



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년12월29일  
(11) 등록번호 10-1477296  
(24) 등록일자 2014년12월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 38/16 (2006.01) A61P 37/02 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2007-7010401  
(22) 출원일자(국제) 2005년10월07일  
심사청구일자 2010년10월07일  
(85) 번역문제출일자 2007년05월07일  
(65) 공개번호 10-2007-0091606  
(43) 공개일자 2007년09월11일  
(86) 국제출원번호 PCT/US2005/036234  
(87) 국제공개번호 WO 2006/042151  
국제공개일자 2006년04월20일  
(30) 우선권주장  
60/617,395 2004년10월07일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
US06077680 A  
W01998023639 A2

(73) 특허권자  
더 리젠츠 오브 더 유니버시티 오브 캘리포니아  
미합중국, 94607-5200 캘리포니아, 오클랜드, 프랭클린 스트리트 1111, 5th 플로어  
바캠 바이오사이언시즈, 인코포레이티드  
미국 19406 펜실바니아주 킹 오브 프루시아 호라이즌 드라이브 3700  
(72) 발명자  
첸디, 케이., 조지  
미국 92651 캘리포니아주 라구나 비치 모닝사이드 드라이브 1218  
비통, 크리스팅  
미국 92612 캘리포니아주 어바인 스탠포드 스트리트 1614  
페닝톤, 마이클, 윌리엄  
미국 08002 뉴저지주 체리 힐 델우드 로드 32  
(74) 대리인  
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 28 항

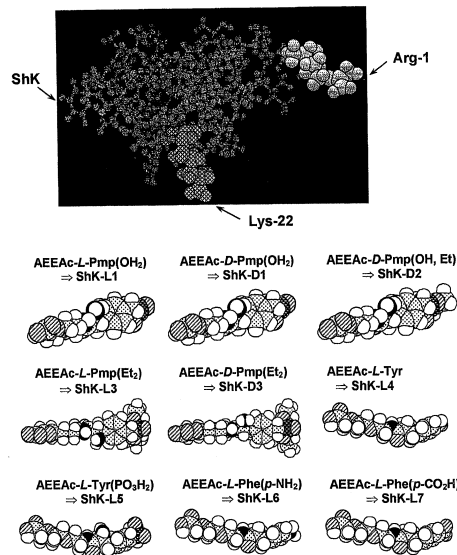
심사관 : 이수정

(54) 발명의 명칭 SHK 독소의 유사체 및 그의 K v1.3 칼륨 채널의 선택적저해에서의 용도

(57) 요약

본 발명은 ShK 독소의 유사체 및 이러한 ShK 유사체의 사용 방법에 관한 것이다. ShK 유사체는 일반적으로 음이온 전하를 갖는 화학 물질(chemical entity)(예를 들어, 원자, 분자, 기, 잔기, 화합물, 모이어티(moiety), 등)에 부착된 ShK 독소를 포함한다. 일부 실시태양에서, ShK 독소에 부착된 화학 물질은 아미노산 잔기를 포함(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



할 수 있다. ShK 유사체는 인간 또는 비인간 동물 개체에 투여되어 칼륨 채널의 저해를 일으키거나 또는 아니면 질환 또는 장애들을 치료할 수 있다. 일부 실시태양에서, ShK 독소가 부착된 화학 물질은 다른 칼륨 채널(예를 들어, Kv1.1 채널)에 대한 특정 칼륨 채널(예를 들어 Kv1.3 채널)의 선택적 저해를 제공하기 위해 선택될 수 있다. 일부 실시태양에서, ShK 독소가 부착된 화학 물질은 형광발색단을 포함할 수 있으며, 따라서 형광발색단 태그가 부착된 ShK 유사체를 제공할 수 있다. 이러한 형광발색단 태그가 부착된 ShK 유사체는 단독으로 또는 자가반응성 세포를 검출할 수 있는 유형 II 4량체와 함께 유량 세포분석법에서 사용될 수 있다.

---

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

음이온 전하를 갖는 화학 물질(chemical entity)에 부착된 ShK를 포함하는 조성물이며, 상기 화학 물질이 ShK의 N 말단에 부착된 아미노에틸옥시에틸옥시-아세틸 연결자 및 상기 연결자에 결합된 천연 또는 비천연 아미노산의 음이온-하전된 잔기를 포함하며, 상기 화학 물질이 AEEAc-L-Tyr( $\text{PO}_3\text{H}_2$ ), AEEAc-L-Phe( $p\text{-CO}_2\text{H}$ ), 또는 AEEAc-L-*p*-Tyr-모노메틸로부터 선택되는 물질을 포함하는, 유량 세포분석법 또는 자가면역 질환, 이식편대숙주 질환, 이식된 조직 또는 기관의 거부반응, 대사 증후군, 2형 당뇨병, 비만, 또는 치주질환 관련 골흡수를 치료하거나 예방하기 위한 조성물.

**청구항 2**

제1항에 있어서, ShK가 천연 공급원으로부터 수득되는 것인 조성물.

**청구항 3**

제1항에 있어서, ShK가 합성물인 조성물.

**청구항 4**

삭제

**청구항 5**

삭제

**청구항 6**

삭제

**청구항 7**

삭제

**청구항 8**

삭제

**청구항 9**

삭제

**청구항 10**

제1항에 있어서, 화학 물질이 AEEAc-L-*p*-Tyr-모노메틸을 포함하는 조성물.

**청구항 11**

제1항에 있어서, 화학 물질이 AEEAc-L-Tyr( $\text{PO}_3\text{H}_2$ )를 포함하는 조성물.

**청구항 12**

제1항에 있어서, 화학 물질이 AEEAc-L-Phe( $p\text{-CO}_2\text{H}$ )를 포함하는 조성물.

**청구항 13**

제1항에 있어서, 상기 ShK가 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(서열목록 1)의 아미노산 서열을 갖는 조성물.

**청구항 14**

p-포스포-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(서열목록 2)의 아미노산 서열을 갖는 물질을 포함하는, 유량 세포분석법 또는 자가면역 질환, 이식편대숙주 질환, 이식된 조직 또는 기관의 거부반응, 대사 증후군, 2형 당뇨병, 비만, 또는 치주질환 관련 골흡수를 치료하거나 예방하기 위한 조성물.

**청구항 15**

p-포스포-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-아미드(서열목록 3)의 아미노산 서열을 갖는 물질을 포함하는, 유량 세포분석법 또는 자가면역 질환, 이식편대숙주 질환, 이식된 조직 또는 기관의 거부반응, 대사 증후군, 2형 당뇨병, 비만, 또는 치주질환 관련 골흡수를 치료하거나 예방하기 위한 조성물.

**청구항 16**

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-아미드(서열목록 4)의 아미노산 서열을 갖는 물질을 포함하는, 유량 세포분석법 또는 자가면역 질환, 이식편대숙주 질환, 이식된 조직 또는 기관의 거부반응, 대사 증후군, 2형 당뇨병, 비만, 또는 치주질환 관련 골흡수를 치료하거나 예방하기 위한 조성물.

**청구항 17**

삭제

**청구항 18**

제1항 내지 제3항 및 제10항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는, 자가면역 질환을 예방하거나 치료하기 위한 조성물.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 자가면역 질환이 다발성 경화증, 중증근무력증, 길랑-바레(Guillain-Barre), 자가면역 신경병증, 자가면역 포도막염, 크론병(Crohn's disease), 궤양성 대장염, 원발성 담즙성 간경화증, 자가면역 간염, 자가면역 저혈소판증, 1형 당뇨병, 애디슨병(Addison's disease), 그레이브병(Grave's disease), 하시모토 갑상선염, 자가면역 난소염 및 고환염, 베체트병(Behcet's disease), 류마티스 관절염, 치주질환 관련 골흡수, 전신성 홍반 루프스, 공피증, 다발성근염-피부근염, 심상성 천포창, 강직척추염, 척추관절염(spondyloarthropathies), 및 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome)으로 이루어진 군으로부터 선택된 것인 조성물.

**청구항 20**

제1항에 있어서, 이식편대숙주 질환을 예방하거나 치료하기 위한 조성물.

**청구항 21**

제1항에 있어서, 이식된 조직 또는 기관의 거부반응을 치료하거나 예방하기 위한 조성물.

**청구항 22**

제1항에 있어서, 대사 증후군을 예방하거나 치료하기 위한 조성물.

**청구항 23**

제1항에 있어서, 2형 당뇨병을 치료하거나 예방하기 위한 조성물.

**청구항 24**

제1항에 있어서, 비만을 치료하거나 예방하기 위한 조성물.

**청구항 25**

제1항에 있어서, 치주질환 관련 골흡수를 치료하거나 예방하기 위한 조성물.

**청구항 26**

(A) 제1항에 따른 조성물을 제공하는 단계;

(B) 상기 단계 A에서 제공된 조성물을 세포와 배합하는 단계; 및

(C) 유량 세포분석기를 사용하여, 상기 단계 A에서 제공된 조성물에 대해 친화성을 갖는 세포를 계수, 단리 또는 구별하는 단계

를 포함하는, 시험관내 또는 인간을 제외한 개체에서의 유량 세포분석법의 실시 방법.

**청구항 27**

제26항에 있어서, 단계 (C)에서 유량 세포분석기를 사용하여 T 림프구를 계수, 단리 또는 구별하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 28**

제1항에 있어서, ShK가 21번 위치의 Met 잔기를 치환하여 변형된 것인 조성물.

**청구항 29**

제28항에 있어서, 21번 위치의 Met 잔기에서의 치환이 산화를 방지하는 것인 조성물.

**청구항 30**

제1항에 있어서, ShK가 C-말단 산 작용기를 아미드로 치환하여 변형된 것인 조성물.

**청구항 31**

제30항에 있어서, C-말단 산 작용기의 아미드로의 치환이 C-말단 카르복시펩티다제 효소에 대한 안정성을 부여하는 것인 조성물.

**청구항 32**

제26항에 있어서, ShK가 21번 위치의 Met 잔기를 치환하여 변형된 것인 방법.

**청구항 33**

제32항에 있어서, 21번 위치의 Met 잔기에서의 치환이 산화를 방지하는 것인 방법.

**청구항 34**

제26항에 있어서, ShK가 C-말단 산 작용기를 아미드로 치환하여 변형된 것인 방법.

**청구항 35**

제34항에 있어서, C-말단 산 작용기의 아미드로의 치환이 C-말단 카르복시펩티다제 효소에 대한 안정성을 부여하는 것인 방법.

**청구항 36**

삭제

**청구항 37**

삭제

**청구항 38**

삭제

**청구항 39**

삭제

**청구항 40**

삭제

**청구항 41**

삭제

**청구항 42**

삭제

**청구항 43**

삭제

**청구항 44**

삭제

**청구항 45**

삭제

**청구항 46**

삭제

**청구항 47**

삭제

**청구항 48**

삭제

**청구항 49**

삭제

**청구항 50**

삭제

**청구항 51**

삭제

**청구항 52**

삭제

**청구항 53**

삭제

**청구항 54**

삭제

**명세서**

**기술분야**

**관련 출원**

[0002] 본 특허원은 본원에 그 전체가 명백히 참고로 인용된, 2004년 10월 7일자로 출원된 미국 가출원 제60/617,395호에 대한 우선권을 주장한다.

**발명의 기술분야**

[0004] 본 발명은 a) 신규 조성물, b) T- 및 B-림프구 및 다른 세포 유형들에서 Kv1.3 채널의 생체내 및 시험관내 저해를 위한 방법 및 키트, 및 c) 인간 또는 동물 개체에서 자가면역 및 다른 질환의 치료 방법을 제공한다.

**배경 기술**

[0005] 세포 원형질막은 진핵세포의 외부 표면을 형성한다. 다양한 이온들(예를 들어, 나트륨, 칼슘, 칼륨 등)이 세포의 원형질막을 통한 수동적 확산에 의해 세포로 유입되고 유출된다. 이러한 세포 내외로의 이온들의 확산은 세포막내 "이온 채널"의 존재에 의해 촉진된다. 이온 채널은 세포막내에 삽입된 단백질로서 막을 통한 이온의 선택적 유동을 제어함으로써, 세포의 세포내 함량과 주위 세포외액 사이의 농도 구배를 형성시킨다. 이온 농도는 흥분성 세포(예를 들어, 뉴런)의 전기 활성화와 직접적으로 연관되어 있기 때문에, 이온 채널의 기능(또는 기능장애)은 실질적으로 상기 세포의 전기적 특성과 거동을 제어할 수 있다. 실제로, "채널병리증"으로 총칭되는 다양한 질환들이 이온 채널의 기능부전 또는 기능장애와 관련된 것으로 여겨진다.

[0006] 이온 채널은 이들이 개방되거나 폐쇄될 수 있다면, "관문"으로 지칭된다. 기본적인 유형의 관문 이온 채널은 a) 리간드 관문 채널, b) 기계적 관문 채널, 및 c) 전압 관문 채널을 포함한다. 특히, 전압 관문 채널은 뉴런, 근육 세포 및 비흥분성 세포(예를 들어, 림프구)에서 발견된다. 이들은 원형질막을 통한 전하의 변화에 반응하여 개방되거나 폐쇄된다.

Kv1.3 채널 및 자가면역 질환

[0008] 다발성 경화증(MS), 1형 당뇨병(T1DM), 류마티스 관절염(RA) 및 건선과 같은 자가면역 질환은 전세계의 수억 인구들이 앓고 있다. 이러한 질환들에서는, 특이적인 자가반응성 T 세포 - 예를 들어, MS 환자에서의 미엘린-특이적 T 세포 - 가 질환 경과 동안 반복된 자가항원 자극을 받고, 염증성 조직으로 이동하여 사이토킨을 분비함으로써 발병전에 기여하는 임상적으로 활성화된 기억세포로 분화되는 것으로 여겨진다(Viglietta et al., 2002; Vissers et al., 1002; Wulff et al., 2003b). 임상적으로 활성화된 기억 T 세포를 우선적으로 표적으로 하는 치료법은 자가면역 질환에 대한 중요한 가치를 가질 것이다.

