ShK a través de una molécula de unión o un grupo de unión.

7. Una composición de acuerdo con la cláusula 5, en la que la entidad química se une a un extremo N de ShK por un enlazador aminoetiloxietiloxi-acetilo.

8. Una composición de acuerdo con la cláusula 1, en la que la entidad química incluye una etiqueta de fluoróforo.

50

9. Una composición de acuerdo con la cláusula 1, en la que la entidad química es AEEAc-L-Pmp(OH₂).

10. Una composición de acuerdo con la cláusula 1, en la que la entidad química es AEEAc-D-Pmp(OH₂).

11. Una composición de acuerdo con la cláusula 1, en la que la entidad química es AEEAc-D-Pmp(OH, Et).

12. Una composición de acuerdo con la cláusula 1, en la que la entidad química es AEEAc-L-Pmp(Et₂).

55

13. Una composición de acuerdo con la cláusula 1, en la que la entidad química es AEEAc-L-Tyr.

14. Una composición de acuerdo con la cláusula 1, en la que la entidad química es AEEAc-L-Tyr(PO₃H₂).

15. Una composición de acuerdo con la cláusula 1, en la que la entidad química es AEEAc-L-Phe(p-NH₂).

16. Una composición de acuerdo con la cláusula 1, en la que la entidad química es AEEAc-L-Phe(p-CO₂H).

17. Una composición de acuerdo con la cláusula 1, en la que la entidad química es AEEAc-L-Phe(p-CO₂H).

18. Una composición de acuerdo con la cláusula 1, en la que la entidad química es AEEAc-L-Aspartato.
19. Una composición de acuerdo con la cláusula 1, en la que la entidad química es AEEAc-D-Aspartato.
20. Una composición de acuerdo con la cláusula 1, en la que la entidad química es AEEAc-L-Glutamato.
21. Una composición de acuerdo con la cláusula 1, en la que la entidad química es AEEAc-D-Glutamato.
22. Un método para provocar la inhibición de los canales de potasio Kv1.3 en un sujeto humano o animal, comprendiendo dicho método la etapa de:

(A) administrar al sujeto una composición que comprende la toxina ShK unida a una entidad química orgánica o inorgánica que tiene una carga aniónica, en una forma y cantidad que sea eficaz para inhibir los canales de potasio Kv1.3.

23. Un método de acuerdo con la cláusula 22, en el que el método se realiza para prevenir o tratar un trastorno autoinmune.

24. Un método de acuerdo con la cláusula 23, en el que el trastorno autoinmune se selecciona entre el grupo que consiste en:

Esclerosis múltiple
Miastenia gravis
Neuropatías autoinmunes, tal como Guillain-Barré
Uveítis autoinmune
Enfermedad de Crohn
Colitis ulcerosa
Cirrosis biliar primaria
Hepatitis autoinmune
Trombocitopenia autoinmune
Diabetes mellitus tipo 1
Enfermedad de Addison
Enfermedad de Grave
Tiroiditis de Hashimoto
Ooforitis y orquitis autoinmune
Enfermedad de Behcet
Artritis reumatoide
Resorción ósea asociada a enfermedad periodontal
Lupus eritematoso sistémico
Escleroderma
Polimiositis, dermatomiositis
Pénfigo vulgar
Espondiloartropatías, tal como espondilitis anquilosante
Síndrome de Sjogren

25. Un método de acuerdo con la cláusula 22, en el que el método se realiza para prevenir o tratar la enfermedad injerto contra huésped.

26. Un método de acuerdo con la cláusula 22, en el que el método se realiza para tratar o prevenir el rechazo de un tejido u órgano trasplantado.

27. Un método de acuerdo con la cláusula 22, en el que el método se realiza para prevenir o tratar el síndrome metabólico.

28. Un método de acuerdo con la cláusula 22, en el que el método se realiza para tratar o prevenir la diabetes tipo 2.

29. Un método de acuerdo con la cláusula 22, en el que el método se realiza para tratar o prevenir la obesidad.

30. Un método de acuerdo con la cláusula 22, en el que el método se realiza para tratar o prevenir la resorción ósea asociada a enfermedad periodontal.

31. Un método de acuerdo con la cláusula 22, en el que la composición comprende la toxina ShK unida a una entidad química seleccionada entre el grupo que consiste en:

aminoácidos;
polipéptidos;
residuos aminoacídicos;

- residuos aminoacídicos sintéticos;
 treonina;
 derivados de treonina;
 fosfo-treonina;
 serina;
 derivados de serina;
 fosfo-serina;
 ácido glutámico;
 derivados de ácido glutámico;
 gammacarboxi-ácido glutámico;
 ácido aspártico;
 derivados de ácido aspártico;
 compuestos o grupos inorgánicos;
 compuestos o grupos orgánicos;
 anhídrido succínico; y
 anhídrido ftálico.
32. Un método de acuerdo con la cláusula 22, en el que la entidad química es AEEAc-L-Pmp(OH₂).
 33. Un método de acuerdo con la cláusula 22, en el que la entidad química es AEEAc-D-Pmp(OH₂).
 34. Un método de acuerdo con la cláusula 22, en el que la entidad química es AEEAc-D-Pmp(OH, Et).
 35. Un método de acuerdo con la cláusula 22, en el que la entidad química es AEEAc-L-Pmp(Et₂).
 36. Un método de acuerdo con la cláusula 22, en el que la entidad química es AEEAc-D-Pmp(Et₂).
 37. Un método de acuerdo con la cláusula 22, en el que la entidad química es AEEAc-L-Tyr.
 38. Un método de acuerdo con la cláusula 22, en el que la entidad química es AEEAc-L-Tyr(PO₃H₂).
 39. Un método de acuerdo con la cláusula 22, en el que la entidad química es AEEAc-L-Phe(*p*-NH₂).
 40. Un método de acuerdo con la cláusula 22, en el que la entidad química es AEEAc-L-Phe(*p*-CO₂H).
 41. Un método de acuerdo con la cláusula 22, en el que la entidad química es AEEAc-L-Aspartato.
 42. Un método de acuerdo con la cláusula 22, en el que la entidad química es AEEAc-D-Aspartato.
 43. Un método de acuerdo con la cláusula 22, en el que la entidad química es AEEAc-L-Glutamato.
 44. Un método de acuerdo con la cláusula 22, en el que la entidad química es AEEAc-D-Glutamato.
 45. Un método para realizar citometría de flujo, comprendiendo dicho método las etapas de:
- (A) proporcionar una composición que comprende ShK unida a una entidad química orgánica o inorgánica que tiene una carga aniónica y una etiqueta de fluoróforo;
 (B) combinar la composición proporcionada en la Etapa A con las células; y
 (C) usar un citómetro de flujo para contar, aislar o distinguir las células que tienen afinidad para la composición proporcionada en la Etapa A.
46. Un método de acuerdo con la cláusula 45, en el que la Etapa C comprende usar el citómetro de flujo para contar, aislar o distinguir linfocitos T.
 47. Una composición de acuerdo con la cláusula 1, en la que el ShK se modifica por sustitución del residuo Met en la posición 21.
 48. Una composición de acuerdo con la cláusula 47, en la que la sustitución en el residuo Met 21 disuade la oxidación.
 49. Una composición de acuerdo con la cláusula 1, en la que el ShK se modifica por la sustitución de la función de ácido C-terminal con una amida.
 50. Una composición de acuerdo con la cláusula 49, en la que la sustitución de la función de ácido C-terminal con una amida imparte estabilidad a las enzimas de corboxipeptidasa C-terminal.
 51. Un método de acuerdo con la cláusula 22 o 45, en el que el ShK se modifica por la sustitución del residuo Met en la posición 21.
 52. Un método de acuerdo con la cláusula 51, en el que la sustitución en el residuo Met 21 disuade la oxidación.
 53. Un método de acuerdo con la cláusula 22 o 45, en el que el ShK se modifica por la sustitución de la función de ácido C-terminal con una amida.
 54. Un método de acuerdo con la cláusula 53, en el que la sustitución de la función de ácido C-terminal con una amida imparte estabilidad a las enzimas de corboxipeptidasa C-terminal.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de materia que comprende ShK, un enlazador aminoetiloxietiloxi-acetilo unido a un extremo N de ShK y una entidad química aniónica unida a dicho enlazador, en la que la entidad química aniónica es un residuo aminoacídico, y la composición de materia es selectiva para los canales Kv1.3 sobre los canales Kv1.1.
2. Una composición de materia de acuerdo con cualquiera de la reivindicación anterior, en la que la entidad química incluye una etiqueta de fluoróforo.
- 10 3. Una composición de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que la entidad química comprende L-Pmp(OH₂), D-Pmp(OH₂), D-Pmp(OH, Et), L-Pmp(Et₂), D-Pmp(Et₂), L-Tyr, L-Tyr(PO₃H₂), L-Phe(p-NH₂), L-Phe(p-CO₂H), L-Aspartato, D-Aspartato, L-Glutamato, D-Glutamato, D-Tyr(PO₃H₂), L-p-Tyr monometilo, L-p-Tyr dimetilo, L-Ppa, L-Pfp o L-Pkp.
- 15 4. Una composición de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que dicha ShK tiene la secuencia aminoacídica: Arg-Ser-Cys-Ile-Asp-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-Ala-Phe-Gln-Cys-Lys-His-Ser-Met-Lys-Tyr-Arg-Leu-Ser-Phe-Cys-Arg-Lys-Thr-Cys-Gly-Thr-Cys (SEQ ID NO: 1).
5. Una composición de materia de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene la secuencia: L-Tyr(PO₃H₂)-AEEAc-Arg-Ser-Cys-Ile-Asp-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-Ala-Phe-Gln-Cys-Lys-His-Ser-Met-Lys-Tyr-Arg-Leu-Ser-Phe-Cys-Arg-Lys-Thr-Cys-Gly-Thr-Cys (SEQ ID NO: 2).
- 20 6. Una composición de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que el ShK se modifica por la sustitución del residuo Met en la posición 21.
- 25 7. Una composición de acuerdo con la reivindicación 6, en la que Met se reemplaza con Norleucina (Nle).
8. Una composición de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en la que el ShK se modifica por la sustitución de la función de ácido C-terminal con una amida.
- 30 9. Una composición de materia de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene la secuencia: L-Tyr(PO₃H₂)-AEEAc-Arg-Ser-Cys-Ile-Asp-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-Ala-Phe-Gln-Cys-Lys-His-Ser-Met-Lys-Tyr-Arg-Leu-Ser-Phe-Cys-Arg-Lys-Thr-Cys-Gly-Thr-Cys-amida (SEQ ID NO:3).
- 35 10. Una composición de materia de acuerdo con la reivindicación 1 que tiene la secuencia: L-Tyr-AEEAc-Arg-Ser-Cys-Ile-Asp-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-Ala-Phe-Gln-Cys-Lys-His-Ser-Met-Lys-Tyr-Arg-Leu-Ser-Phe-Cys-Arg-Lys-Thr-Cys-Gly-Thr-Cys-amida (SEQ ID NO:4).
- 40 11. Una composición de materia de la reivindicación 1 que tiene la secuencia p-fosfono(difluoro-metil)-fenilalanina-AEEAc-Arg-Ser-Cys-Ile-Asp-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-Ala-Phe-Gln-Cys-Lys-His-Ser-Nle-Lys-Tyr-Arg-Leu-Ser-Phe-Cys-Arg-Lys-Thr-Cys-Gly-Thr-Cys-amida.
- 45 12. Una composición de materia de la reivindicación 1 que tiene la secuencia Tyr(PO₃H₂)-AEEAc-Arg-Ser-Cys-Ile-Asp-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-Ala-Phe-Gln-Cys-Lys-His-Ser-Nle-Lys-Tyr-Arg-Leu-Ser-Phe-Cys-Arg-Lys-Thr-Cys-Gly-Thr-Cys-amida.
- 50 13. Una composición de materia de la reivindicación 1 que tiene la secuencia p-fosfonometil-fenilalanina-AEEAc-Arg-Ser-Cys-Ile-Asp-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-Ala-Phe-Gln-Cys-Lys-His-Ser-Met-Lys-Tyr-Arg-Leu-Ser-Phe-Cys-Arg-Lys-Thr-Cys-Gly-Thr-Cys-amida.
- 55 14. Una composición de materia de la reivindicación 1 que tiene la secuencia p-fosfono-fenilalanina-AEEAc-Arg-Ser-Cys-Ile-Asp-Thr-Ile-Pro-Lys-Ser-Arg-Cys-Thr-Ala-Phe-Gln-Cys-Lys-His-Ser-Met-Lys-Tyr-Arg-Leu-Ser-Phe-Cys-Arg-Lys-Thr-Cys-Gly-Thr-Cys-amida.
15. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 para su uso en la atenuación de una respuesta inmune no deseada o para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno autoinmune.
16. Un uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la enfermedad o trastorno se selecciona entre el

grupo de: trastornos autoinmunes, enfermedad injerto contra huésped, rechazo de un órgano o tejido trasplantado, síndrome metabólico, diabetes tipo 2, obesidad, y resorción ósea asociada a enfermedad periodontal.

17. Un uso de acuerdo con la reivindicación 15, en el que la enfermedad o trastorno comprende un 5 trastorno autoinmune seleccionado entre:

- 10 Esclerosis múltiple,
Miastenia gravis,
Neuropatías autoinmunes,
Guillain-Barre,
Uveitis autoinmune,
Enfermedad de Crohn,
Colitis ulcerosa,
- 15 Cirrosis biliar primaria,
Hepatitis autoinmune,
Trombocitopenia autoinmune,
Diabetes mellitus tipo 1,
Enfermedad de Addison,
Enfermedad de Grave,
- 20 Tiroiditis de Hashimoto,
Ooforitis autoinmune,
Orquitis autoinmune,
Enfermedad de Behcet,
Artritis reumatoide,
- 25 Lupus eritematoso sistémico,
Escleroderma,
Polimiositis,
Dermatomiositis,
- 30 Pénfigo vulgar,
Espondiloartropatías,
Espondilitis anquilosante, y
Síndrome de Sjogren.