[0009] 기억 T 세포는 케모킨 수용체 CCR7 및 포스포타제 CD45RA의 발현을 기초로 하여 2가지 아집단 - 중앙 기억(T<sub>CM</sub>) 및 이펙터 기억(T<sub>EM</sub>) - 으로 분류된다(Geginat et al., 2001 ; Sallusto et al., 1999). 천연 및 T<sub>CM</sub> 세포는 이들이 염증 부위로 이동하기 전에 림프절로 돌아가는 반면, T<sub>EM</sub> 세포는 직접 염증 부위로 가서 다량의 IFN-β 및 TNF-α를 분비하고 즉시 이펙터 기능을 나타낸다. MS 환자에서 미엘린-특이적 자가반응성 T 세포는 주로 활성화된 T<sub>EM</sub> 세포이고(Wulff et al., 2003b), 미엘린-특이적 활성화된 래트(rat) T<sub>EM</sub> 세포의 천연 수용자로서의 입양전달이 EAE(뇌척수염)를 유도한다(Beeton et al., 2001a; Beeton et al., 2001b)는 사실이 최근에 밝혀졌다. T<sub>EM</sub> 세포의 면역조절을 위한 흥미로운 신규 치료 표적은 전압-관문 Kv1.3 K<sup>+</sup> 채널이다. T<sub>EM</sub> 세포는 활성화되었을 때 Kv1.3 채널을 상향-조절하며, 이들의 항원-유도된 증식은 Kv1.3 차단제에 대해 정교하게 민감한 반응을 나타낸다(Wulff et al., 2003b). 이와는 대조적으로, 천연 및 T<sub>CM</sub> 세포는 먼저 Kv1.3 차단제에 상당히 덜 민감하며, 칼슘-활성화된 K<sup>+</sup> 채널 IKCa1을 상향-조절함으로써 Kv1.3 차단에 대해 급속하게 저항성으로 된다(Ghanshani et al., 2000; Wulff et al., 2003b).

[0010] T<sub>EM</sub> 세포에서의 Kv1.3의 우세성은 이러한 아집단의 활성을 특이적인 Kv1.3 저해제로 조작하는 강력한 수단을 제공한다. 상기 채널의 기능적으로 제한된 조직 분포, 및 생체내 Kv1.3 차단이 동물 모델에서 명백한 부작용을

일으키지 않으면서  $T_{EM}$ -매개된 EAE, 치주질환에서의 골흡수 및 지연형 과민반응을 개선시킨다는 사실은 치료 표적으로서 Kv1.3의 매력을 향상시킨다(Beeton et al., 2001b; Koo et al., 1997; Valverde et al., 2004). Kv1.3 차단제는 모든 활성화된  $T_{EM}$  세포(예를 들어, 백신 항원에 특이적인  $T_{EM}$  세포)를 억제할 것이지만, Kv1.3-기재 치료법은 전체 면역계를 광범위하게 무차별적으로 조절하는 현재 치료법에 비해 상당한 개선책이 될 것이다. Kv1.3 차단제의 추가의 이점은 이들이 가역적이라는 것이다. 따라서, 효과를 진정시키는데 수개월이 걸리는 화학요법제와는 달리, Kv1.3 차단제는 필요에 따라 그의 치료 효과를 적정하고 감염증에 직면하면 치료법을 중지할 수 있다.

[0011] Kv1.3 채널 및 비만

[0012] Kv1.3 채널은 에너지 항상성 및 에너지 균형을 담당하는 것으로 알려져 있다(Hum Mol Genet. 2003 12:551-9). Kv1.3 채널이 유전적으로 녹아웃(knockout)된 마우스는 체중 증가 없이 지방 식이를 섭취할 수 있었지만, 동일한 식이가 주어진 대조군 마우스는 과체중으로 되었다. Kv1.3 채널의 약리학적 차단은 Kv1.3 채널의 유전적 녹아웃 효과를 반복하였다. 결과적으로, Kv1.3 차단제는 비만을 관리하는데 있어서 용도를 가질 것으로 보인다.

[0013] Kv1.3 채널 및 2형 당뇨병

[0014] Kv1.3 채널은 간 및 근육과 같은 말초 표적 기관에서 인슐린-민감성을 조절하는 역할을 한다(Proc Natl Acad Sci U.S.A. 2004, 101:3112-7). 마우스에서 Kv1.3 채널의 유전적 녹아웃은 인슐린에 대한 간 및 근육의 민감성을 증가시켰다. 따라서, Kv1.3 차단제는 인슐린 말초 작용을 증가시켜 혈중 글루코스 수준을 감소시킴으로써 2형 당뇨병을 치료하는 용도를 가질 수 있다.

[0015] Kv1.3 채널을 저해하는 것으로 알려진 천연 폴리펩티드

[0016] 대부분의 강력한 Kv1.3 저해제는 카리브해 말미잘 스티코닥틸라 헬리안투스(*Stichodactyla helianthus*) 유래의 펩티드 ShK이다. ShK는 3개의 디설파이드 브릿지에 의해 가교결합된 35-잔기 폴리펩티드이다. ShK는 Kv1.3를 차단하고( $K_d = 11$  pM) 피코몰 농도로  $T_{EM}$  세포의 증식을 억제하며, 미엘린-특이적  $T_{EM}$  세포의 입양전달에 의해 유도된 래트의 실험적 자가면역 뇌척수염(EAE)을 개선시킨다. ShK의 잠재적인 단점은 뉴런 Kv1.1 채널에 대한 낮은 피코몰 친화성이다( $K_d$  28 pM). EAE에서의 ShK 시도에서 어떠한 부작용도 관찰되지 않았지만, MS에서 혈액-뇌-장벽이 손상되는 경우 나타날 수 있는 바와 같이, 고농도 ShK의 뇌로의 진입은 원하지 않는 신경독성을 유도할 수 있다. 따라서 고도로 특이적인 Kv1.3 저해제의 개발이 필수적이다. 제약 산업 및 학계에서의 대규모 노력으로 중간-나노몰 범위로 Kv1.3을 저해하는 몇가지 소분자가 수득되었지만, 이들 화합물은 실용적인 약물 후보자에 필요한 선택성이나 효능을 갖지 않는다.

[0017] ShK의 몇몇 절단된 펩티드성 유사체가 이전에 보고되어 있다. 이들 ShK 유사체들 중 하나에서는, 천연 서열이 절단된 후 추가의 공유 연결기(비천연 디설파이드 및 2개의 락탐 브릿지)를 도입시켜 안정화된다. 다른 유사체들에서는, 디설파이드 및/또는 락탐 브릿지에 의해 안정화된 비천연 구조 스캐폴드가 천연 독소로부터 중요한 아미노산 잔기를 포함하도록 개질되었다. 이들 ShK 유사체는 다양한 정도의 Kv1.3 저해 활성 및 특이성을 나타내었다[Lanigan, M. D. et al.; Designed Peptide Analogues of the Potassium Channel Blocker ShK Toxin; *Biochemistry*, 25;40(51):15528-37 (December 2001)].

[0018] 당분야에는 여전히 Kv1.1 채널 또는 다른 칼륨 채널에 대해서는 최소한의 저해 효과를 나타내거나 전혀 저해 효과를 나타내지 않으면서 림프구에서 Kv1.3 채널을 선택적으로 저해하는 ShK의 신규한 유사체의 개발이 요구되고 있다.

[0019] **발명의 개요**

[0020] 본 발명은 음이온 전하를 갖는 유기 또는 무기 화학 물질(chemical entity)(예를 들어, 원자, 분자, 기, 잔기, 화합물, 모이어티, 등)에 부착된(예를 들어, 결합되거나, 연결자에 의해 연결되거나 또는 아니면 연합된) ShK 독소를 포함하는 신규 조성물(본원에서 "ShK 유사체"로 지칭함)을 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명에 따라, 인간 또는 동물 개체에 유효량의 본 발명의 ShK 유사체를 투여함으로써 인간 또는 동물 개체에서 칼륨 채널을 저해하고/하거나 질환들 또는 장애들을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시태양에서, ShK 독소가 부착된 화학 물질은 특정 칼륨 채널(예를 들어, Kv1.3 채널)을 다른 칼륨 채널(예를 들어 Kv1.1 채널)에 비해서 선택적으로 저해하는 것을 제공하기 위해 선택될 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명에 따라, 상기 특성의 ShK 유사체는 형광발색단 태그(tag)를 포함할 수 있으며, 본 발명의 이러한



형광발색단 태그가 부착된 ShK 유사체는 단독으로 또는 자가반응성 세포를 검출할 수 있는 유형 II 4량체와 함께 유량 세포분석법에서 사용될 수 있다.

[0023] 본 발명의 또다른 양태, 요소 및 세부사항은 하기 상세한 설명 및 실시예를 숙지하면 당업자에게 자명할 것이다.

**발명의 상세한 설명**

[0073] 하기 발명의 상세한 설명 및 첨부된 도면은 단지 본 발명의 반드시 전부는 아닌 일부 실시예 또는 실시태양을 기술하기 위해 의도된 것이다. 이러한 상세한 설명 및 첨부된 도면은 어떠한 방식으로든지 본 발명의 범주를 제한하지 않는다.

[0074] 본 발명은 ShK의 신규한 유사체, 이러한 조성물의 제조 방법, 인간 또는 동물 세포에서 Kv1.3 채널(또는 다른 이온 채널)을 저해하기 위해 상기 조성물을 사용하는 방법, 및 질환 및 장애들, 예를 들어 T 세포 매개된 자가면역 질환들을 치료 또는 예방하기 위해 상기 조성물을 사용하는 방법을 제공한다. 본 발명의 조성물은 유기 또는 무기의 음이온-하전된 화학 물질(예를 들어, 원자, 분자, 기, 잔기, 화합물, 모이어티 등)에 부착된(예를 들어, 결합된, 연결자에 의해 연결된 또는 다르게는 연합된) ShK 독소를 포함한다. 본 발명의 적어도 일부 실시태양에서, 유기 또는 무기의 음이온-하전된 화학 물질은 Kv1.1 채널에 비해 Kv1.3 채널을 저해하기 위해 조성물의 친화성을 증가시키거나 최적화시키기 위해 선택될 수 있다. 본 발명에 따라 ShK에 연결되거나 결합될 수 있는 유기 또는 무기의 음이온-하전된 분자 또는 기의 예는 아미노산, 폴리펩티드, 아미노산 잔기, 비천연 아미노산 잔기, 트레오닌, 트레오닌 유도체, 포스포-트레오닌, 세린, 세린 유도체, 포스포-세린, 글루탐산, 글루탐산 유도체, 감마카르복시-글루탐산, 아스파르트산, 아스파르트산 유도체, 무기 화합물 또는 기, 유기 화합물 또는 기, 숙신산 무수물 및 프탈산 무수물을 포함하지만, 반드시 이들로 제한되지는 않는다.

[0075] 본 발명에 따라, 음이온-하전된 화학 물질이 아미노산 잔기를 포함하는 것인 본 발명의 조성물의 일부 비제한적인 예는 도 1 및 2C에 도시되어 있으며, 하기 표 1에 나타난 바와 같이 문자숫자식 명칭으로 본원에서 지칭된다.

**표 1**

명칭	2번 위치에서 ShK에 결합된 아미노산 잔기
ShK-L1	AEEAc-L-Pmp(OH <sub>2</sub> )
ShK-D1	AEEAc-D-Pmp(O <sub>2</sub> )
ShK-D2	AEEAc-D-Pmp(OH, Et)
ShK-L3	AEEAc-L-Pmp(Et <sub>2</sub> )
ShK-D3	AEEAc-D-Pmp(Et <sub>2</sub> )
ShK-L4	AEEAc-L-Tyr
ShK-L5	AEEAc-L-Tyr(PO <sub>3</sub> H <sub>2</sub> )
ShK-L6	AEEAc-L- <i>p</i> -Tyr-모노메틸
ShK-L7	AEEAc-L-Phe( <i>p</i> -CO <sub>2</sub> H)

[0076] 구체적으로 도 1을 참조하면, 티로신 또는 페닐알라닌 또는 이들의 하전된 비천연 유도체를 ShK의 N 말단(잔기 Arg<sup>1</sup>은 흐린 회색으로 도시된다)에 부착된 연결자를 통해 ShK(위 좌측)에 컨쥬게이션(conjugation)시켰다. 채널 차단에 필요한 Lys22는 더 어두운 회색 색조로 도시된다. ShK의 분자 모델은 공개된 NMR 구조를 기초로 하여, 연결자 및 새로운 잔기의 구조를 설계하였다. 본 발명의 조성물의 이러한 실시태양은 일반적으로 하나 이상의 음이온-하전된 아미노산 잔기에 결합된(예를 들어, 화학적으로 결합된, 연결된 또는 다르게는 연합된) 폴리펩티드인 ShK 독소를 포함한다. 아미노산 잔기가 키랄 중심을 갖는 실시태양에서는, 이러한 아미노산 잔기의 D 및/또는 L 거울상이성질체를 사용할 수 있다. 음이온-하전된 아미노산 잔기는 비천연 잔기일 수 있으며 ShK 폴리펩티드의 N-말단에 부착되거나 연결될 수 있다. 일부 실시태양에서, 음이온-하전된 아미노산 잔기는 연결자, 예를 들어 아미노에틸옥시메틸옥시-아세틸 연결자를 통해 ShK의 N 말단에 연결될 수 있다. ShK의 이들 유사체는 다른 칼륨 채널(예를 들어, Kv1.1)에 대해 감소된 친화성을 갖기 때문에 ShK보다 더욱 특이적으로 Kv1.3 채널을 저해한다. ShK는 당분야에 공지된 바와 같은 천연 공급원으로부터 분리되거나 합성될 수 있다.

[0078]

ShK 독소의 합성

[0079]

ShK 독소는 임의의 적합한 방법에 의해 합성할 수 있다. 이러한 한 방법에서는, Arg(Pmc), Asp(OtBu), Cys(Trt), Gln(Trt), His(Trt), Lys(Boc), Ser(tBu) 및 Thr(tBu)를 포함하는 Fmoc-아미노산(바켄 파인케미칼리엔(Bachem Feinchemikalien))을 상업적으로 구입하고 조립하여 ShK 독소를 제조한다. 아미노산의 단계적 조립은 Fmoc-Cys(Trt)-R로 출발하여 0.25 mmol 규모에서 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems) 431A 펩티드 합성기상에서 수행할 수 있다. 잔기 34번 내지 22번은 단일 커플링된다. 그 후, 수지의 분취액(예를 들어, 절반)을 제거하여 혼합을 더욱 양호하게 수행한다. 그다음 펩티드 서열의 나머지를 잔존하는 수지 분취액에 이중 커플링시킨다. 모든 커플링은 2당량의 1-하이드록시벤조트리아졸의 존재하의 디사이클로헥실카르보디이미드에 의해 매개된다. 최종 2개의 잔기를 또한 HBTU/DIEA 화학을 통해 커플링시킨다. 이들 잔기는 Aeea(Fmoc-아미노에틸옥시에틸옥시아세트산), 및 N-말단 잔기로서의 Fmoc-Tyr(PO4) 모노벤질 에스테르이다. Fmoc-기의 최종 제거에 이어서, 펩티드 수지(2.42 g)를 수지로부터 절단하고 동시에 실온에서 시약 K를 사용하여 2시간 동안 탈보호시킨다. 시약 K는 당분야에 공지되어 있으며 문헌에 기재되어 있다. 문헌[King, D.S., Fields, G.B. and Fields, G.B. (1990) *Int. J. Peptide Protein Res.* **36**, 255-266]을 참조한다. 절단에 이어서, 펩티드를 여과하여 사용한 수지 비드를 제거하고 빙냉 디에틸 에테르로 침전시킨다. 그다음 펩티드를 미세한 필터 깔때기상에서 수거하고, 빙냉 에테르로 세척하고, 마지막으로 H<sub>2</sub>O 중 20% AcOH로 추출한다. 이어서 펩티드 추출물을 2 리터의 물로 희석하고, pH를 NH<sub>4</sub>OH로 8.0으로 조정하고, 실온에서 36시간 동안 공기 중에서 산화되도록 놓아둔다. 2:1 비의 환원형 대 산화형 글루타치온으로의 디설파이드 결합의 산화에 이어서, 펩티드 용액을 pH 2.5로 산성화시키고 라이닌 다이내믹스(Rainin Dynamax) C<sub>18</sub> 칼럼(5.0×30 cm)상에 펌핑시킨다. 시료를 0.1% TFA를 함유하는 물 중의 5 내지 30% 아세트니트릴의 선형 구배로 용출시킨다. 생성된 분획을 2가지 분석용 RP-HPLC 시스템: TFA 및 TEAP를 사용하여 분석한다. 순수한 분획을 모으고 동결건조시킨다. (문헌[Pennington, M.W., Byrnes, M. E., Zaydenberg, I., Khaytin, I., de Chastonay, J., Kraft, D., Hill, R., Mahnir, V., Volberg, W.A., Gorczyca, W. and Kern, W.R. (1995) *Int. J. Peptide Protein Res.* **46**, 354-358]을 참조한다.)