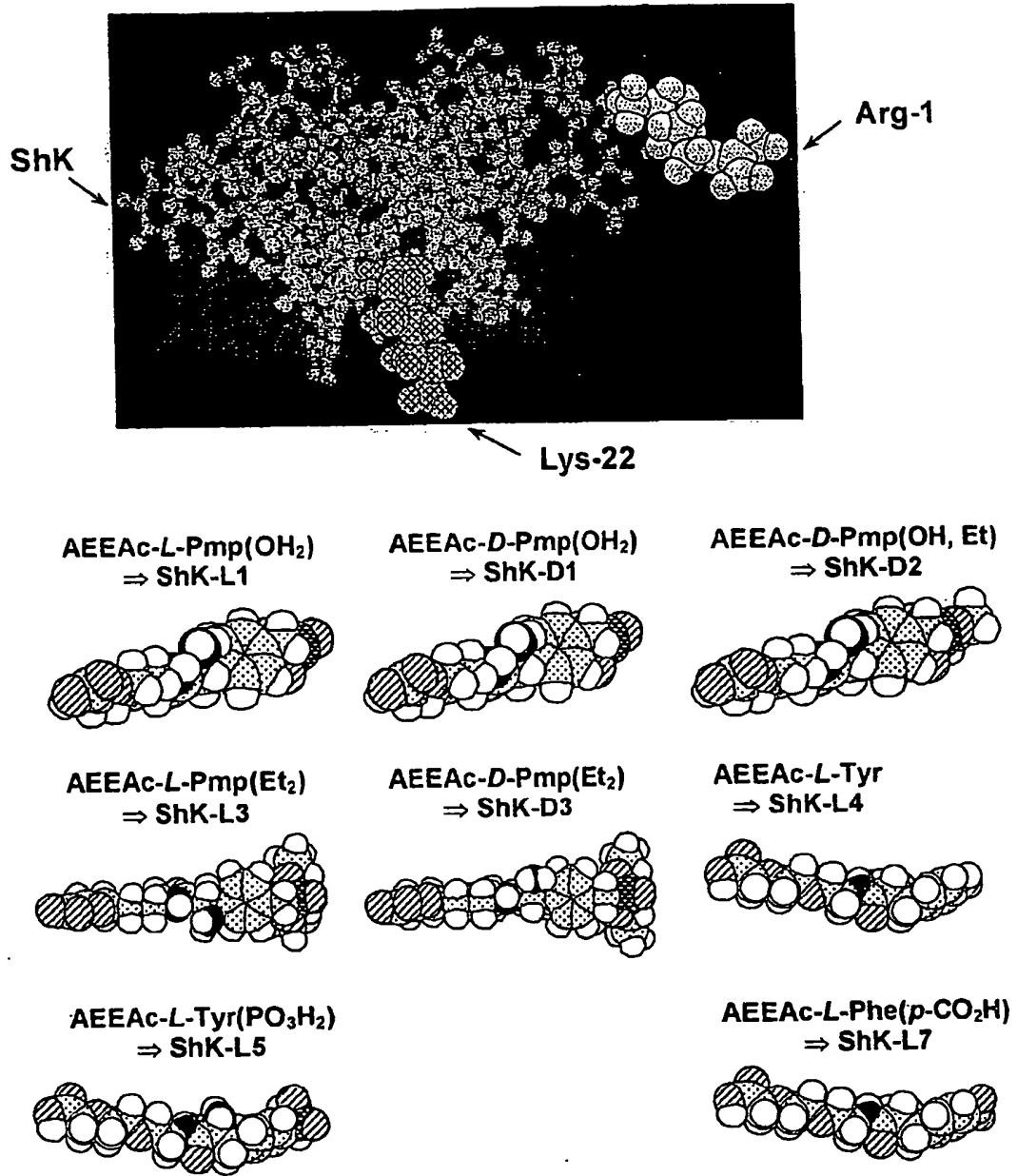


Fig. 1

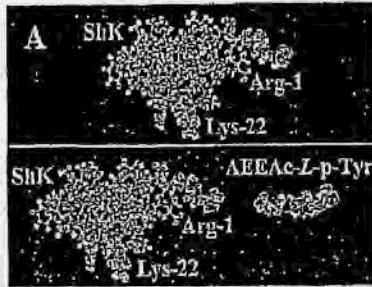


Fig. 2A

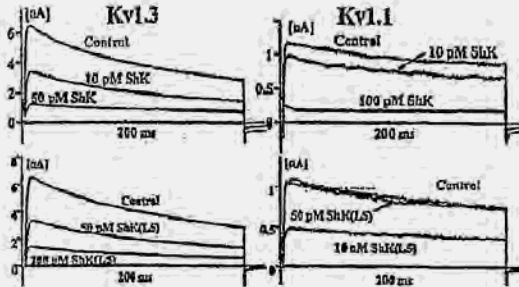


Fig. 2B

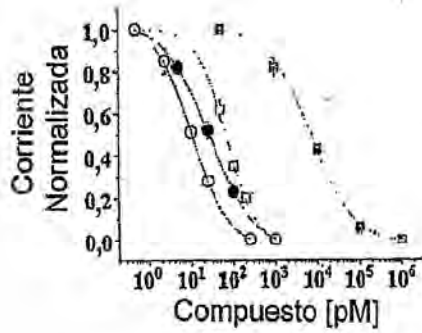


Fig. 2C

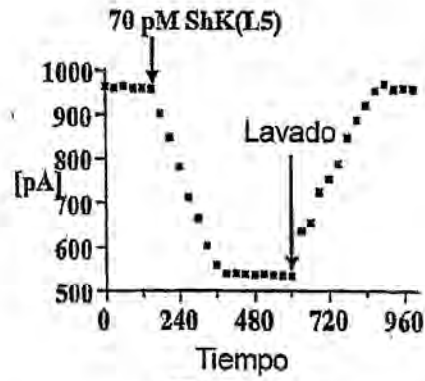


Fig. 2D

Compuesto	Residuo conectado en la posición-2	Carga neta en la posición-2	K_d en Kv1.3 [pM]	K_d en Kv1.1 [pM]	proporción de K_d s
ShK			10 ± 1	28 ± 6	2.8
ShK(L5)	L-p-Tyr	-2	69 ± 5	7.400 ± 900	104.2
ShK(D5)	D-p-Tyr	-2	1.100 ± 150	39.000 ± 650	35.4
ShK(L6)	L-p-Tyr monometilo	-1	10 ± 1	112 ± 9	11.2
ShK(L7)	L-p-Tyr dimetilo	0	24 ± 2	175 ± 30	7.3
ShK(L4)	L-Tyr	0	47 ± 6	159 ± 5	3.4
ShK(L1)	L-Pmp	-2	293 ± 45	1.000 ± 100	3.4
ShK(D1)	D-Pmp	-2	96 ± 12	1.400 ± 80	14.6
ShK(D2)	D-Pmp monometilo	-1	311 ± 16	1.100 ± 100	3.5
ShK(L3)	L-Pmp dietilo	0	71 ± 6	1.100 ± 200	15.5
ShK(D3)	D-Pmp dietilo	0	70 ± 9	166 ± 13	2.4
ShK(L9)	L-p-COOH-Phe	-1	94 ± 7	319 ± 36	3.4
ShK-L8	L-p-amino-Phe	+1	65 ± 4	142 ± 13	2.2
ShK-F6CA	F6CA	-1	48 ± 4	4.000 ± 300	83
ShK-Dap ²²	Ninguno	Ninguno	52 ± 3	1.800 ± 577	35

Fig. 2E

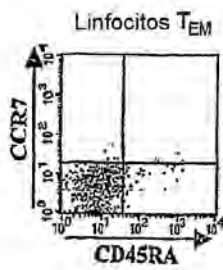


Fig. 3A



Fig. 3B

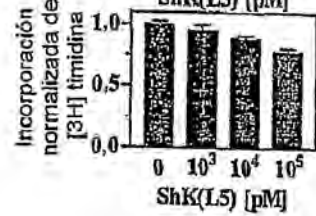
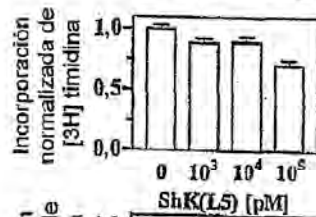
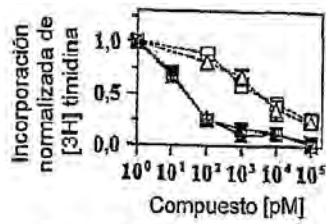


Fig. 3C

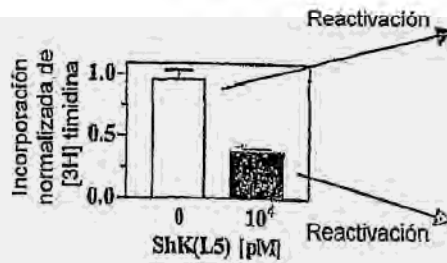


Fig. 3D

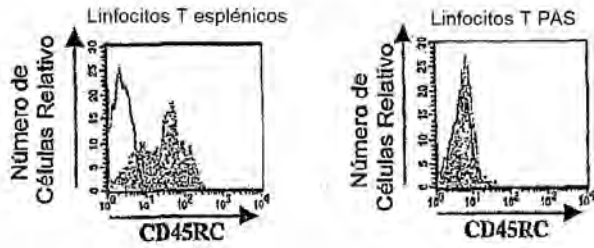


Fig. 4A

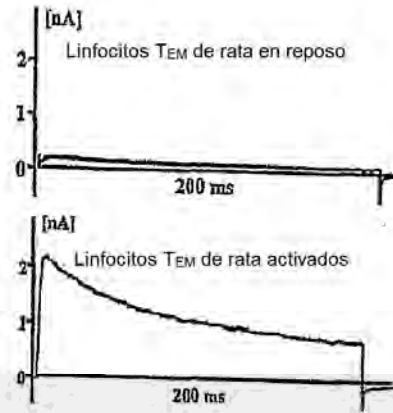


Fig. 4B

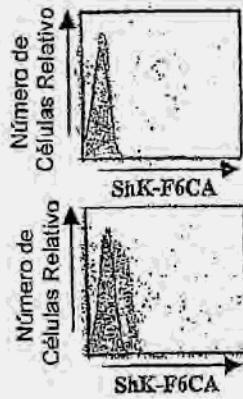


Fig. 4C



Fig. 4D

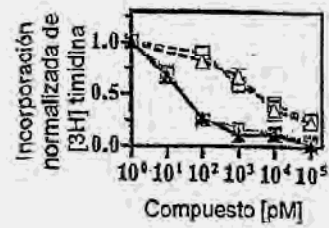


Fig. 4E

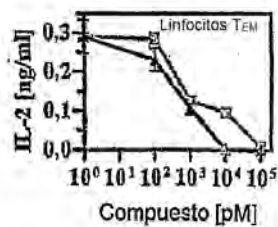


Fig. 4F

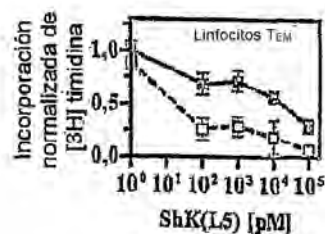


Fig. 4G

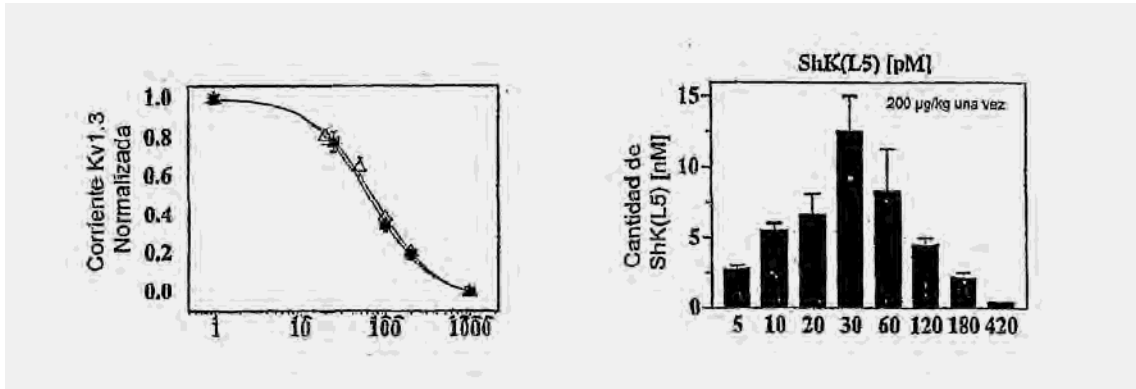


Fig. 5A

Fig. 5B

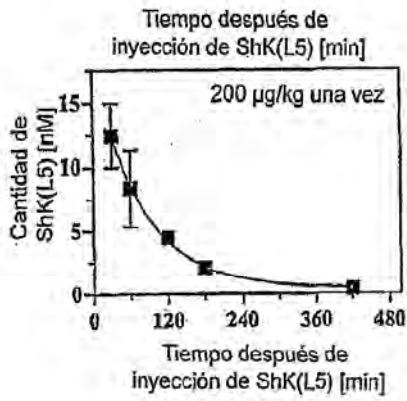


Fig. 5C