[0080]

또 다르게는, Boc-Bzl 보호기 전략을 사용하는 고체상 펩티드 합성을 이용하여 펩티드의 일차 구조 및 유사체를 조립할 수 있다. 그다음 펩티드를 무수 HF에 의해 고체상으로부터 절단하여, Fmoc 합성된 펩티드에 대해 전술한 바와 같이 즉시 폴딩될 수 있는 선형 펩티드를 수득할 수 있다. (문헌[Stewart, J. M. and Young J. D. (1984) *Solid Phase Peptide Synthesis*. 2nd Edition. Pierce Chemical Company. Rockford, IL]을 참조한다.)

[0081]

또 다르게는, ShK 또는 유사체의 일차 구조를 조립하기 위한 다른 합성 방법은 펩티드를 C-말단 티오에스테르 펩티드를 갖는 일련의 명명된 단편들로서 제조하는 화학 연결 기술을 포함할 수 있다. 티오에스테르 펩티드는 N-말단 Cys 잔기를 함유하는 또다른 펩티드와 반응하여 천연 펩티드 결합을 함유하는 펩티드를 형성할 수 있다. 이러한 기술을 사용함으로써, ShK의 일차 구조를 효과적으로 조립할 수 있다. (문헌[(4) Wilken, J. and Kent S.B.H. (1998) *Chemical protein synthesis, Current Opin. Biotech.* **9**, 412-426]을 참조한다.)

[0082]

또 다르게는, ShK의 일차 구조를 조립하기 위해 사용될 수 있는 또다른 합성 방법은 문헌[Albericio, F., Lloyd-Williams, P., and Giralt, E. (1997) *Convergent peptide synthesis; in Methods in Enzymol.* Ed G. Fields, Academic Press, New York, NY. pp 313-335]에 기재된 바와 같이 보호된 펩티드 단편 수렴 접근법을 사용하는 것일 것이다. 이러한 방법에서, 선형의 보호된 단편들은 완전히 측쇄 보호된 단편들로서 조립된다. 그다음, 이들 단편들은 수렴적 방법으로 함께 커플링되어 ShK의 일차 서열 또는 이들의 유사체들 중 하나로 조립될 수 있다. 단편들의 조립체는 또한 커플링 및 세척 단계를 촉진시키기 위해 고체상 수지를 사용할 수 있다.

[0083]

또 다르게는, ShK에 대한 cDNA 코딩 서열을 원핵세포 또는 진핵세포 발현 시스템에서의 발현을 위해 생성할 수 있는 재조합 방법을 사용할 수 있다. 비천연 아미노산을 함유하는 재조합 ShK 유사체는 또한 비-표준 코돈을 이용하는 전부하(preload) tRNA 분자를 사용함으로써 가능할 수 있다. cDNA 구조물은 이들 비사용 코돈들 중 하나를 사용하여 포스포티로신 잔기 및 Aeea 잔기를 첨가하도록 유전자조작될 수 있다. 그다음 재조합적으로 생산된 ShK 유사체의 폴딩을 합성 펩티드에서 사용된 것과 유사한 방법으로 수행할 수 있다. (문헌[Pennington, M.W., Byrnes, M. E., Zaydenberg, I., Khaytin, L de Chastonay, J., Kraft, D., Hill, R., Mahnir, V., Volberg, W.A., Gorczyca, W. and Kern, W.R. (1995) *Int. J. Peptide Protein Res.* **46**, 354-358]을 참조한다.)

[0084] *ShK에의 음이온 아미노산 잔기의 부착 및 임의적인 ShK 변형*

[0085] 음이온 아미노산 잔기는 아미노에틸옥시에틸옥시-아세틸 연결자와 같은 연결자에 의해, 또는 임의의 다른 적합한 수단들에 의해, 천연 또는 합성 ShK 독소의 N 말단에 부착될 수 있다. 이러한 예로서, 도 1에 도시된 9개의 ShK 유사체를 제조한다. 초기에, Fmoc-Aeea-OH를 전술한 바와 같이 조립된 합성 ShK 독소의 N-말단에 커플링시킨다. 그다음 수지를 9개의 분취액으로 나눈다. 그다음 Fmoc-Tyr(PO<sub>4</sub>Bzl)-OH, Fmoc-d-Tyr(PO<sub>4</sub>Bzl)-OH, Fmoc-Tyr(PO<sub>4</sub>Me<sub>2</sub>)-OH, Fmoc-Pmp-OH, Fmoc-d-Pmp-OH, Fmoc-Pmp(Et)-OH, Fmoc-Pmp(Et)<sub>2</sub>-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-OH, 또는 Fmoc-Amp(Boc)-OH를 DIC 및 HOBt를 사용하여 수지 분취액들 중 하나에 커플링시킨다. 그다음 탈블로킹된 펩티드 수지를 절단하고 5% 트리이소프로필실란을 함유하는 시약 K(King et al., 1990)로 실온에서 2시간 동안 탈보호시킨다. 고체 NH<sub>4</sub>I를 t-15분에서 절단 각테일에 첨가하여 Met(O)을 환원시킨다(Nicolas et al., 1995). Tyr(PO<sub>4</sub>Me<sub>2</sub>)-OH를 함유하는 펩티드의 경우, 소거제로서 티오아니솔을 함유하는 TFA 중의 1 M TMSBr을 함유하는 절단 각테일을 18시간 동안 4°C에서 사용하였다(Tian et al., 1993). 이러한 방법을 사용하는 경우 메틸 보호기의 불완전한 제거가 일반적이며, 2가지 화학종(Tyr(PO<sub>4</sub>) 및 Tyr(PO<sub>4</sub>Me<sub>2</sub>))은 RP-HPLC에 의해 용이하게 정제된다. 유사체를 함유하는 Tyr(PO<sub>4</sub>Me<sub>2</sub>)를 표준 시약 K 절단을 통해 절단하여 양 Me 기를 그대로 유지한다. 각 경우에서, 절단 혼합물을 여과하고 조질 펩티드를 병냉 디에틸 에테르로 침전시킨다. 침전물을 수거하여 대략 200 mg의 수지로부터 75 mg의 펩티드를 수득한다. 조질 생성물을 20 ml의 50% 수성 AcOH에 용해시키고 0.75 l H<sub>2</sub>O로 희석한다. 상기 용액의 pH는 NH<sub>4</sub>OH로 8.2로 조정하고, 하룻밤 동안 글루타치온(2 mM:1 mM) (환원형:산화형)을 첨가하여 폴딩시켰다. 모든 유사체는 이전에 기술한 RP-HPLC를 사용하여 정제하였다(Pennington et al., 1995; Pennington et al., 1996a; Pennington et al., 1996b). 순수한 분획을 모으고 동결건조시킨다. 각 시료를 RP-HPLC, AAA 및 MALDI-TOF MS로 확인하고 생물학적분석 전에 펩티드 함량을 밝히기 위해 조정한다.

[0086] 본 발명의 일부 실시태양에서, ShK 구조의 PK/PD 특성을 개선시키기 위해, 분해 특성에 민감한 잔기들을 대체하거나 치환할 수 있다. 따라서, 21번 위치에서 Met 잔기를 치환시켜 산화에 대해 안정화 효과를 부여할 수 있다. 추가로, C-말단 산 작용기를 아미드로 치환시키면 C-말단 카르복시펩티다제 효소에 대한 안정성을 제공할 것이다. N-말단에서 음이온 모이어티와 조합된 이러한 ShK의 일차 구조에 대해서 2가지 치환체를 합성하여 가장 안정하고 선택적인 Kv1.3 차단제를 생성한다. 비가수분해성 포스페이트 치환은 또한 포스페이트의 산 및 염기 가수분해에 대해 안정화 효과를 제공할 뿐만 아니라 포스파타제 효소에 대한 안정성도 부여한다. 이러한 치환을 이하에 요약한다. 사용된 두문자는 다음과 같이 정의된다: Pmp = p-포스포노메틸-페닐알라닌; Ppa = p-포스파티틸-페닐알라닌 및 Nle = 노르류신.

[0087] *치환:*

[0088] p-포스포-Tyr-Aeea-ShK-Nle21-Cys35-아미드

[0089] p-포스포노-메틸-페닐알라닌-Aeea-ShK-Nle21-Cys35-아미드(Pmp)

[0090] p-포스파티틸-Phe-Aeea-ShK-Nle21-Cys35-아미드(Ppa)

[0091] p-포스포-Tyr-Aeea-ShK-Nle21-Cys35-산

[0092] p-포스포노-메틸-페닐알라닌-Aeea-ShK-Nle21-Cys35-산(Pmp)

[0093] p-포스파티틸-Phe-Aeea-ShK-Nle21-Cys35-산(Ppa).

[0094] 비가수분해성 Pmp 및 Ppa에 추가하여, p-포스포노(디플루오로-메틸)페닐알라닌(Pfp) 및 p-포스포노-메틸케토-페닐알라닌(Pkp)의 치환도 음이온 치환이며, 이하를 제공한다:

[0095] Pfp-Aeea-Shk-Nle21 Cys35 아미드

[0096] Pkp-Aeea-ShK-Nle21-Cys35 아미드

[0097] Pfp-Aeea-Shk-Nle21 Cys35 산

[0098] Pkp-Aeea-ShK-Nle21-Cys35 산.

[0099] N-말단 치환의 구조는 부록 B에 개시되어 있다. 본 발명의 범위내에 있는 다른 구조들은 본원에 그 전체가 명백히 참고로 인용되고 그의 전체 사본이 부록 C로서 본원에 첨부된 문헌[Beeton, C. et al., 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)]에 공개되어 있다.

[0100]

본 발명의 ShK 유사체의 치료적 용도

[0101]

본 발명은 본 발명의 ShK 유사체(예를 들어, 상기 표 1에 나열된 것들을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 유사체)로 이루어지거나 이들을 포함하는 제약학적 허용되는 제조물의 치료적 유효량(예를 들어, 증상 또는 질환 진행을 감소시키거나 제거하기에 예방적이거나 효과적인 양)을 인간 또는 동물 개체에게 투여함으로써, 상기 개체에서 특정 장애들 또는 질환들, 예를 들어 T 세포 매개 질환들(예를 들어, 자가면역 질환, 이식편대숙주 질환, 기관 이식물의 거부반응의 예방 등), 다른 염증성 질환, 비만 및 2형 당뇨병을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 임의의 적합한 투여 경로(예를 들어, 경구, 직장, 정맥내, 근육내, 피하, 피내, 비내, 국소, 경점막, 경피, 약물 전달 이식물 등)를 사용할 수 있다. T 세포 매개 질환을 예방 또는 치료하기 위해 사용되는 경우, 투여량은 T 세포막상의 Kv1.3 채널을 저해하는데 충분한 것이다. 이와 관련하여, 본 발명의 ShK 유사체는 다양한 T 세포 매개 자가면역 질환을 예방하거나 치료하기 위해 사용될 가능성을 갖는다. 다음은 본 발명의 방법에 의해 예방되거나 치료될 수 있는 몇몇 T 세포 매개 자가면역 질환들의 일부 예로서, 이러한 각 질환에 의해 이론적으로 영향을 받는 표적 기관에 대하여 분류하였다.

[0102]

신경계:

[0103]

다발성 골수종, 중증근무력증, 및 길랑-바레(Guillain-Barre)와 같은 자가면역 신경병증, 및 자가면역 포도막염

[0104]

위장관:

[0105]

크론병(Crohn's disease), 궤양성 대장염, 원발성 담즙성 간경화증, 자가면역 간염, 및 치주질환 관련 골흡수

[0106]

혈액:

[0107]

자가면역 용혈빈혈, 악성빈혈, 및 자가면역 저혈소판증

[0108]

내분비계:

[0109]

1형 당뇨병, 애디슨병(Addison's disease), 그레이브병(Grave's disease), 하시모토 갑상선염, 자가면역 난소염 및 고환염

[0110]

혈관:

[0111]

관자동맥염, 항인지질증후군, 및 베게너 육아종 및 베체트병(Behcet's disease)과 같은 혈관염

[0112]

복수 기관들 및/또는 근골격계:

[0113]

류마티스 관절염(RA), 골관절염(OA), 전신성 홍반 루프스, 공피증, 다발성근염-피부근염, 및 강직척추염과 같은 척추관절염(spondyloarthropathies), 및 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome)

[0114]

피부:

[0115]

건선, 포진피부염, 심상성 천포창, 및 백반증.

[0116]

영향을 미치는 특정 기관(들)의 종류와는 무관하게, T-림프구는 자가면역 질환의 발병에 기여하는 것으로 여겨진다. 현재 이용가능한 이들 질환의 치료법은 대체로 불만족스러우며, 전형적으로 글루코코르티코이드(예를 들어, 메틸프레드니솔론, 프레드니손), 비스테로이드성 소염제, 금 염, 메토트렉세이트, 항말라리아제, 및 다른 면역억제제, 예를 들어 사이클로스포린 및 FK-506의 사용을 포함한다. 또한, 본 발명의 방법에 의해 예방되거나 치료될 수 있는 또다른 T 세포 매개 질환은 이식편대숙주 질환 및/또는 이식된 기관의 거부반응이다. 실제로, 기관 이식 절차의 결과는 조직형 검사의 정제, 수술 기술, 및 더욱 효과적인 면역억제 치료법의 개발에 따라 점차 개선되고 있다. 그러나, 이식된 기관의 거부반응은 여전히 주요 문제로 남아있다. T-림프구는 면역 반응에 중심 역할을 하며, 대부분 많은 이식된 기관의 거부반응을 담당한다. 이들은 또한 이식된 골수 세포가 MHC-불일치 숙주 조직을 인식하고 파괴하는 소위 이식편대숙주 질환을 담당한다. 따라서, T-세포 면역을 억제하는 사이클로스포린 및 FK506과 같은 약물을 사용하여 이식물 거부반응 및 이식편대숙주 질환을 예방한다. 불행하게도, 이들 T 세포 저해 약물은 독성이 있어서, 간 및 신장 독성으로 인해 용도가 제한된다. 따라서, 본 발명의 방법은 이식편대숙주 질환 또는 이식물 거부반응의 치료 또는 예방을 위해 독성이 덜한 대체요법을 제공할 수 있다. 또한, 전압 관문 Kv1.3 칼륨 채널의 저해제는 특히 이펙터 기억 T 세포를 억제하는데 효과적인 것



으로 밝혀져 있으며, 따라서 본 발명의 방법은 이펙터 기억 T 세포와 관련된 질환, 예를 들어 골흡수 및 치주질환, 건선, 류마티스 관절염, 당뇨병 및 다발성 경화증을 예방 또는 치료하는데 특히 효과적일 수 있다. T 세포 매개 질환 외에, Kv1.3 채널은 에너지 항상성, 체중 및 말초 인슐린 민감도를 조절하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 본 발명의 방법은 세포막상의 Kv1.3 채널을 저해함으로써, 비정상적인 항상성, 체중 및 말초 인슐린 민감도를 포함하는 다른 질환 및 장애를 치료하는데 사용될 수 있으며, 이러한 다른 질환 및 장애는 치주질환에서의 골흡수, 2형 당뇨병, 대사 증후군 및 비만을 포함하지만, 반드시 이들로 제한되지는 않는다.

[0117] 유량 세포분석법에서의 본 발명의 ShK 유사체의 용도

[0118] 또한, 본 발명에 따라, 유량 세포분석법에서 단독으로 또는 자가반응성 세포를 검출할 수 있는 유형 II 4량체와 함께 사용하기 위한 형광발색단 태그를 갖는 ShK(L5)의 버전을 사용하여, T 세포 매개 질환들을 진단하거나 또는 아니면 시험관내에서 다양한 세포 유형들을 분류 또는 구별하는 방법이 제공된다. 유량 세포분석법은 형광 활성화된 세포 분류법을 사용하여 유량 세포분석법에 의해 측정된 특징들에 기초하여 생세포를 선별하는, 현탁 액중의 세포를 특징분석하는 유동적 방법이다. 유량 세포분석법에 의해 측정될 수 있는 세포적 특징 및 기능들의 유형은 세포 내외에서의 단백질의 발현, DNA 함량의 유형, 생존성 및 아폽토시스(apoptosis), 다중 약물 저항성 펌프 활성, 효소 활성, T-세포 활성화, T-세포 수용체 특이성, 사이토킨 발현, 포식작용 및 산화적 과열 활성을 포함한다. 따라서, 본 발명의 이러한 방법에서, ShK에 부착된 아미노산 잔기는 유량 세포분석법에서 단독으로 또는 자가반응성 세포를 검출할 수 있는 특이적 자가항원이 로딩(loading)된 유형 II 4량체와 함께 사용하기 위해 형광발색된 태그를 포함할 수 있다. 이러한 유량 세포분석법을 수행할 수 있는 방법의 구체적인 내용은 문헌[Beeton, C., et al., 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 (March 2003)]에 기재되어 있다. 일반적으로, 유량 세포분석기는 세포가 유체 스트림으로 레이저 빔을 통과할 때 세포를 비추는 초점화된 레이저 광을 사용한다. 세포에 의해 산란된 광과 관심 세포에 부착된 형광 염료에 의해 발광된 광을 몇몇 검출기에서 분석하고 컴퓨터로 조작한다. 세포는 크기 및 형상에 따라 그리고 세포 내부 및 세포 표면상의 많은 상이한 분자들의 존재에 따라 구별하고 선택할 수 있다.

[0119] 본 발명의 ShK 유사체의 칼륨 채널 저해 효과 및 치료적 용도의 예

[0120] ShK는 대략 동등한 효능으로 뉴런의 Kv1.1, 채널 및 Kv1.3 채널을 차단한다. 따라서, 혈액-뇌-장벽이 손상되어 Kv1.1 채널을 차단하기에 충분한 양의 ShK의 도입을 허용하는 경우에 신경독성이 문제가 된다. Kv1.3-특이적 저해제를 고안하는 본 출원인들의 전략은 ShK의 N-말단에 대해 20Å-길이의 Aeea 연결자를 통해 부착된 플루오레세인-6-카르복실레이트(F6CA)를 함유하는 ShK-F6CA가 Kv1.1에 비해 Kv1.3에 대해 80배의 선택성을 나타냈다는 본 출원인들의 발견에 의해 유도되었다 (Beeton et al., 2003). F6CA는 제한된 카르복실레이트 또는 또한 환화된 락톤으로서 존재할 수 있기 때문에, ShK-F6CA의 Kv1.3에 대한 특이성이 F6CA의 음전하, 이러한 거대한 벌키(bulky) 플루오레세인 핵에 의해 생성된 소수성, 잠재적인 평면 -p 전자적 스택킹(stack), 또는 이들 잠재적인 모든 기여원인들의 조합에서 기인하였는지 여부가 명확하지 않았다. 이들 가능성들의 차이를 구별하고 비-형광 Kv1.3-선택적 저해제를 개발할 의도로, 본 출원인들은 이들 상호작용의 일부를 탐색하기 위해 일련의 12개의 신규한 N-말단-치환된 ShK를 제조하였다. ShK의 N-말단에 Aeea 연결자를 통해 티로신, 페닐알라닌 또는 이들의 유사체(다양한 전하, 크기 및 소수성을 가짐)를 부착시킴으로써, 본 출원인들은 전하와 소수성의 효과를 탐색하여 F6CA 치환에서 보여진 본 출원인들의 선택성 강화를 파악할 수 있다.

[0121] Kv1.1 저해에 대한 선택적인 KV/v1.3 저해

[0122] 도 2A 내지 2D에 도시된 예들에서, L-포스포티로신(L-pTyr), 즉 음전하(순전하 2) 후-해독적으로 변형된 방향족 아미노산을 AEEA 연결자를 통해 ShK-Arg<sup>1</sup>에 부착시켜 신규한 유사체 ShK(L5)를 생성하였다. ShK 독소 및 ShK(L5)를 L929 세포에서 발현된 Kv1.3 및 Kv1.1 채널상에서 시험하였다. 도 2B는 80 mV 내지 40 mV의 유지 전위에서 200 ms 탈분극 펄스(pulse)에 의해 유도된 Kv1.3 및 Kv1.1 전류에 대한 ShK 및 ShK(L5)의 영향을 도시한 것이다. 양 펄스들은 둘다 1의 힐(Hill) 계수로 투여량-의존적 방식으로 Kv1.3 및 Kv1.1을 가역적으로 차단하였다. K<sub>d</sub>s는 마이크로칼 오리진(Microcal Origin) 소프트웨어를 사용하여 도시된 투여량-반응 곡선으로부터 측정하였다. ShK는 예상한 바와 같이 대략 동등한 효능으로 Kv1.3 (K<sub>d</sub> = 10 ± 1 pM) 및 Kv1.1 (K<sub>d</sub> = 28 ± 6 pM)을 차단하였다(도 1C). 대조적으로, ShK(L5)는 Kv1.1 (K<sub>d</sub> = 7.4 ± 0.8 nM)에 비해 Kv1.3 (K<sub>d</sub> = 69 ± 5 pM)에 대해 100배 더 민감하였다(도 1B, 1C). ShK(L5)에 의한 Kv1.3 전류 차단 시간 경과 및 그의 위시아웃은 도 1D에 도시되어 있다. ShK(L5) 위시아웃의 시간 상수(T<sub>ON</sub>)는 131 ± 21 초(n = 7)인 반면, 펄스 위시아웃

웃의 시간 상수( $T_{OFF}$ )는  $150 \pm 28$  초( $n = 4$ )이었다.  $K_{ON}(15 \times 10^6 \pm 0.5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{초}^{-1})$  및  $K_{OFF}(0.0059 \pm 0.0013 \text{ 초}^{-1})$  수치로부터 계산된  $K_d(57 \pm 7 \text{ pM})$ 는 마이크로칼 오리진 소프트웨어로부터 결정된  $K_d(69 \pm 5 \text{ pM})$ 와 일치한다.

[0123]

다른 ShK 유사체를 또한 Kv1.3 및 Kv1.1 채널에 대해 시험하였다. D-포스포티로신(D-pTyr) 함유 ShK(D5)는 Kv1.1에 비해 Kv1.3에 대해 35배 더 선택적이었지만, ShK(L5)에 비해 효능 크기 차수는 더 낮았다. L-pTyr-모노메틸을 함유하는 ShK(L6)는 온건한 (11배) Kv1.3 선택성을 나타내었지만, L-pTyr-디메틸 또는 L-Tyr을 함유하는 ShK 유사체는 Kv1.1에 비해 Kv1.3에 대해 더 선택적이지 않았다. 페닐알라닌 또는 그의 유도체를 함유한 유사체(다양한 벌크, p 전자 밀도 및 전하를 가짐)는 Kv1.1에 비해 Kv1.3에 대해 약하게 특이적이거나 전혀 특이적이지 않았다. Kv1.1에 비해 Kv1.3에 대한 ShK(L5)의 100배 특이성은 ShK-F6CA(80배), ShK(D5)(35배), ShK-Dap<sup>22</sup>(33배) 또는 임의의 다른 시험된 ShK 유사체에 비해 더 크다.

[0124]

본 출원인은 또한 20개의 이온 채널의 패널에 대한 ShK(L5)의 특이성을 분석하고 이러한 데이터를 하기 표 2에 요약하였다.

**표 2**

채널	ShK(L5)의 $K_d$ [pM]
Kv1.1	7,000 ± 1,000
Kv1.2	48,000 ± 7,000
Kv1.3 (클로닝됨)	69 ± 5
Kv1.3 (천연)	76 ± 8
Kv1.4	137,000 ± 3,000
Kv1.5	100,000 효과 없음
Kv1.6	18,000 ± 3,000
Kv1.7	100,000 효과 없음
Kv2.1	100,000 효과 없음
Kv3.1	100,000 효과 없음
Kv3.2	20,000 ± 2,000
Kir2.1	100,000 효과 없음
Kv11.1 (HERG)	100,000 효과 없음
KCa1.1	100,000 효과 없음
KCa2.1	100,000 효과 없음
KCa2.3	100,000 효과 없음
KCa3.1	115,000 ± 5,000
Nav1.2	100,000 효과 없음
Nav1.4	100,000 효과 없음
평균-활성화된 T 세포 Cl- 채널	100,000 효과 없음
Cav1.2	100,000 효과 없음

[0125]

[0126]

상기 표 2의 데이터로부터 예상할 수 있는 바와 같이, ShK(L5)는 클로닝된 채널에 대한  $K_d(69 \text{ pM})$ 와 동등한  $K_d(76 \text{ pM})$ 로 T 세포내 Kv1.3 채널을 차단하였다. ShK(L5)는 Kv1.1에 비해서는 100배, Kv1.6에 비해서는 260배, Kv3.2에 비해서는 280배, Kv1.2에 비해서는 680배 및 모든 다른 시험된 채널들에 비해서는 >1000배로 Kv1.3에 대해 선택적이었다. 중요하게는, ShK(L5)는 인간 천연 및 T<sub>CM</sub> 세포의 활성화를 조절하는 칼슘-활성화 K<sup>+</sup> 채널인 KCa3.1에 비해 1600배 더 Kv1.3에 선택적이었다(Wulff et al., 2003). 천연 ShK는 ShK(L5)보다 덜 선택적이었다. ShK는 Kv1.1 ( $K_d 28 \pm 6 \text{ pM}$ )에 비해서는 2.8배, Kv1.6( $200 \pm 20 \text{ pM}$ )에 비해서는 20배, Kv3.2( $K_d = 5,000 \pm 1,000 \text{ pM}$ )에 비해서는 500배, 및 Kv1.2( $10 \pm 1 \text{ nM}$ ) 및 KCa3.1( $K_d = 28 \pm 3 \text{ nM}$ )에 비해서는 >1000배 더 Kv1.3( $K_d = 10 \pm 1 \text{ pM}$ )에 대해 선택적이었다. 특이적 Kv1.3 저해제로서 알려져 있는 전갈 독액으로부터의 펩티드인 마르가톡신(Koo et al., 1997; Lin et al., 1993; Middleton et al., 2003)도 또한 특이적이지 않았다. 이것은 Kv1.2( $K_d = 520 \pm 1 \text{ pM}$ )에 비해서는 5배, Kv1.1( $10 \pm 1 \text{ nM}$ )에 비해서는 9배 및 Kv1.6 및 Kv3.2( $K_d > 100 \text{ nM}$ )에 비해서는 >1000배 더 Kv1.3( $110 \pm 12 \text{ pM}$ )에 대해 선택적이었다. Kv1.3 저해제인 점에 기초하여 자가면역 질환에 대해 시판중인(www.lutimax.com) 기능식품인 루테올린(Lahey and Rajadhyaksha, 2004)은 Kv1.3을 약하게 차단하였고( $K_d = 65 \pm 5 \text{ mM}$ ), Kv1.1( $K_d = 77 \pm 5 \text{ mM}$ ), Kv1.2( $K_d = 63 \pm 4 \text{ mM}$ ) 또는 Kv1.5( $K_d = 41 \pm 3 \text{ mM}$ )에 대해 선택성을 나타내지 않았다. ShK(L5)는 Kv1.3에 대한 정교한 특이성 및 채널에 대한 피코몰 친화성을 가짐에 따라 잠재적으로 매력적인 면역억제제이다.