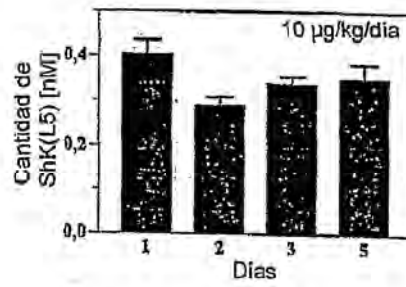


Fig. 5D

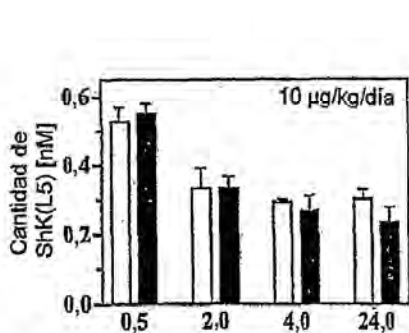


Fig. 5E

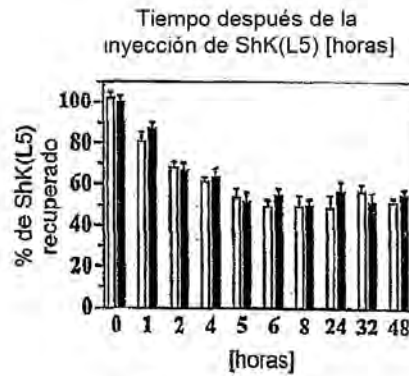


Fig. 5F

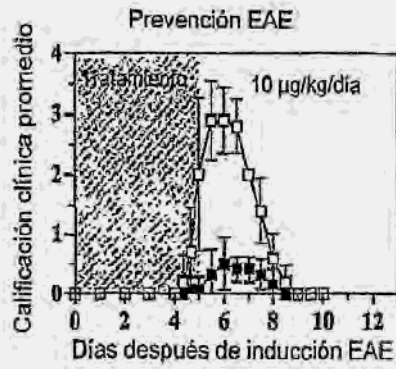


Fig. 6A

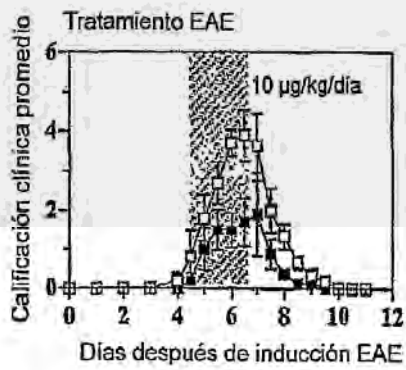


Fig. 6B

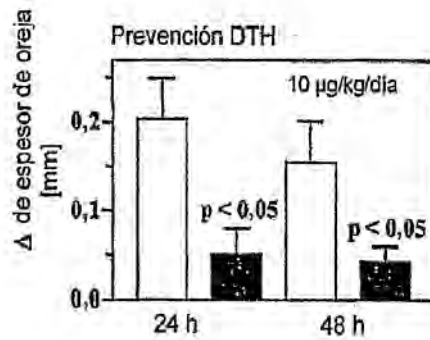


Fig. 6C

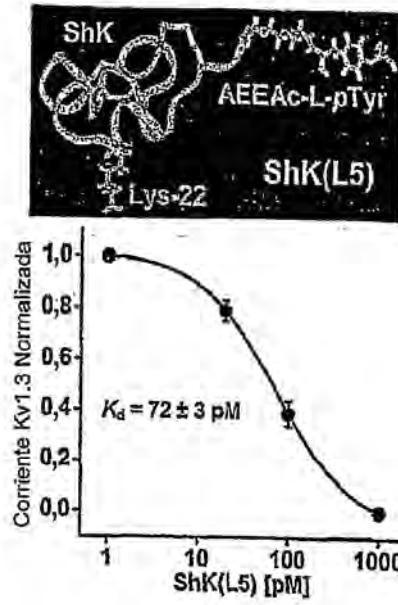


Fig. 7A

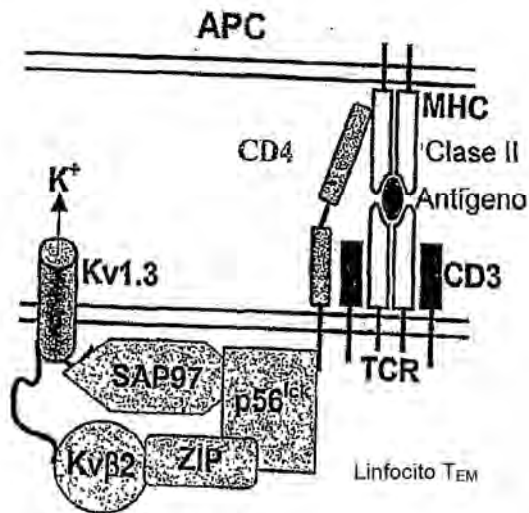


Fig. 7B

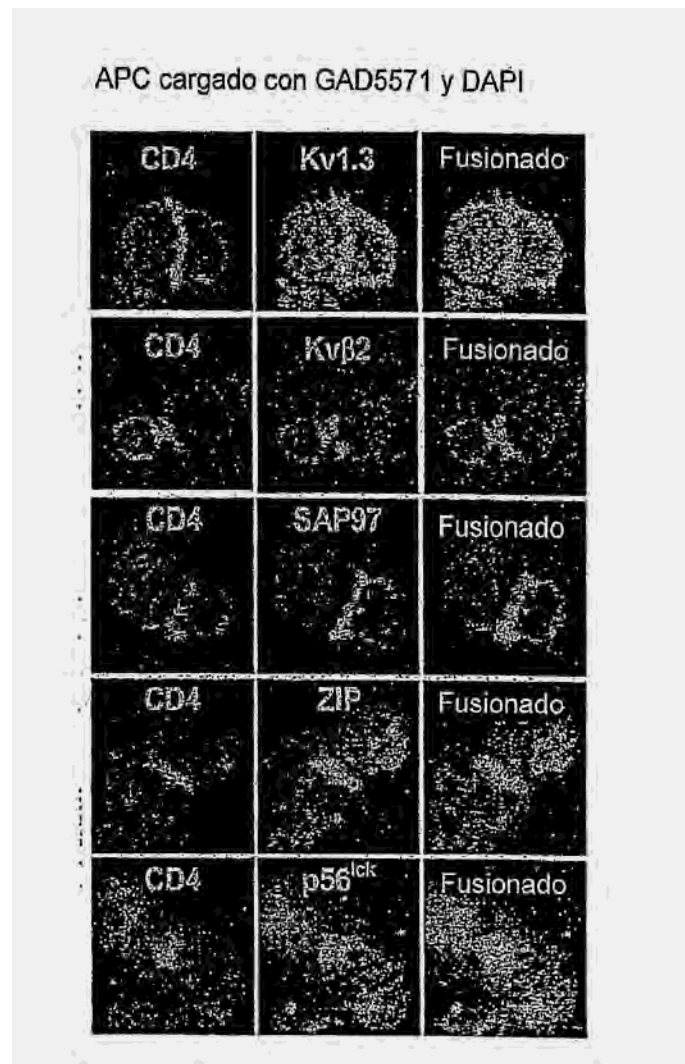


Fig. 7C

APC cargado con GAD5571 y DAPI