[0127] 인간 T<sub>EM</sub> 세포 증식의 우선적 억제

[0128] 도 3A 내지 3D를 참조하여, ShK(L5)의 시험관내 면역억제 활성을 평가하기 위해, 본 출원인들은 인간 T<sub>EM</sub> 세포주 대 천연 및 T<sub>CM</sub> 세포의 혼합물을 함유하는 인간 PBMC의 항-CD3 항체-자극된 증식을 억제하는 능력을 비교하였다. 유량 세포분석법은 연구된 2가지 집단들의 세포 표면 표현형을 확인하였다. 도 3A에 도시된 바와 같이, T<sub>EM</sub> 세포주는 >90% CCR7<sup>-</sup>CD45RA<sup>+</sup>인 반면, 도 3B에 도시된 바와 같이, PBMC는 65% CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>(천연) 및 18% CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup>(T<sub>CM</sub>) 세포를 함유하였다. 도 3C는 ShK(L5) 및 ShK가 PBMC(IC<sub>50</sub> = 5 nM, p < 0.05)에 비해 T<sub>EM</sub> 세포(IC<sub>50</sub> = 약 80 pM)의 증식을 억제하는데 있어서 60배 더 효과적임을 보여준다. PBMC의 더 낮은 민감도는 이전에 보고된 바와 같이 자극시 천연 및 T<sub>CM</sub> 세포에서의 KCa3.1 채널의 급속한 상향조절로 설명될 수 있다(Ghanshani et al., 2000; Wulff et al., 2003). 이러한 해석과 일치하게, 도 3D의 위 화살표로 나타낸 바와 같이, 48시간 동안 활성화되어 KCa3.1 발현을 상향조절한 후, 12시간 동안 휴지기에 있고, 다시 항-CD3 항체로 재활성화된 PBMC는 ShK(L5) 차단작용에 대해 완전히 저항성이었다. 초회 자극 동안 ShK(L5)에 의해 억제된 PBMC는 세포를 세척하고 휴지기에 있고 다시 항-CD3 항체로 재접종하였을 때 ShK(L5)에 대해 동일한 저항성을 나타내었다. 이러한 결과는 천연 및 T<sub>CM</sub> 세포가 KCa3.1 채널을 상향조절함으로써 Kv1.3 저해제를 피함을 나타내는 이전 연구를 확인시켜 준다. 따라서, ShK(L5)는 우선적으로 지속적으로 T<sub>EM</sub> 세포의 증식을 억제한다.

[0129] 랫트 T<sub>EM</sub> 세포 증식의 우선적 억제

[0130] ShK(L5)의 치료 효과를 평가하기 위한 전제로서, 본 출원인들은 래트에서 MS-유사 질환을 일으키는 기억 T 세포주, PAS의 증식을 억제하는 능력을 조사하였다. 대조군으로서, 본 출원인들은 래트의 지라 T 세포를 사용하였다. 2가지 세포 집단의 분화 상태를 확인하기 위해, 본 출원인들은 천연 T 세포의 마커인 CD45RC의 발현을 평가하였다(Bunce and Bell, 1997). 래트 지라 T 세포는 76% CD45RC<sup>+</sup>(즉, 주로 천연 세포)인 반면, PAS 세포는 CD45RC<sup>-</sup>이었는데, 이는 이들이 도 4A에 도시된 바와 같이 기억 세포들임을 암시한다. PAS 세포가 T<sub>EM</sub>-상태 또는 T<sub>CM</sub>-상태인지 여부를 결정하기 위해, 본 출원인들은 활성화하기 이전 및 활성화후 48시간에 Kv1.3 발현을 조사하였다. T<sub>CM</sub> 세포가 아니라 T<sub>EM</sub> 세포가 자극시 Kv1.3 수준을 상당히 상향조절할 것으로 예상된다. 도 4B를 참조하면, 막전압고정법 실험에서 PAS 세포의 MBP-자극 후의 Kv1.3 전류에서의 놀라운 증가가 나타났는데, 이는 이들이 T<sub>EM</sub> 세포인 사실과 일치한다. PAS 세포에 대한 Kv1.3 채널의 수의 독립적인 척도로서, 본 출원인들은 이전에 Kv1.3에 특이적으로 결합하는 것으로 보고되어 온 형광 표지된 ShK 유사체인 ShK-F6CA를 사용하였다. 유량 세포분석법에 의해 측정된 ShK-F6CA 착색의 강도는 세포 표면에서 발현된 Kv1.3 4량체의 수를 반영한다. 도 4C에서 알 수 있는 바와 같이, ShK-F6CA (10 nM) 착색 강도는 PAS 세포의 MBP-활성화에 따라 증가하였으며, 과량의 비표지된 ShK(L5)(100 nM)는 ShK-F6CA 착색을 경쟁적으로 저해하였다. 최종 시험으로, 본 출원인들은 고정되고 Kv1.3-특이적 항체로 착색된 정지 및 MBP-자극된 PAS 세포에 대해 공초점 현미경검사를 수행하였다. 도 4B 및 도 4C에서의 자료와 일치하게, 휴지기 PAS T 세포는 4.4 ± 0.6의 Kv1.3 착색 강도를 가졌으며, 이 수치는 항원-유도된 활성화 후에 10.6 ± 2.3 (p < 0.005)으로 증가하였는데(도 4D 참조), 이는 활성화 이후에 Kv1.3 단백질 발현의 증대를 보여준다. 따라서, MBP-활성화 PAS 세포는 CD45RC<sup>-</sup> Kv1.3<sup>hi</sup> T<sub>EM</sub> 세포인 반면, 본 출원인들의 실험에 사용된 래트 지라 T 세포는 주로 천연 상태로 존재한다.

[0131] PAS 세포의 MBP-유발된 증식은 래트 지라 T 세포의 유사분열물질-유도성 증식(도 4E 참조, IC<sub>50</sub> 약 100 nM; p < 0.05)에 비해 약 1000배 더욱 효과적으로 ShK(L5) 및 ShK(IC<sub>50</sub> = 약 80 pM)를 억제하였다. 이러한 결과는 상기 인간 T 세포에서의 발견을 확인시켜 준다. 도 4G에서 볼 수 있는 바와 같이, ShK(L5)는 PAS 세포에 의해 MBP-유도된 IL2 생산을 저해하였으며(도 4F), 외인성 IL2는 부분적으로 PAS 세포 증식의 ShK(L5) 억제를 무효화시켰다(도 4G). 초기 연구들은 인간, 래트 및 미니 돼지 T 세포에 대해 덜 특이적인 Kv1.3 채널들을 사용하여 유사한 발견을 보고하였다. 요약하면, ShK(L5)는 인간 및 래트 T<sub>EM</sub> 세포의 강력한 선택적 저해제이며, 따라서 자가면역 질환들의 발병기전에 기여하는 T<sub>EM</sub> 세포를 우선적으로 표적화함으로써 이들 질환에서 치료적 용도를 가질 수 있다.

- [0132] 순환 반감기 및 안정성
- [0133] 막전위 고정 생물학적 분석법을 사용하여 피하 주사 후 ShK(L5)의 순환 수준이 T<sub>EM</sub> 세포를 저해하는데 충분한지 여부를 확인하였다. 이러한 실험 결과는 도 5A 내지 5F에 도시되어 있다.
- [0134] ShK(L5)-시험 래트 및 대조군 래트로부터의 혈청 시료를 Kv1.3 채널에 대한 차단 활성화에 대해 시험하였다. 대조군 혈청은 검출가능한 차단 활성을 나타내지 않았는데, 이는 내인성 채널 차단제의 부재를 나타내는 것이다. 분석법을 표준화하기 위해, 공지된 양의 ShK(L5)를 래트 혈청에 첨가하고 이들 시료를 Kv1.3 채널에 대해 시험하였다. 스파이크된(spiked) 혈청 시료는 투여량-의존적 방식으로 Kv1.3 전류를 차단하였는데(K<sub>d</sub> 77 ± 9 pM), 이는 혈청 부재시의 ShK(L5)의 효과와 구별할 수 없었다(도 4A). 처리된 동물에서의 ShK(L5)의 수준은 표준 곡선과 비교하여 측정하였다. ShK(L5)는 200 mg/kg의 단일 피하 주사 후 5분 이내에 혈청에서 검출가능하였다. 피크 수준(12 nM)은 30분 이내에 도달한 후, 420분에 걸쳐 약 300 pM의 기본수준으로 떨어졌다. 혈액으로부터의 ShK(L5)의 소실은 단일 지수에 의해 정합될 수 있었다. 순환 반감기는 약 50분으로 추정되었다.
- [0135] 200 mg/kg 후의 피크 혈청 수준(12 nM)은 Kv1.3 채널 및 T<sub>EM</sub> 세포 기능의 선택적 차단에 대한 요구조건을 크게 초과하기 때문에, 본 출원인들은 더 낮은 투여량을 시험하였다. 10 mg/kg을 단일 주사한 후에, ShK(L5)의 피크 혈청 농도는 30분 이내에 약 500 pM에 도달하였는데(테이타는 도시되지 않음), 이는 Kv1.3을 >90%로 차단하기에 충분하지만 Kv1.1에는 영향을 미치지 않는 농도이다. 이 투여량의 반복된 1일 투여(10 mg/kg/일)는 약 300 pM의 정상상태 수준을 제공하였는데(주사 후 24시간에 측정함, 도 5D), 이는 천연/T<sub>EM</sub> 세포에는 거의 영향을 미치지 않으면서 T<sub>EM</sub> 세포의 60 내지 70% 억제를 야기하기에 충분하다. "정상상태" 수준은 약 50분의 추정된 순환 반감기를 볼 때 예상해낼 수 없는 것으로, 이는 ShK(L5)가 반복된 투여에서 "축적"됨을 시사하는 것이다. "테포"가 피부에 존재하는지 또는 체내 다른 부분에 존재하는지 여부를 결정하기 위해, 본 출원인들은 래트에게 10 mg/kg의 ShK(L5)를 단일 정맥내 또는 피하로 주사한 후 10시간에 ShK(L5)의 혈중 수준을 측정하였다. 상기 펩티드는 양 경로에 의해 투여한 후 동일한 시간 경과로 소실되었는데(도 5E), 이는 피부가 단일 10 mg/kg/일 주사 후에 도달한 300 pM ShK(L5)의 정상상태 수준을 담당하는 것이 아니며(도 5D), 테포가 다른 장소에 존재함을 나타낸다.
- [0136] 10mg/kg/일의 1일 단일 주사 후에 300 pM ShK(L5)의 정상상태 수준을 성공적으로 달성하였다는 사실은 상기 펩티드가 생체내에서 안정할 수 있다는 점을 암시한다. 그의 안정성을 직접 조사하기 위해, 본 출원인들은 래트 혈장 또는 2% 래트 혈장을 함유하는 PBS중에서 ShK(L5)를 37°C에서 다양한 기간 동안 항온처리한 후, Kv1.3 차단 활성을 측정하였다. 스파이크된 시료의 양 세트(set)(혈청 및 PBS)에서, 본 출원인들은 약 5시간 후에 Kv1.3-차단 활성의 50% 감소를 관찰하였는데, 이는 아마도 시험관의 플라스틱 표면에서의 펩티드 결합에서 기인하는 것으로 보이며, 그 후 상기 수준은 다음 2일간 정상상태로 유지되었다(도 5F). 안정성의 추가 시험으로, 본 출원인들은 ShK(L5)-처리 래트로부터의 혈청의 Kv1.3-차단 활성 대 Kv1.1-차단 활성을 비교하였다. ShK(L5)가 pTyr의 탈인산화에 의해 또는 Aeea-pTyr 측쇄의 절단에 의해 생체내에서 변형되는 경우, 이는 각각 Kv1.1에 비해 Kv1.3에 대해 선택적이지 않은 ShK(L4) 및 ShK를 제공할 것이다. ShK(L5)-처리 동물로부터의 혈청 시료는 ShK(L5)와 같이 Kv1.1에 비해 Kv1.3에 대해 동일한 선택성을 나타내었으며, 이는 상기 펩티드가 전술한 바와 같이 변형되지 않음을 시사한다. 이들 결과를 함께 조합하면, ShK(L5)가 혈장중에서 상당히 안정하며 10 mg/kg의 단일 1일 피하 주사 후에 약리학적으로 적절한 혈청 농도로 유지됨을 나타내는 것이다.
- [0137] 비독성
- [0138] 본 출원인들은 ShK(L5)가 독성을 나타내는지 확인하기 위해 몇가지 시험관내 및 생체내 시험을 수행하였다. 이들 연구의 결과를 부록 A에 요약하였다. 인간 및 래트의 림프계 세포를 최소 세포독성을 나타내는 Kv1.3 절반-차단 투여량 또는 T<sub>EM</sub> 억제에 대한 IC<sub>50</sub>(70 내지 80 pM)보다 >1200배 더 큰 농도(100 nM)의 ShK(L5)로 48시간 동안 항온처리하였다. ShK(L5)의 동일한 고농도는 시험 균주 TA97A에 대한 에임스 시험에서 음성이었는데, 이는 상기 펩티드가 돌연변이원이 아님을 제시한다. 양 시험관내 시험 둘다에서 임의의 상당한 독성을 검출하는데 실패하였다.
- [0139] Kv11.1 (HERG) 채널의 약물-유도성 차단은 주요한 심장 독성에 기여하여 시중으로부터 몇가지 의약품의 회수를 초래하여 왔다. ShK(L5)는 100 nM(Kv1.3에 대해 >1430배 K<sub>d</sub>)에서 Kv11.1 채널에 대해 어떠한 영향도 미치지 않았으며, 본 출원인들이 선택한 치료 요법(10 mg/kg/일, 300 pM 정상상태 순환 수준)은 따라서 심장독성을 일으키지 않을 것이다. 추가 시험으로서, 본 출원인들은 1일째에 비히클(PBS + 2% 래트 혈청) 및 이후 2일째에 10



mg/kg/일 ShK(L5)가 투여된 의식이 있는 래트에서 심장박동수 변동성 분석을 수행하였다. ShK(L5)는 심장박동수나 시간 및 박동수 도메인 둘다에서의 표준 HRV(심장박동수 변동성) 파라미터에 어떠한 영향도 미치지 않았다 (Task force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing Electrophysiology, 1996).

[0140] 상기 단기 독성 시험에 힘입어, 본 출원인들은 래트에게 2주간 10mg/kg ShK(L5) 또는 비히클을 1일 피하 주사로 투여한(각 군에서 n = 6) 중기 독성 연구를 수행하였다. ShK(L5)-처리 동물은 비히클을 투여받은 래트와 동일한 정도로 체중이 증가하였다(부록 A). 혈액학적 및 혈액 화학적 분석결과 ShK(L5)-처리 및 비히클-처리 래트 사이에 어떠한 차이점도 보이지 않았으며, 유량 세포분석법으로 분석한 결과 흉선세포 또는 림프구 아집단들의 비율에서 전혀 차이가 없었다(부록 A). 총괄적으로, 이들 연구는 ShK(L5)가 안전함을 제시한다.