Sin contacto entre linfocitos T y B

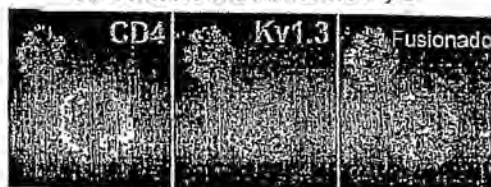


Fig. 7D

APC cargado con MBP y DAPI

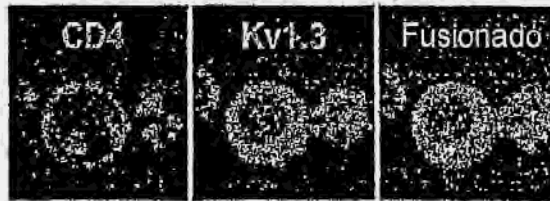


Fig. 7E

APC cargado con GAD5571 y DAPI
ShK(L5) no evita formación de IS



Fig. 7F

APC cargado con GAD5571 y DAPI
ShK(L5) no rompe IS

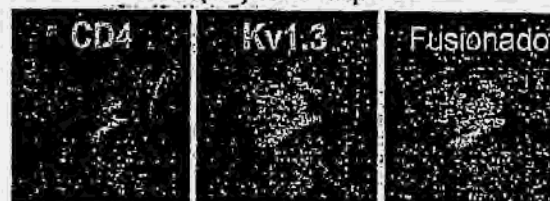


Fig. 7G

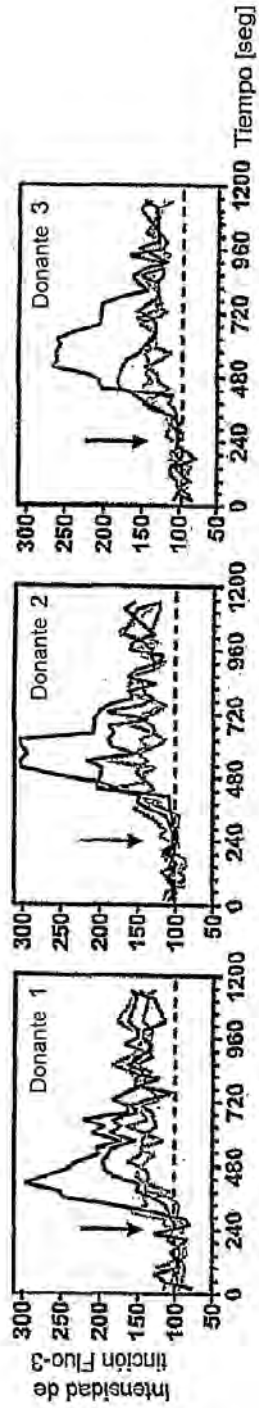


Fig. 8A

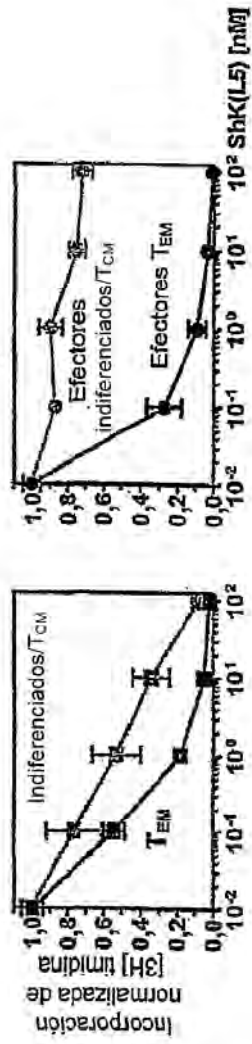


Fig. 8B

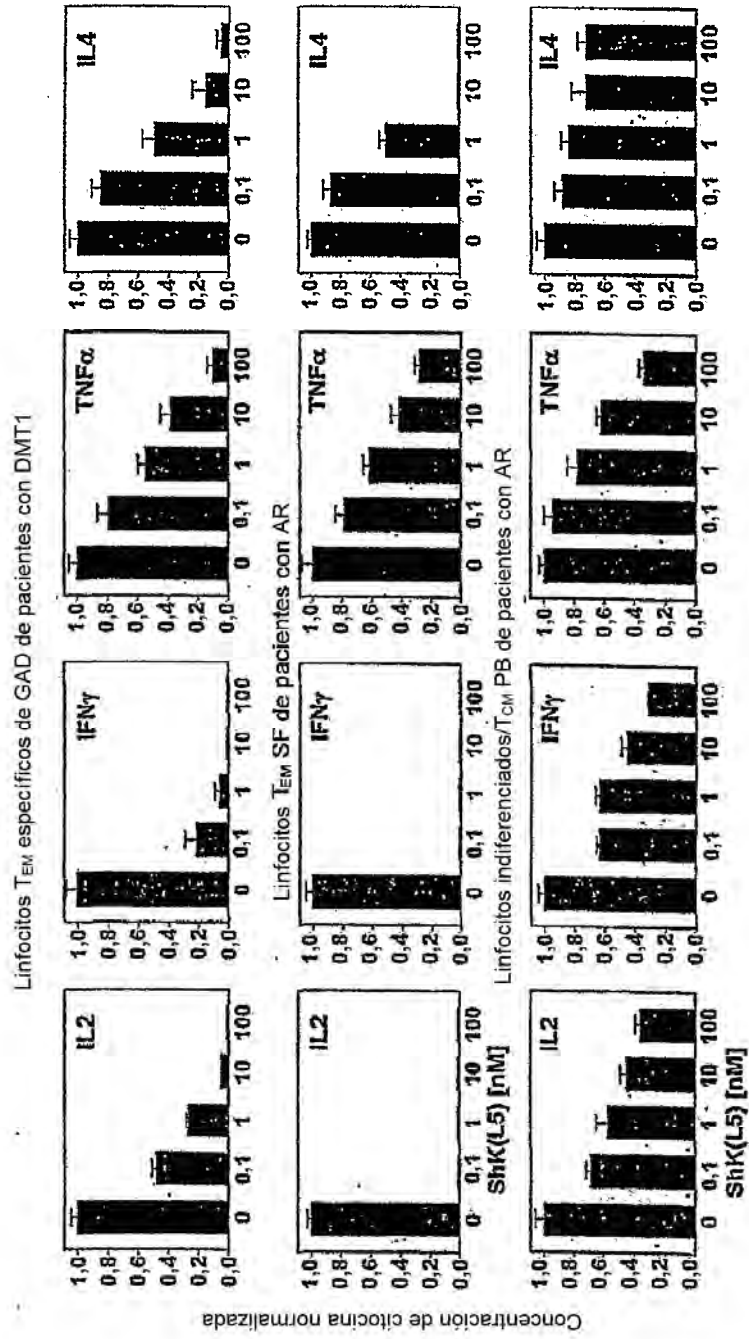


Fig. 8C

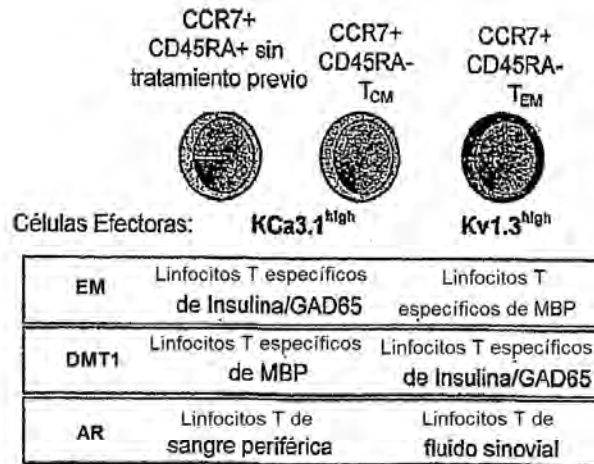


Fig. 8D

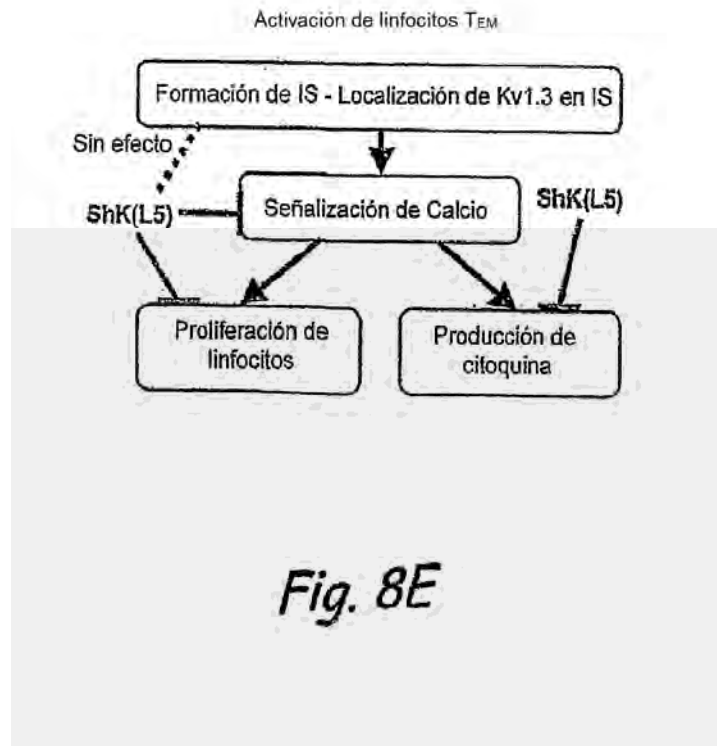


Fig. 8E

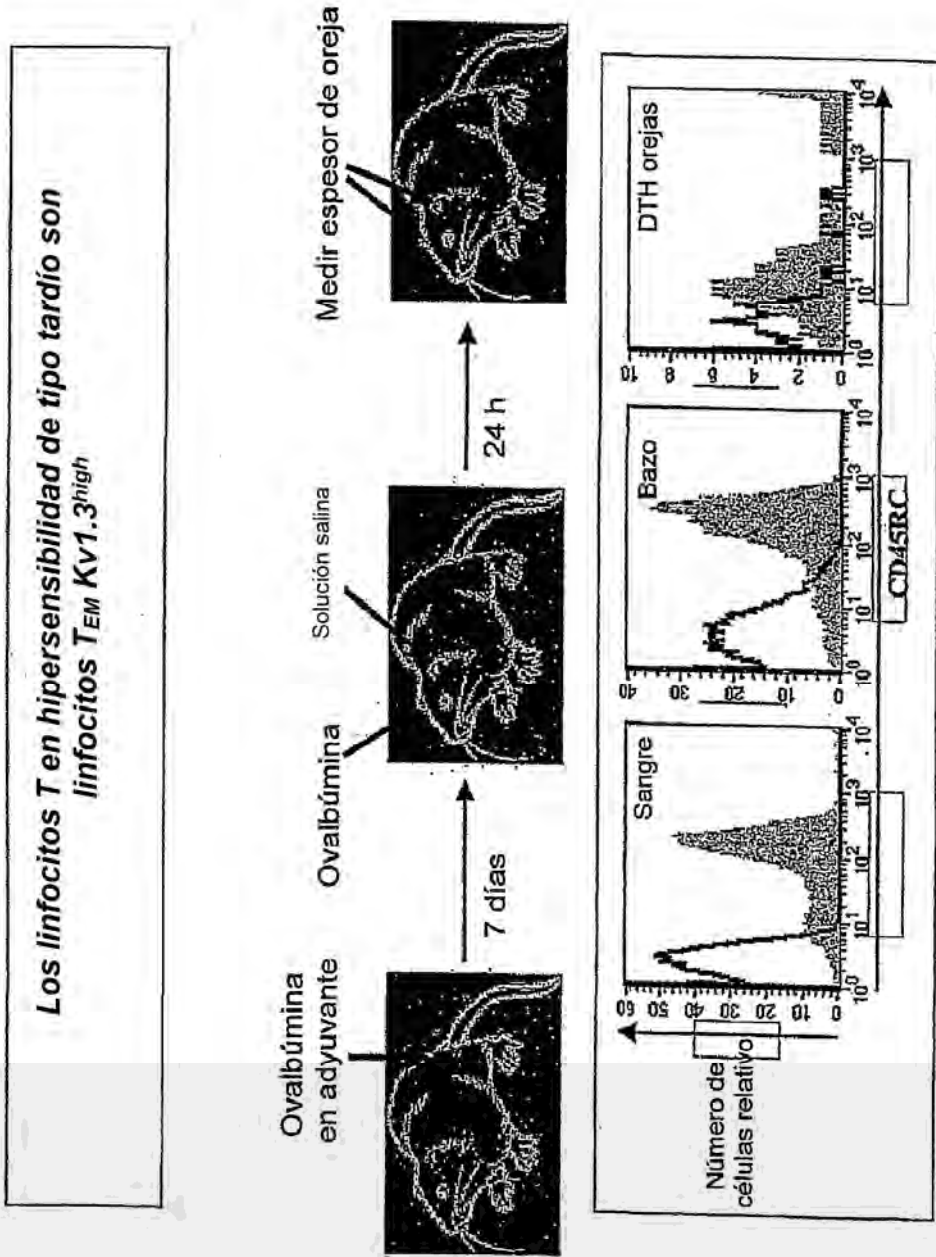


Fig. 9

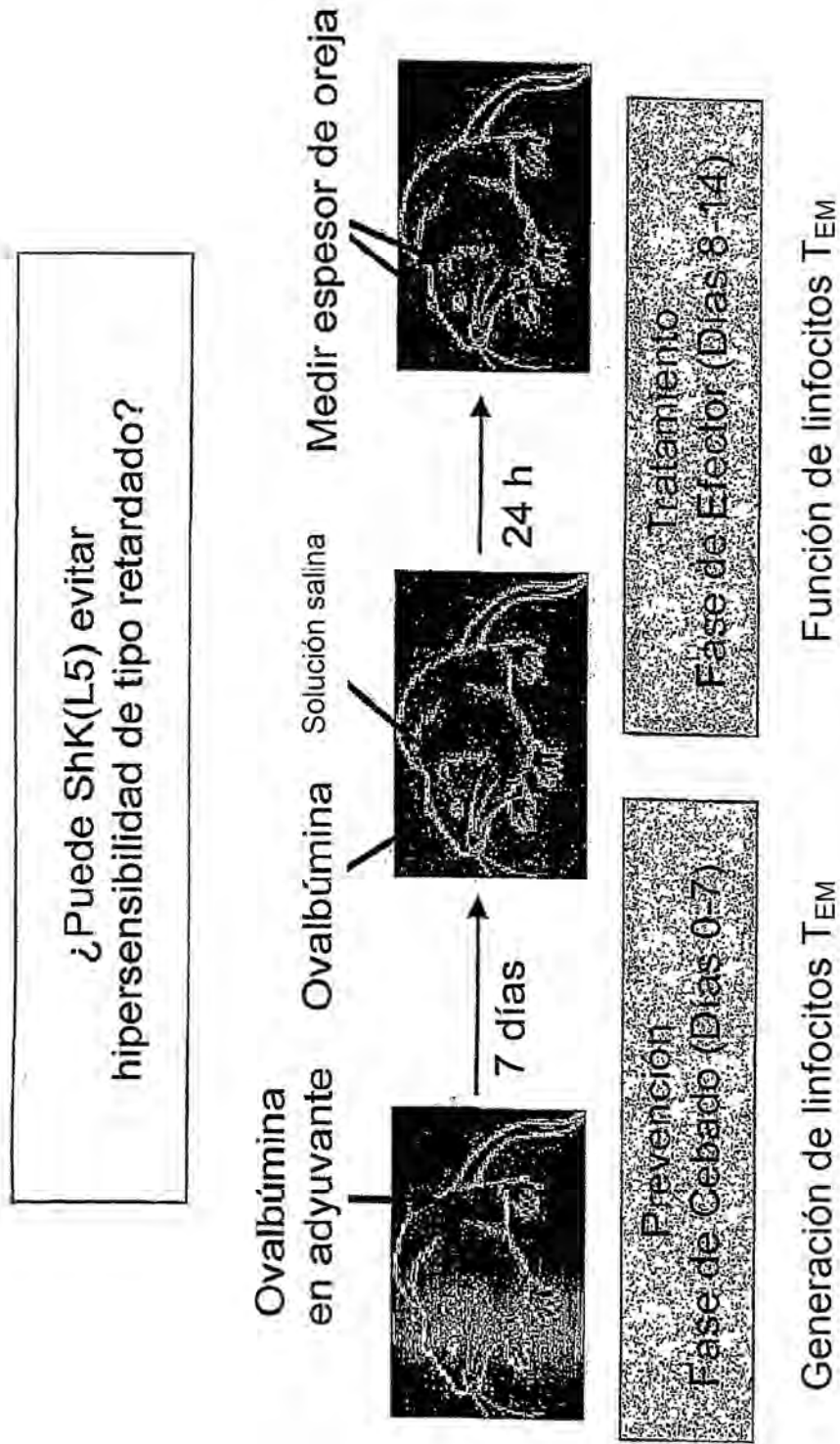


Fig. 10

ShK(L5) [10µ/kg] evita la fase efectora pero no la fase de cebado de DTH

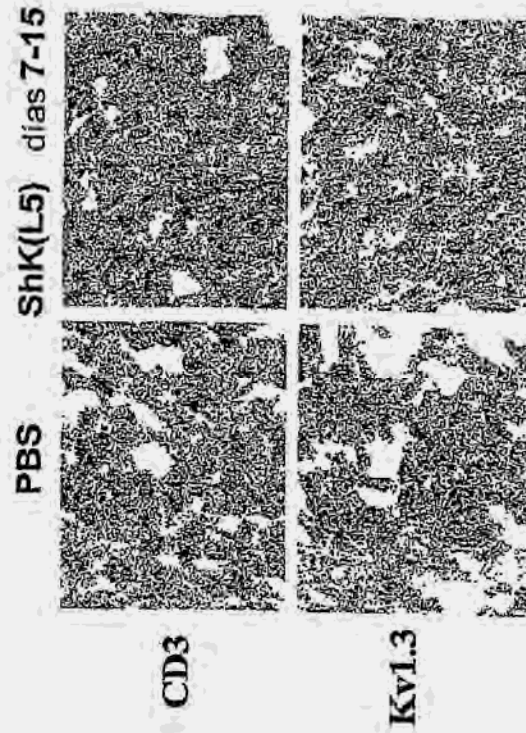
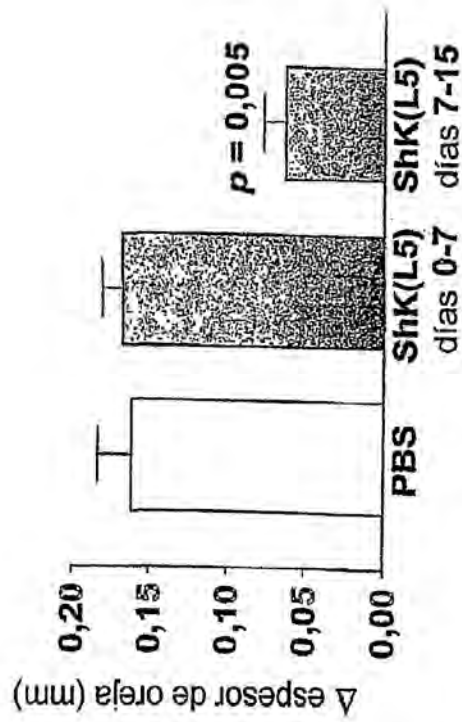


Fig. 11

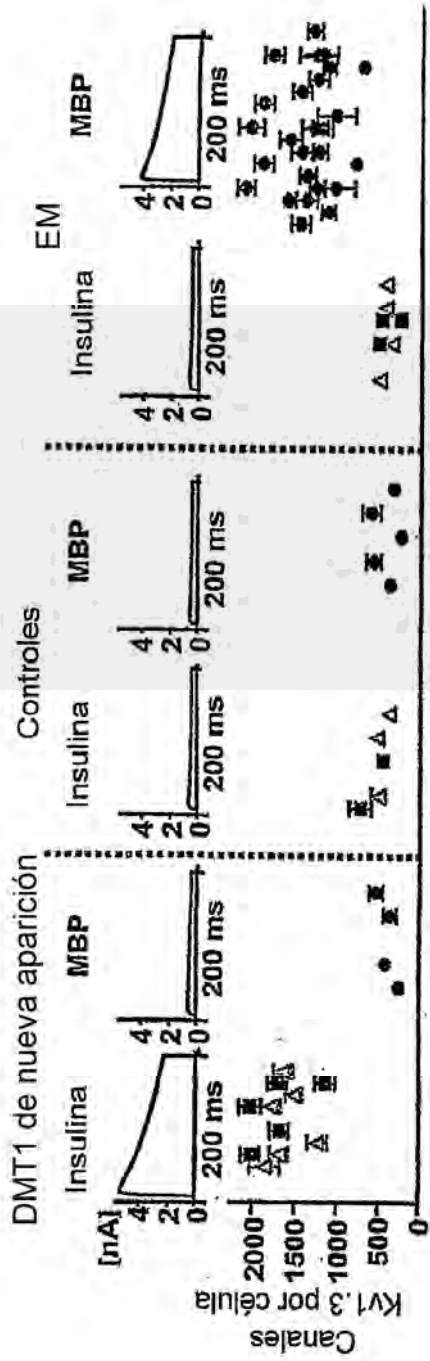


Fig. 12A

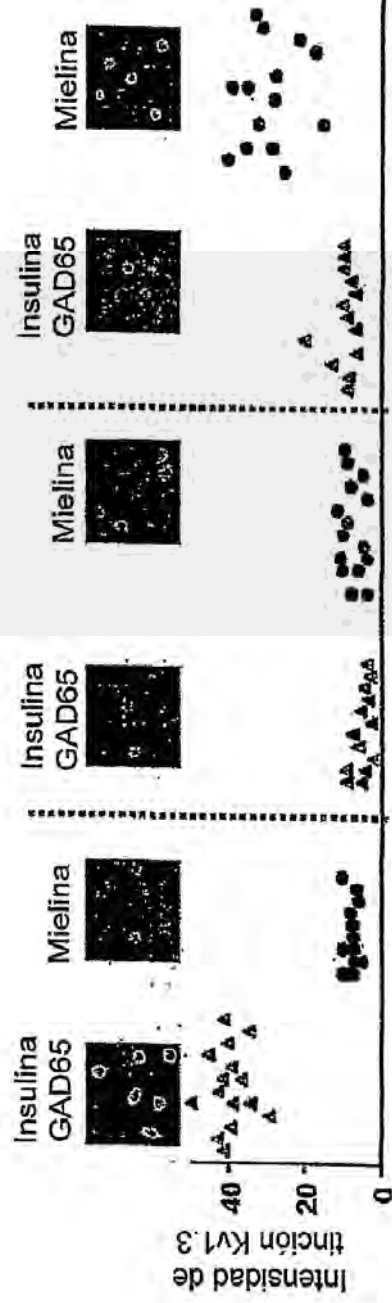
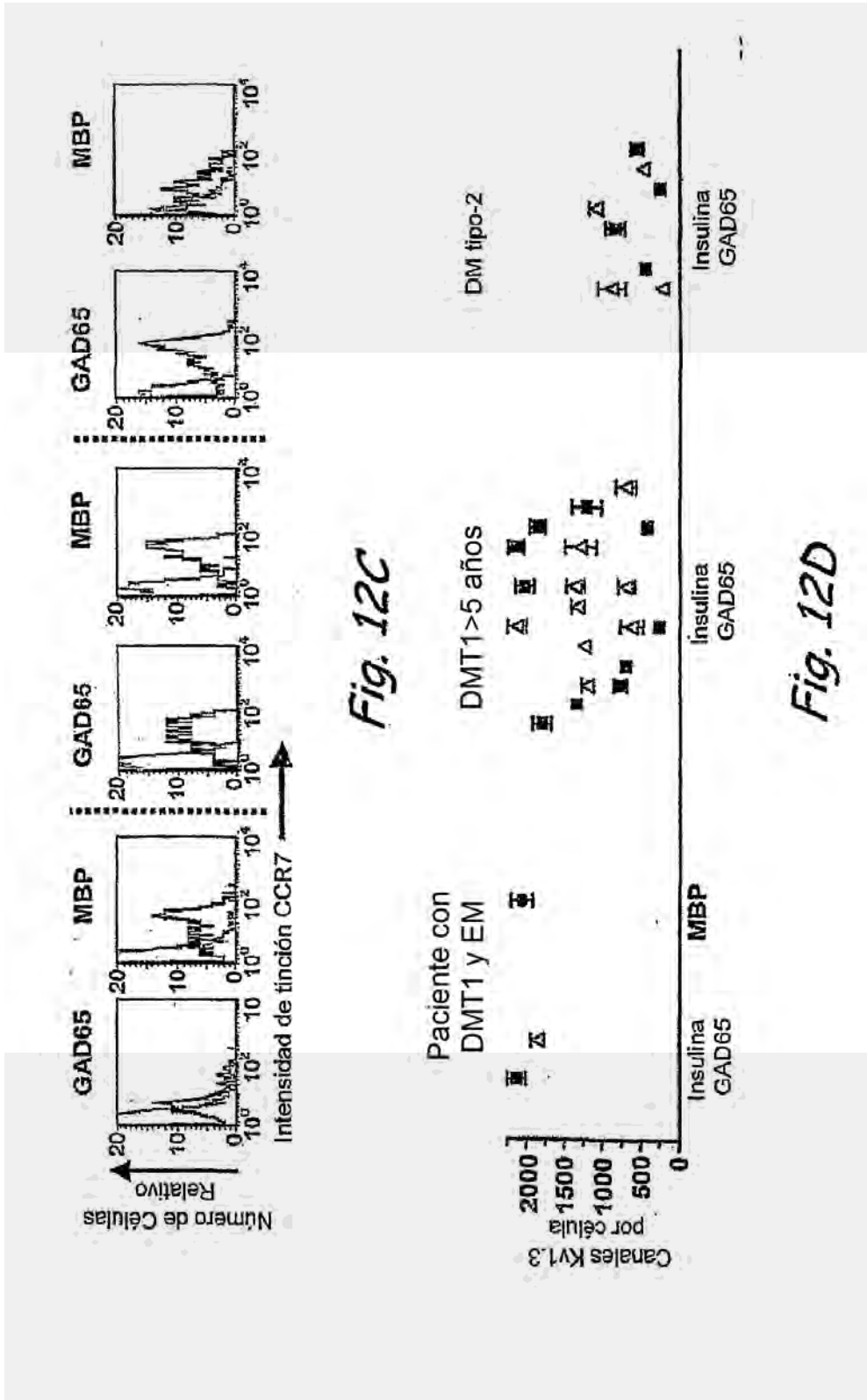