[0141] 치료적 안전성 지수를 확인하기 위해, 본 출원인들은 건강한 래트에게 5일간 60배 고 투여량(600 mg/kg/일)의 ShK(L5)를 투여하였으나, 어떠한 독성의 임상적 증후도 관찰되지 않았으며, 건강한 래트에게 1000 mg/kg ShK(L5)를 단일 주사한 경우에도 전혀 독성이 보이지 않았다. EAE 및 MS에서 나타나는 바와 같이 혈액-뇌-장벽이 손상되는 경우에는 상기한 상황은 덜 낙관적이다. 10일간 10 mg/kg/일을 투여받은 EAE 래트에서는 어떠한 독성의 증후도 보이지 않았다. 이와 대조적으로, 이들에서 EAE의 임상적 증후가 나타났을 때 5일간 600 mg/kg/일을 투여받은 래트는 이들의 40%(5/12)가 5일째에 죽었다(외삽 LD<sub>50</sub> = 750 mg/kg/일). 200 mg/kg의 단일 주사 후 혈청 중의 ShK(L5)의 피크 농도(12 nM)는 Kv1.1 채널의 >50%를 차단하기에 충분하기 때문에, 600 mg/kg/일 ShK(L5)가 투여된 EAE 래트에서 관찰되는 독성은 Kv1.1을 차단하기에 충분한 양의 ShK(L5)가 뇌로 유입되었기 때문인 것 같다. 따라서, ShK(L5)의 치료적 유효 안전성 지수는 혈액-뇌 장벽이 손상되지 않은 경우(중추신경계(CNS)에는 영향을 미치지 않는 자가면역질환에서 볼 수 있는 바와 같이)에서는 100의 과량에서도 양호하였으나, 혈액-뇌 장벽이 갈라진 경우에는 치료적 안전성 지수는 75이다.

[0142] DTH 및 급성 입양 EAE의 예방

[0143] 도 6A 내지 6C를 참조하여, ShK(L5)를 2마리의 동물 모델에서 생체내에서 면역억제 활성화에 대해 평가하였다. 본 출원인들은 루이스(Lewis) 래트로의 MBP-활성화된 PAS T<sub>EM</sub> 세포의 전달에 의해 유도된 급성 EAE를 예방 및 치료하기 위한 능력 및 T<sub>EM</sub> 세포에 의해 매개된 DTH 반응을 억제하기 위한 능력을 시험하였다. PAS 세포를 48시간 동안 시험관내에서 MBP로 활성화시킨 후, 루이스 래트로 입양전달하였다(6 내지 8 x 10<sup>6</sup> 생세포). 예방 시도를 위해, 래트에게 5일간 식염수(대조군) 또는 ShK(L5)(10 µg/kg/일)를 피하 주사하였다. 첫번째 예방 시도에서, 대조군 래트는 평균 5.6 ± 0.6일의 발병으로 온건한 EAE(평균 최대 임상 점수 2.0 ± 1.2)를 나타내었다(도시되지 않음). ShK(L5)는 질환 중증도를 감소시켰다(평균 최대 임상 점수 0.7 ± 0.6, p < 0.05). 두번째 예방 시도에서, 대조군 래트는 평균 4.8 ± 0.4일의 발병으로 더욱 심각한 EAE(평균 최대 임상 점수 3.2 ± 0.4)를 나타내었다(도 6A). ShK(L5)는 질환 중증도를 상당히 감소시켰지만(평균 최대 임상 점수 0.6 ± 0.4, p < 0.007), 질환 발병을 상당히 지연시키지는 않았다(5.5 ± 0.7일; p = 0.07). 이들 연구에서는 어떠한 독성 증후도 보이지 않았다.

[0144] 치료 시도(도 6B)에서는, 래트에게 MBP-활성화 PAS 세포를 주입하고, 이들이 최초로 EAE의 발병 증후들(늘어난 꼬리, 구부정한 자세 및 24시간에 걸쳐 체중의 6% 이상의 감소)을 나타내었을 때 식염수 또는 10 µg/kg/일 ShK(L5)를 투여하였으며, 치료법을 3일간 계속하였다. EAE의 임상적 증후는 대조군에서는 6일째에 최고에 도달하였고(점수 = 3.9 ± 0.7) 처리군에서는 7일째에 도달하였다(점수 = 1.9 ± 0.9; p < 0.05).

[0145] ShK(L5)의 생체내 면역억제 활성화의 독립적 평가법으로서, 본 출원인들은 또한 피부-각질화 T<sub>EM</sub> 세포에 의해 주로 매개되는 DTH 반응을 저해하는데 있어서의 효과를 조사하였다. 난백알부민 및 보조제로 면역화된 루이스 래트를 7일 후에 한쪽 귀에 난백알부민을 접종하고 다른 쪽 귀에는 식염수를 접종하였다. 그다음 래트에게 식염수(대조군) 또는 ShK(L5)(10 µg/kg/일)를 주사하고, 귀 두께를 DTH의 지표로서 측정하였다. 모든 대조군 래트는 난백알부민 접종 후 24 및 48시간에 귀 팽윤을 나타낸 반면, DTH 반응은 ShK(L5)-처리 동물에서 상당히 더 약했다(도 6C). 따라서, ShK(L5)는 T<sub>EM</sub>-매개 DTH 반응을 저해하며, 미엘린-활성화 T<sub>EM</sub> 세포에 의해 유도된 심각한 입양 EAE를 완화시킨다.

[0146] Kv1.3은 항원 제시 동안 IS에서 밀집하지만, Kv1.3을 통한 K<sup>+</sup> 유출은 IS 형성 또는 안정성에 필요하지 않다.

[0147] 도 7A 내지 7G를 참조하면, 고도로 선택적인 Kv1.3 저해제(21)인 ShK(L5)는 72 ± 3 pM의 K<sub>d</sub>로 GAD65-특이적

$T_{EM}$  세포에서의 Kv1.3 전류를 차단하였다. 본 출원인들은 Kv1.3 작용을 요구하는  $T_{EM}$  세포 활성화에서의 단계들을 정의하기 위한 제약학적 탐침으로서 ShK(L5)를 사용하였다. 생화학적 연구는 Kv1.3 및 Kvb2가 SAP97 (시냅스-관련-단백질-97), ZIP(PKC-제타-상호작용-단백질, p56<sup>lck</sup>-관련-p62-단백질, A170), p56<sup>lck</sup> 및 CD4를 포함하는 신호전달 복합체에 속함을 보여준다(도 7B). 인간  $T_{EM}$  세포에서의 이러한 복합체의 존재는 Kv1.3, Kvb2, SAP97, ZIP 및 p56<sup>lck</sup>와 CD4의 공동-캡핑(capping)을 보여주는 본 출원인들의 결과에 의해 지지된다. 또한, FRET(형광 에너지 전달) 연구는 Kv1.3-형질감염된 인간 T 세포에서 CD3에 매우 근접한 Kv1.3을 보여주며, 이 채널은 Kv1.3-형질감염된 인간 세포독성 T 세포와 이들의 표적 사이의 접촉 지점에서 우선적으로 편재한다. CD4는 T 세포와 항원 제시 세포(APC) 사이의 접촉 대역인 IS에 교섭하기 때문에, 신호전달 복합체에서 Kv1.3 및 다른 단백질은 또한 항원-제시 동안 IS에 편재할 수 있다. 이러한 생각을 시험하기 위해, T1DM 환자로부터의 GAD65-특이적 Kv1.3<sup>3</sup>  $T_{EM}$  클론을 GAD65 557I 펩티드로 로딩되고 가시화를 보조하기 위해 DAPI로 착색된 HLA-불일치 APC와 함께 항온처리하였다. 20분 후에, APC- $T_{EM}$  컨주게이트(conjugate)를 신호전달 복합체내 단백질에 대해서 면역착색(immunostaining)하였다. CD4는 IS에서 Kv1.3, Kvb2, SAP97, ZIP 및 p56<sup>lck</sup>와 함께 공동-편재하였다. APC- $T_{EM}$  접촉의 부재하에, CD4 및 Kv1.3은 세포 전체에 분포하였다. 또한, CD4 및 Kv1.3은 GAD65-특이적  $T_{EM}$  세포가 MBP(비관련 항원)로 로딩된 APC에 노출되었을 때 접촉 지점에 편재하지 않았는데, 이는 IS-밀집화가 항원-특이적임을 확인시켜준다. 따라서, GAD65-특이적  $T_{EM}$  세포에서, Kv1.3-함유 신호전달 복합체는 CD4와 함께 항원-제시 동안 IS와 교섭하였는데, 이는 Kv1.3이  $T_{EM}$  세포에서의 신호를 변환하는 기계의 통합 성분임을 제시한다. 이러한 연구에 기초하여, Kv1.3-채널의 대략 99%를 차단하는 농도(100 nM)의 ShK(L5)는 IS-밀집화를 방해하지 않았으며 일단 형성된 IS를 파괴하지 않았는데, 이는 Kv1.3 채널을 통한 K<sup>+</sup> 유출이 IS 형성이나 안정성에 불필요함을 나타내는 것이다.

[0148] 인간  $T_{EM}$  세포의 억제

[0149] 도 8A 내지 8E를 참조하면, ShK(L5)는 T 세포 활성화의 초기 및 필수 단계인  $T_{EM}$  세포에서의 칼슘 신호전달을 저해하였다. T1DM 환자로부터의 GAD65-특이적  $T_{EM}$  클론을 칼슘 지시자 염료 Fluo3으로 로딩하고, 배지 단독에서 또는 증가된 농도의 ShK(L5)와 함께 예비-항온처리하였으며, 활성화 항-CD3 항체 및 가교결합 이차 항체를 첨가하기 전후에 유량 세포분석법으로 영상화하였다. 피크 칼슘 증가는 자극후 242 ± 35 초에서 나타났으며, 약 200 pM의 IC<sub>50</sub>으로 ShK(L5)에 의해 차단되었다(도 8A). ShK(L5)는 T1DM 및 RA 환자 유래의 자가반응성  $T_{EM}$  세포에 의한 [<sup>3</sup>H]-티미딘-혼입을 억제하는데 있어서 이들 환자 유래의 천연/ $T_{CM}$  세포에 비해 10배 더 효과적이었다(도 8B, 좌측). 두번째 세트의 실험(도 8B, 우측)에서는, RA-SF 및 RA-PB T 세포를 48시간 동안 항-CD3 항체로 활성화시켜 각각 " $T_{EM}$ -이펙터" 및 "천연/ $T_{CM}$ -이펙터"를 생성하였다. 세포를 배지에서 하룻밤 동안 휴지기에 두고, 추가로 48시간 동안 ShK(L5)의 존재 또는 부재하에 항-CD3 항체로 재자극하였으며, [<sup>3</sup>H]-티미딘-혼입률을 측정하였다. RA-SF- $T_{EM}$ -이펙터는 ShK(L5) 저해에 대한 이들의 민감성을 유지하였지만, RA-PB-천연/ $T_{CM}$ -이펙터는 Kv1.3 차단에 저항성이었는데(도 8B, 우측), 이는 가장 근접하게는 이들이 칼슘 도입을 촉진시키는데 있어서 Kv1.3을 치환하는 칼슘-활성화 KCa3.1/IKCa1 채널을 상향조절하기 때문인 것 같다. ShK(L5)는 T1DM 및 RA 환자 유래의  $T_{EM}$  세포에 의한 인터류킨 2(IL2) 및 인터페론-γ(IFN-γ)의 생산을 상당히 억제한 반면, 이들 환자 유래의 천연/ $T_{CM}$  세포에 의한 IL2 및 IFN-γ 생산은 덜 영향을 받았다(도 8C).  $T_{EM}$  세포 및 천연/ $T_{CM}$  세포 둘다에 의한 종양괴사인자-α 및 인터류킨 4의 생산은 ShK(L5)에 대해 덜 민감하였다(도 8C).

[0150] 이펙터 기억 T 세포에 의해 유발된 지연형 과민반응(DTH)의 래트 모델의 확인

[0151] 도 9에 도시된 바와 같이, 래트를 보조제 중의 난백알부민(OVA)으로 면역화시켰다. 이들은 7일 이후에 한쪽 귀에 OVA를 접종하였고 다른 한쪽 귀에는 식염수를 접종하였다. 귀 팽윤을 지연형 과민반응(DTH)의 증후로서 24시간 후에 측정하였다. 도 9에 도시한 FACS 막대 그래프는 OVA로 접종된 귀에서의 T 세포가 CD45RC-음성 기억 세포인 반면, 동일 래트의 혈액 및 지라에서의 T 세포는 대부분 천연 T 세포임을 보여준다.

[0152] 이펙터 기억 T 세포에 의해 유발된 지연형 과민반응(DTH)의 래트 모델에서의 ShK(L5)의 치료 프로토콜

- [0153] 도 10에 도시된 바와 같이, 천연 세포의 이펙터 기억 T<sub>EM</sub> 세포로의 분화를 방해하기 위해 래트에게 0일째 내지 7일째(프라이밍(priming) 시기 동안)에 피하 주사로 ShK(L5) 10 μg/kg/일을 투여하거나, 또는 T<sub>EM</sub> 세포의 기능을 방해하기 위해 난백알부민을 귀에 접종한 후의 이펙터 시기 동안 래트에게 피하 주사로 ShK(L5) 10 μg/kg/일을 투여하였다.
- [0154] ShK(L5)는 천연 및 증양 기억 T 세포 또는 B 세포의 기능을 손상시키지 않으면서 래트에서 생체내 이펙터 기억 반응을 특이적으로 억제한다.
- [0155] 도 11에 도시된 바와 같이, 대조군 래트는 귀 팽윤, 즉 양성 DTH 반응을 나타내었다. ShkK(L5)는 프라이밍 시기 동안 투여되었을 때에는 DTH를 억제하는데 효과적이지 않았는데, 이는 이것이 천연 및 증양 기억 T 세포의 이펙터 기억 세포로의 분화를 억제하지 않았음을 나타낸다. ShK(L5)는 이펙터 시기 동안 투여되었을 때 DTH를 억제하였으며, 이는 이것이 이펙터 기억 T 세포가 귀에 도달하는 능력을 방해하고/하거나 이펙터 기억 T 세포의 활성화를 억제하였음을 지시한다. 첫번째 가능성은 ShK(L5)-처리 래트의 귀에서의 T 세포의 수가 비히클이 투여된 래트의 귀에서의 수와 동일하였기 때문에 제외하였다. ShK(L5)는 귀에서의 T 세포가 Kv1.3-음성인 반면 비히클-처리 동물의 귀에서의 기억 T 세포는 Kv1.3 양성이었기 때문에 귀에서 이펙터 기억 T 세포 활성화를 억제하였다. 이들 동물에서의 IgM 및 IgG B-세포 반응도 영향을 받지 않았다.
- [0156] T1DM 또는 MS 환자 및 건강한 대조군 유래의 GAD65/555-567, 인슐/9-23- 및 미엘린 항원에 대해 특이적인 T 세포에서의 Kv1.3 발현
- [0157] 도 12A는 신규 발병 1형 당뇨병 환자, 건강한 대조군 및 다발성 경화증 환자 유래의 항원-특이적 T 세포로부터의 Kv1.3 전류(위) 및 채널수/세포(아래)를 도시한 것이다. 각 데이터-점은 세번째 항원 제시 후 48시간에 측정된 단일 공여자로부터의 2 내지 4개의 T 세포주 유래의 20 내지 50개 세포의 평균 ± SEM(표준 오차)을 나타낸다. T1DM 환자 및 대조군의 혈액 중의 인슐린 및 GAD65에 대해 특이적인 T 세포의 낮은 빈도에 기인하여, 본 출원인들은 이들 집단들을 분할-웰(well) 방법을 사용하여 단기 자가항원-특이적 CD4<sup>+</sup> T 세포를 생성함으로써 증폭시켰다. 대조군으로서, 본 출원인들은 MS에는 관련되지만 T1DM에는 관련되지 않은 비관련 자가항원 미엘린 염기성 단백질(MBP)에 특이적인 T 세포주를 생성하였다. 세번째 항원 자극 후에, 4 pF보다 더 큰 막 용량을 갖는 활성화된 세포(세포 직경 > 11 μm)에서 전세포 막전압고정법에 의해 Kv1.3 전류를 측정하였다. 대표적인 Kv1.3 전류 및 Kv1.3 채널수/T 세포는 도 12A에 도시되어 있다. 상기 전류는 Kv1.3의 특징적인 생물리학적 및 약리학적 특성을 나타내었다. 신규 발병 T1DM 환자 유래의 인슐린(9-23) 또는 GAD65(555-567)에 특이적인 T 세포는 큰 Kv1.3 전류를 나타내었고 많은 수의 Kv1.3 채널을 발현한 반면, 이들 환자 유래의 질환-비관련 MBP-특이적 T 세포는 Kv1.3<sup>지</sup>이었다(p = 0.001). 비교를 위해, 본 출원인들은 반대 패턴이 관찰되었던 MS 환자에 대해 본 출원인들의 공개된 Kv1.3 데이터를 플로팅(plotting)하였다. MS 환자에서, MBP 또는 미엘린 희소돌기아교세포 당단백질(펩티드 35-55) 또는 단백질질 단백질(펩티드 139-151)에 특이적인 T 세포는 Kv1.3<sup>지</sup>이었던 반면, 인슐린- 및 GAD65-특이적 T 세포는 Kv1.3<sup>지</sup>이었다(p = 0.0001). 건강한 대조군으로부터 분리된 자가반응성 T 세포는 특이성과 관계없이 Kv1.3<sup>지</sup>이었다. MS 및 T1DM 둘다를 가진 한 개체에서, 3가지 자가항원 모두에 특이적인 T 세포는 Kv1.3<sup>지</sup>이었다. 장기간 T1DM 환자에서 유래한 GAD65-특이적 및 인슐린-특이적 T 세포는 자가반응성 T<sub>EM</sub> 세포의 지속을 반영하는 Kv1.3<sup>지</sup>이었지만, 비-자가면역 2형 DM을 갖는 환자로부터 유래한 GAD65- 및 인슐린-특이적 T 세포에서는 Kv1.3<sup>지</sup> 패턴이 발견되었다. 도 12B에서, Kv1.3 착색(위) 및 개개 세포의 형광세기(아래)를 도시하였다. 본 출원인들은 Kv1.3에 대한 면역착색에 의해 막전압고정법 데이터를 확인하였다. T1DM 환자 유래의 인슐린- 및 GAD65-특이적 T 세포 및 MS 환자 유래의 MBP-특이적 T 세포는 밝게 착색되었지만, 비관련 자가항원에 특이적인 세포는 어렵게 착색되었다. 도 12C는 CCR7 발현을 보여준다. 유량 세포분석법은 Kv1.3<sup>지</sup> T 세포가 CCR7<sup>-</sup> T<sub>EM</sub> 세포인 반면, Kv1.3<sup>지</sup> 세포는 CCR7<sup>+</sup> 천연 또는 T<sub>EM</sub> 세포이었음을 보여주었다. 도 12D는 T1DM 및 MS 둘다를 갖는 환자, 및 T1DM 또는 2형 DM 환자 유래의 자가반응성 T 세포에서의 각각 5년 및 2년 초과 동안의 Kv1.3 수/세포를 도시한 것이다. 도 12E는 신규 발병 T1DM 환자 유래의 CD4<sup>+</sup>GAD65-4량체<sup>+</sup> T 세포에서의 Kv1.3 수를 도시한 것이다. 추가의 대조군으로서, 본 출원인들은 GAD65 557I 펩티드를 함유하는 형광 MHC 유형 II 4량체를 사용하여 신규 발병 T1DM을 갖는 DR-0401-양성 환자로부터 GAD65-특이적 CD4<sup>+</sup> T 세포를 분리하였다. 4량체-분류된 GAD65-활성화 T 세포는 T1DM 환자 유래의 GAD65-특이적 T 세포에서 관찰된 바와 동일

한 Kv1.3<sup>hi</sup> 패턴을 나타내었다. 요약하면, T1DM 및 MS 둘다에서의 질환-관련된, 자가항원-활성화 T 세포는 Kv1.3<sup>hi</sup> CCR7<sup>-</sup> T<sub>EM</sub>-이펙터인 반면, 이들 환자에서의 질환-비관련 자가반응성 세포는 Kv1.3<sup>hi</sup> CCR7<sup>+</sup> 천연/T<sub>CM</sub> 세포이다.

[0158]

**류마티스 관절염 및 골관절염에서의 Kv1.3 발현**

[0159]

RA에서, 질환-관련 T 세포를 발병한 관절로부터 단리하였다. 본 출원인들은 7명의 RA 환자의 윤활액(SF)으로부터 항-CD3 항체로 자극한지 48시간 후에 T 세포를 막전압고정하였다. 도 13A에 도시된 바와 같이, 대조군으로서, 본 출원인들은 (동일한 프로토콜로 활성화된) 퇴행성, 비-자가면역 골관절염(OA)을 앓는 7명의 환자로부터 SF-T 세포를 분석하였다. RA-SF T 세포는 Kv1.3<sup>hi</sup>인 반면, OA-SF T 세포는 Kv1.3<sup>lo</sup>이었다(p < 0.0001). 본 출원인들은 자가반응성 Kv1.3<sup>hi</sup> T<sub>EM</sub> 세포가 혈액에 드물게 존재하기 때문에 RA 환자의 말초혈액(PB)으로부터의 항-CD3-활성화 T 세포에서 Kv1.3<sup>hi</sup> 패턴을 발견하였다(p < 0.0001). Kv1.3 및 그의 결합된 Kvβ2 서브유닛(subunit)에 대한 면역착색으로부터 막전압고정법 데이터를 확인하였다. 도 13B는 Kv1.3(도면에서 도시된 바와 같이 밝은 회색) 및 Kvβ2(도면에 도시된 바와 같이 더 어두움) 착색의 공초점 영상을 나타낸 것이다. RA-SF T 세포는 Kv1.3 및 Kvβ2 둘다에 대해 밝게 착색되었지만, OA-SF 및 RA-PB T 세포들은 약한 착색을 나타내었다. 도 13C는 CCR7 발현을 도시한다. 유량 세포분석법으로부터 Kv1.3<sup>hi</sup> RA-SF T 세포는 CCR7<sup>-</sup> T<sub>EM</sub> 세포이었지만, Kv1.3<sup>lo</sup> OA-SF 및 RA-PB T 세포는 CCR7<sup>+</sup> 천연/T<sub>CM</sub> 세포이었음을 확인하였다. 도 13D(위)는 항-CD3 또는 항-Kv1.3 항체로 착색되고 헤마톡실린/에오신으로 역-착색된 RA 및 OA 환자의 활막의 현미경사진을 나타낸 것이다(40X). 추가의 시험으로서, 본 출원인들은 5명의 RA 및 5명의 OA 환자 유래의 파라핀-삽입된 윤활 조직(ST)을 CD3, Kv1.3 및 CCR7에 대해 면역착색하였다. 본 출원인들은 이전에 본 출원인들의 착색 방법이 천연/T<sub>CM</sub> 세포에서는 이들이 낮은 수의 Kv1.3 채널을 갖기 때문에 Kv1.3을 검출하지 않음을 밝혔다. RA-ST에서, CD3<sup>+</sup>Kv1.3<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup> T<sub>EM</sub> 세포의 우세가 관찰되었지만, CD3<sup>+</sup> 세포는 OV-활막에서 희박하였으며, 이들은 주로 Kv1.3<sup>-</sup> CCR7<sup>+</sup> 천연/T<sub>CM</sub> 세포이었다. CD3<sup>+</sup>, Kv1.3<sup>+</sup> 및 CCR7<sup>+</sup> 세포에 의한 침입 정도는 도 S2A에서의 구배 시스템에 의해 분석하였다. CD3<sup>+</sup>-염증 지수: RA = 3.2 ± 0.1; OA = 1.1 ± 0.2 (p<0.01); Kv1.3<sup>+</sup>-염증-지수: RA = 2.8 ± 0.3; OA = 0.6 ± 0.3 (p<0.01). 따라서, 3가지 상이한 자가면역 질환들에서, 본 출원인들의 결과는 질환-관련 자가반응성 T 세포가 Kv1.3<sup>hi</sup> CCR7<sup>-</sup> T<sub>EM</sub> 세포-이펙터인 점과 일치한다.

[0160]

본 발명은 본 발명의 특정 예 또는 실시태양을 참조하여 본원에 기술되었지만, 본 발명의 의도된 요지 및 범주로부터 벗어나지 않는 한, 이들 예 또는 실시태양에 대해 다양한 부가, 결실, 변경 및 변화가 이루어질 수 있음이 이해될 것이다. 예를 들어, 한 실시태양 또는 예의 임의의 요소 또는 특징은 이들을 또다른 실시태양 또는 예에 혼입시키거나 이들과 함께 사용하는 것이 이러한 실시태양 또는 예들 그의 의도된 용도에 부적합하게 만들지 않는 한, 상기한 혼입 또는 병용이 이루어질 수 있다. 또한, 방법 또는 절차의 단계들이 특정한 순서로 나열 또는 기술되는 경우, 이들 단계들의 순서는 달리 지시되지 않는 한, 또는 단계 순서의 변화가 본 발명을 특허받을 수 없게 하거나 그의 의도된 용도에 부적합하게 만들지 않는 한, 바뀔 수 있다. 모든 합리적인 부가, 결실, 변형 및 변경들은 상기 예 및 실시태양의 균등물로 간주되며 하기 청구의 범위내에 포함되어야 한다.

부록 A : ShK(L5)의 독성 연구

시험관내 시험		100 nM ShK(L5)	
세포독성(% 사멸 세포율)			
인간 PBMCs		7.5 ± 4.3	
PAS T 세포		8.1 ± 0.8	
위트켓 세포		5.5 ± 3.3	
버킷 림프종		3.1 ± 0.9	
RPMI 8226 골수종		6.5 ± 2.1	
에이스 시험		음성	
단기 생체내 시험		식염수	ShK(L5) 10 µg/kg
심전도 *			
심장 박동수	302 ± 13		311 ± 20
SDNN	13.3 ± 3.0		17.8 ± 4.4
CV%	6.7 ± 1.4		9.2 ± 2.2
SDANN <sub>5min</sub>	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
중기 생체내 시험		식염수	ShK(L5) 10 µg/kg/일 2주간
체중 증가율 (%)		7.2 ± 1.8	6.2 ± 1.7
전혈구 계산치			
적혈구 용적율 (%)	40.3 ± 1.4		39.0 ± 4.9
헤모글로빈 (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
총 백혈구 (x10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	7.1 ± 2.1		7.1 ± 2.5
총 적혈구 (x10 <sup>6</sup> mm <sup>-3</sup> )	8.3 ± 0.3		8.1 ± 1.0
총 혈소판 (x10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	656 ± 214		606 ± 106
혈액 화학			
알칼리 포스파타제 (U/l)	170 ± 26		150 ± 18
글루코스 (mg/dl)	139 ± 21		150 ± 18
혈중 우레아 질소 (mg/dl)	17.1 ± 2.6		15.0 ± 1.7
크레아티닌 (mg/dl)	0.6 ± 0		0.6 ± 0.1
알부민 (g/dl)	5.0 ± 0.3		4.5 ± 0.4
가슴샘 세포 집단 (%)			
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	3.6 ± 1.1		4.3 ± 0.7
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	77.8 ± 6.1		76.8 ± 4.1
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	8.5 ± 1.7		11.2 ± 2.0
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	10.0 ± 3.3		7.6 ± 1.3
CD3 <sup>+</sup>	89.5 ± 1.6		93.2 ± 3.5
지라 집단 (%)			
CD3 <sup>+</sup>	72.4 ± 4.4		65.4 ± 0.1
CD3 <sup>+</sup> CD45RC <sup>+</sup>	35.6 ± 2.6		39.8 ± 1.1
CD3 <sup>+</sup> CD45RC <sup>-</sup>	23.6 ± 2.3		26.5 ± 1.3
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	62.7 ± 0.1		66.6 ± 1.2
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	26.9 ± 0.1		25.0 ± 0.2
IgM <sup>+</sup>	38.8 ± 1.5		33.3 ± 0.3

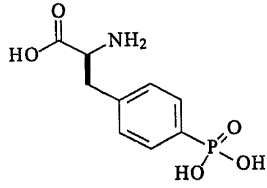
[0161]

[0162]

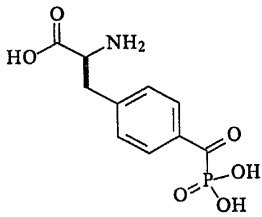
데이터는 평균 ± SD(표준편차)로 표시하였다. \*t-검정으로 시험됨, 모든 파라미터에 대해 p < 0.05; SDNN: 모든 정상-대-정상 RR 간격의 표준편차; CV%: 100 x SDNN/평균 RR 간격; SDANN<sub>5분</sub>: 각각 5분의 기간 동안의 정상 RR 간격의 평균의 표준편차; rMSSD: 연속 차이의 제곱근평균제곱; HF(n.u.): 정규화 단위에서의 고주파수(0.75 내지 2.5 Hz) 힘; LF(n.u.): 정규화 단위에서의 저주파수(0.2 내지 0.75 Hz) 힘.



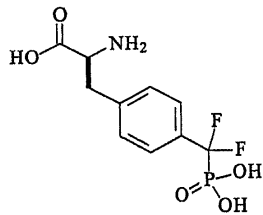
부록 B



*L-p*-포스포노페닐알라닌 (PPA)



*L-p*-포스포노메타노페닐알라닌 (PM(=O)PA)  
(*L-p*-케토포스포노페닐알라닌 (KPP))



*L-p*-포스포노디플루오로메틸-페닐알라닌 (PM(f2)PA)  
(*L-p*-디플루오로메틸포스포노페닐알라닌)

[0163]

[0164]

0026-895X/05/6704\_1369\_1381\$20.00

[0165]

MOLECULAR PHARMACOLOGY

[0166]

저작권 © 2005 The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics

[0167]

*Mol Pharmacol* **67**:1369-1381, 2005

[0168]

Vol. 67, No. 4

[0169]

8293/1198130

[0170]

미국에서 인쇄됨.