Fig. 12B



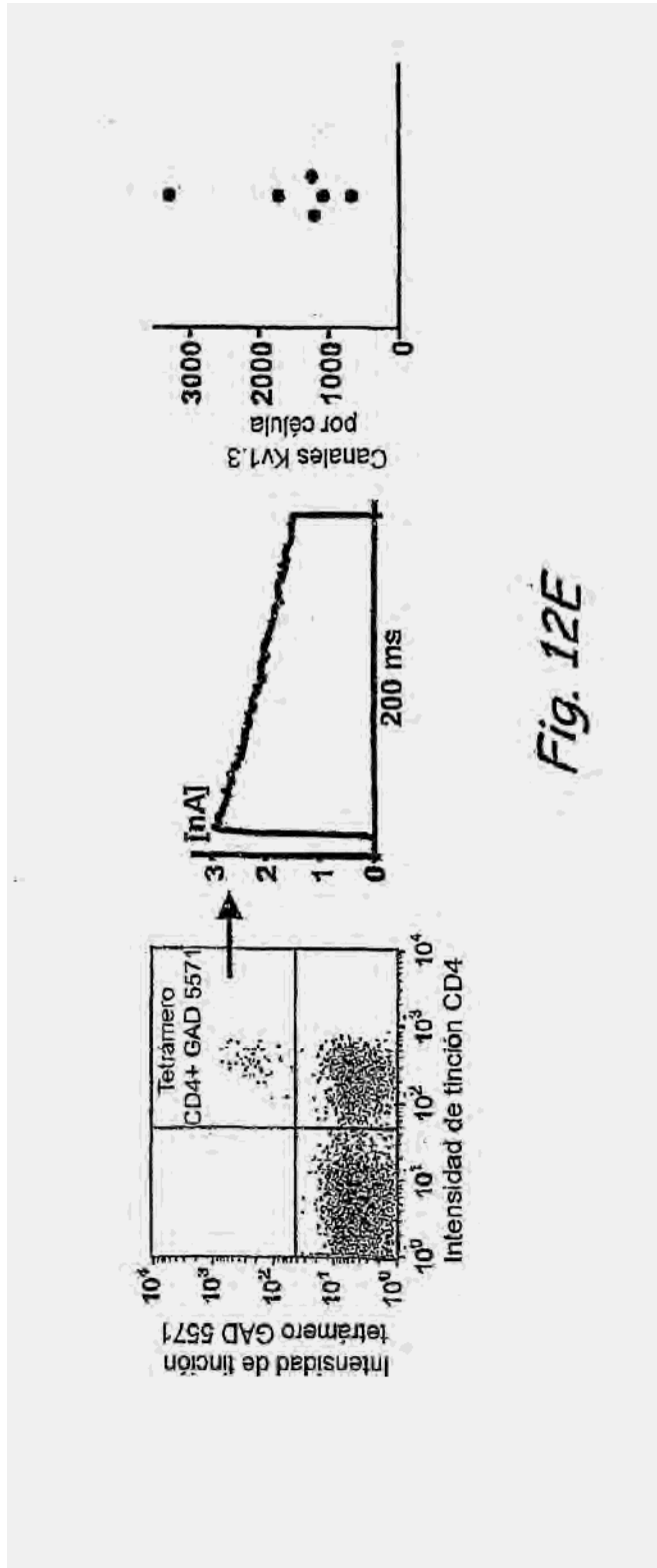


Fig. 12E

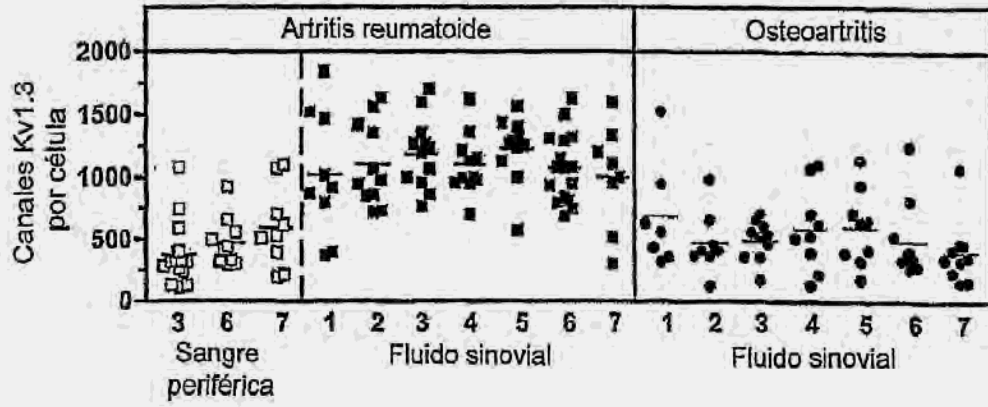


Fig. 13A



Fig. 13B

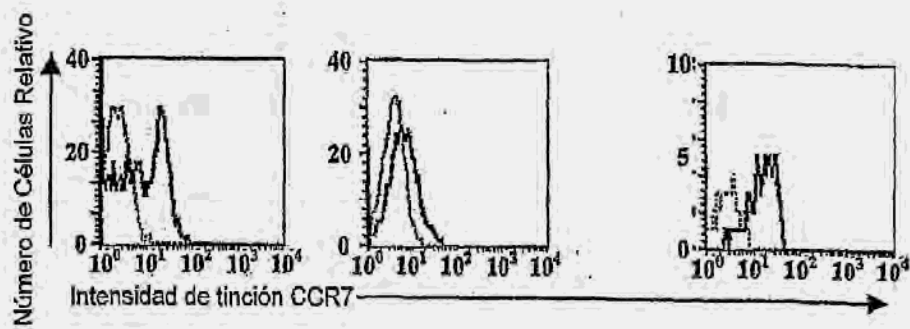


Fig. 13C