[0171]

[0172]

자가면역 질환의 치료를 위한 Kv1.3 채널의 선택적 펩티드 저해제에 의한 이펙터 기억 T 세포의 표적화 (Targeting Effector Memory T Cells with a Selective Peptide Inhibitor of Kv1.3 Channels for Therapy of Autoimmune Diseases)

[0173]

Christine Beeton, Michael W. Pennington, Heike Wulff, Satendra Singh, Daniel Nugent, George Crossley,

Ilya Khaytin, Peter A. Calabresi, Chao-Yin Chen, George A. Gutman, and K. George Chandy

[0174] 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.); and Department of Pathology, Johns Hopkins Hospital, Baltimore, Maryland (P.A.C.)

[0175] 2004년 10월 13일에 접수함; 2005년 1월 21일에 수리함.

[0176] -----

[0177] **초록**

[0178] 전압-관문 Kv1.3 K<sup>+</sup> 채널은 자가면역 질환의 발병기전을 담당하는 자가반응성 이펙터 기억 T(T<sub>EM</sub>) 세포의 면역조절을 위한 신규 표적이다. 본 저자들은 말미잘 스티코닥틸라 헬리안투스 유래의 펩티드 ShK의 N 말단에 대해 9개 원자의 친수성 연결자를 통해 연결된 L-포스포티로신을 함유하는 신규 펩티드 ShK(L5)의 특징분석을 기술한다. ShK(L5)는 Kv1.1에 비해 Kv1.3에 대해 100배 특이성을 나타내고(K<sub>d</sub> = 69 pM) 시험된 다른 모든 채널들에 비해 250배 초과 선택성을 갖는 고도로 특이적인 Kv1.3 차단제이다. ShK(L5)는 인간 및 래트의 T<sub>EM</sub> 세포의 증식을 억제하고 피코몰 농도에서 인터류킨-2 생산을 저해한다. 천연 및 중앙 기억 인간 T 세포는 초기에는 ShK(L5)에 대해 T<sub>EM</sub> 세포보다 60배 덜 민감하고, 그후 칼슘-활성화 KCa3.1 채널을 상향조절함으로써 활성화 동안 상기 펩티드에 저항성으로 된다. ShK(L5)는 포유동물 세포주에 대해 시험관내 세포독성을 나타내지 않으며, 에임스 시험에서 음성이다. 이는 혈장중에서 안정하며, 피하 주사로 1일 1회 투여시(10 μg/kg) 약 300 pM의 "정상상태" 혈중 수준을 유지한다. 이러한 요법은 연속 EKG 관측으로 평가시 심장 독성을 야기하지 않으며, 2주 치료법 후에 임상 화학적 및 혈액학적 파라미터를 변형시키지 않는다. ShK(L5)는 래트에서 실험적 자가면역 뇌척수염을 예방 및 치료하며, 지연형 과민반응을 억제한다. ShK(L5)는 자가면역 질환들의 치료법에 유용한 것으로 증명될 수 있다.

[0179] -----

[0180] 본 논문은 국립 다발성 골수종 협회(H.W., K.G.C., P.A.C., M.W.P.에게), 미국국립보건원(K.G.C.에게 승인 NS048252), 관절염 국립 연구 기관(C.B.에게)으로부터의 승인, 및 국립 다발성 골수종 협회로부터의 박사후 협력(C.B.에게)에 의해 지지되었다.

[0181] C.B. 및 M.P.는 동일하게 본 논문에 기여하였다.

[0182] 논문, 공개일, 및 인용 정보는 <http://molpharm.aspetjournals.org>에서 찾아볼 수 있다.

[0183] doi:10.1124/mol.104.008193.

[0184] -----

[0185] **약어:** MS, 다발성 골수종; T<sub>EM</sub>, 이펙터 기억 T 세포 아집단; T<sub>CM</sub>, 중앙 기억 T 세포 아집단; EAE, 실험적 자가면역 뇌척수염; DTH, 지연형 과민반응; KCa3.1, 중간-전도도 Ca<sup>2+</sup>-활성화 K<sup>+</sup> 채널; K<sub>v</sub>, 전압-관문 K<sup>+</sup> 채널; ShK, 스티코닥틸라 헬리안투스 독소; Fmoc, 9-플루오레닐메톡시카르보닐; Pmp, p-포스포노메틸-페닐알라닌; Aeea, 아미노-에틸옥시-에틸옥시-아세트산; HEK, 인간 태생신; HERG, 인간 에테르-a-go-go-관련 유전자; PBMC, 말초혈액 단핵 세포; IL2, 인터류킨 2; PBS, 포스페이트-완충 식염수; MBP, 미엘린 염기성 단백질; F6CA, 플루오레세인-6-카복실; L-pTyr, L-포스포티로신; CP-339818, 1-벤질-4-페닐이미노-1,4-디하이드로퀴놀린; UK-78287, 4-[디페닐메톡시]메틸]-1-[3-(4-메톡시페닐)프로필]-피페리딘; WIN-17317, 1-벤질-7-클로로-4-n-프로필이미노-1,4-디하이드로퀴놀린 하이드로클로라이드.

[0186] -----

[0187] 자가면역 질환은 전세계 수백만 사람들이 갖고 있으며 통상적인 병원성 메커니즘을 갖는다. 발병기전은 휴지기 질환-특이적 자가반응성 T 세포 - 예를 들어 다발성 골수종(MS) 환자에서의 미엘린-특이적 T 세포 -의 분자적

의태 메카니즘 또는 다른 미확인된 메카니즘에 의한 "각성"을 포함할 수 있다. 일단 각성되면, 자가반응성 T 세포는 반복된 자가항원 자극의 결과로 천연 상태에서부터 연속적으로 활성화된 기억 T 세포로 분화하여 조직으로 급속히 이동하여 염증성 사이토킨을 분비하고 즉시 이펙터 기능을 나타냄으로써 염증성 손상에 기여할 수 있다 (Sallusto et al., 1999). 몇가지 일련의 증거는 이러한 반응식을 지지한다. 첫째로, MS 환자로부터의 대부분의 미엘린-특이적 T 세포는 공동자극-무관 활성화 이펙터 기억 T( $T_{EM}$ )이다(Lovett-Racke et al., 1988; Scholz et al., 1998; Markovic-Plese et al., 2001; Wulff et al., 2003). 둘째로, 미엘린-특이적  $T_{EM}$  세포의 천연 래트 수용자로서의 전달은 MS의 모델인 실험적 자가면역 뇌척수염(EAE)을 유도한다(Beeton et al., 2001b). 셋째로, 질환-관련 자가항원 글루탐산 데카르복실라제 65에 특이적인 1형 당뇨병을 갖는 환자 유래의 T 세포는 연속적으로 활성화된 기억 세포이다(Viglietta et al., 2002). 마지막으로, 류마티스 관절염을 갖는 환자의 활막 및 건선을 갖는 환자의 피부 병소에서의 T 세포의 대부분은  $T_{EM}$  세포이며, 지연형 과민반응(DTH)을 야기하는 T 세포도 마찬가지로(Ezawa et al., 1997; Fredrich et al., 2000; Soler et al., 2003). 기억 B 세포, 특히 유형-전환  $CD27^+ IgD^-$  아집단에 속하는 것들도 또한 아마도 많은 자가면역 질환의 발병기전에 기여할 것이다(Iglesias et al., 2001; O'Connor et al., 2001; Corcione et al., 2004).  $T_{EM}$  및 유형-전환 기억 B 세포를 다른 림프구 아집단들의 활성을 손상시키지 않으면서 표적으로 하는 치료법은 따라서 급성 면역 반응을 손상시키지 않으면서 자가면역 질환을 갖는 환자에서 병원성 세포를 표적으로 할 것이다.

[0188]

$T_{EM}$  및 유형-전환 기억 B 세포의 면역조절을 위한 기존의 신규한 치료 표적은 전압-관문  $Kv1.3 K^+$  채널이다.  $T_{EM}$  세포는 활성화시  $Kv1.3$ 을 상향조절하며, 이들의 항원-유도된 증식은  $Kv1.3$  차단제에 정교하게 민감하다(Wulff et al., 2003). 대조적으로 천연 및  $T_{CM}$  세포는 처음에는  $Kv1.3$  차단제에 상당히 덜 민감하며 칼슘-활성화  $K^+$  채널  $KCa3.1$ 을 상향조절함으로써  $Kv1.3$  차단에 대해 저항성으로 된다(Wulff et al., 2003; Chandy et al., 2004). T 세포와 같이 B 세포는 이들이 천연 상태에서부터 유형-전환  $CD27^+ IgD^-$  기억 B 세포로 분화됨에 따라  $KCa3.1$ 로부터  $Kv1.3$ 으로 칼륨 채널 의존성을 변화시킨다(Wulff et al., 2004).  $Kv1.3$  차단제는 천연 및  $CD27^+ IgD^-$  기억 B 세포에 영향을 미치지 않으면서 이들 세포의 증식을 저해한다.  $Kv1.3$  차단제로  $T_{EM}$  세포 및 유형-전환 기억 B 세포를 표적화함으로써, 면역 반응의 벌크를 손상시키지 않으면서 자가면역 질환을 경감시킬 수 있을 것이다.  $Kv1.3$ 의 기능적으로 제한된 조직 분포, 및 생체내에서 동물 모델에서  $Kv1.3$  차단이 명백한 부작용을 일으키지 않으면서 EAE, 치주질환에서의 골흡수, 및 DTH를 완화시킨다는 사실은 치료 표적으로서  $Kv1.3$ 의 매력을 증대시킨다(Koo et al., 1997; Beeton et al., 2001b; Valverde et al., 2004).  $Kv1.3$  차단제가 모든 활성화된  $T_{EM}$ (예를 들어, 백신 항원에 특이적인  $T_{EM}$  세포) 및 유형-전환 기억 B 세포를 억제할 것이지만,  $Kv1.3$ -기재 치료법은 전체 면역계를 광범위하게 무차별적으로 억제하는 현재 치료법에 비해 상당한 개선책일 것이다.  $Kv1.3$  차단제의 추가의 이점은 이들이 가역적이라는 것이다. 따라서, 효과를 진정시키는데 수개월이 걸리는 화학요법적 또는 표적화된 단일클론 항체 요법과는 달리,  $Kv1.3$  차단제는 필요에 따라 그의 치료 효과를 적정하고 감염증에 직면하면 치료법을 중지할 수 있다.

[0189]

광범위한 노력에도 불구하고,  $Kv1.3$  채널의 선택적이고 강력한 저해제는 개발되어 있지 않다(Chandy et al., 2004). 대부분의 강력한  $Kv1.3$  저해제는 카리브해 말미잘 스티코닥틸라 헬리안투스 유래의 펩티드 ShK이다(Pennington et al., 1995). ShK는  $Kv1.3$ 를 차단하고( $K_d$  = 약 10 pM), 피코몰 농도로  $T_{EM}$  세포의 증식을 억제하며(Wulff et al., 2003), EAE를 개선시킨다(Beeton et al., 2001b). ShK의 잠재적인 단점은 뉴런  $Kv1.1$  채널에 대한 친화성이다( $K_d$ , 28 pM)(Kalman et al., 1998). EAE에서의 ShK 시도에서 어떠한 부작용도 관찰되지 않았지만(Beeton et al., 2001b), 고농도 ShK의 뇌로의 진입은 원하지 않는 신경독성을 유도할 수 있다. 코레올리트, 트랜스-PAC, CP-339818, UK-78282, 프소라-4, 마르가톡신 및 루테올린을 비롯한 다른 저해제는  $Kv1.3$ 에 대해 덜 선택적이다(Chandy et al., 2004). 따라서 더욱 선택적인 ShK 유도체의 개발이 필요하다.

[0190]

본 저자들은 피코몰 친화성으로  $Kv1.3$ 을 차단하고  $Kv1.1$  및 다른 채널들에 비해  $Kv1.3$ 에 대해 100배 초과 선택성을 나타내는 ShK의 합성 유사체인 ShK(L5)를 개발하였다. 선택성은 ShK-Arg<sup>1</sup>에 대해 친수성 연결자를 통해 음전하를 띠는 L-포스포티로신(L-p티로신)을 부착시킴으로써 달성하였다. ShK(L5)는 천연 및  $T_{CM}$  세포의 기능을 손상시키지 않으면서 피코몰 농도에서 시험관내에서  $T_{EM}$  세포를 억제하였다. 생체내 연구에서의 개념 검증에서, ShK(L5)는 미엘린-특이적  $T_{EM}$  세포의 천연 래트 수용자로서의 전달에 의해 유발된 EAE를 개선시켰으며, 또한  $T_{EM}$



세포에 의해 유발된 DTH 반응을 억제하였다. ShK(L5)는 다발성 골수종 및 다른 T 및 B 세포-매개 자가면역 질환에 대한 치료법으로서의 용도를 가질 수 있다.

[0191] **재료 및 방법**

[0192] **ShK 유사체의 합성.** Fmoc-Pmp 유사체를 위해, Fmoc-Pmp-(에틸)<sub>2</sub>-OH를 환류하에 수성 6N HCl로 처리하여 에틸 보호기를 제거하였다. 16시간 후에, 백색 고체가 침전되어 나왔고, 이를 이어서 여과에 의해 단리하고 세척액이 중성으로 될 때까지 물로 세척하였다(Hammerschmidt and Hanbauer, 2000). Pmp-포스포네이트로부터 에틸 보호기를 부분적으로 제거하여 Pmp, Pmp-Et, 또는 Pmp(에틸)<sub>2</sub>를 수득하였다. 노바 바이오켄(Nova Biochem)(미국 캘리포니아주 샌디에고)로부터 구입한 Fmoc-D-TyrPO<sub>3</sub> 및 켈 임팩스(Chem Impex)(미국 일리노이주 우드 데일)로부터 구입한 Fmoc-Pmp(에틸)-OH 및 Fmoc-D-Pmp(에틸)<sub>2</sub>-OH를 제외하고는, 모든 Fmoc-아미노산 유도체는 바켄 아게(Bachem AG)(수위스 부벤도르프)로부터 구입하였다. 고체상 조립체를 Fmoc-Cys(Trt)-2-클로로트리틸 수지로부터 시작하여 C-말단 Cys 잔기의 잠재적인 라세미화를 최소화시켰다(Fujiwara et al., 1994). 자동화 조립체는 ABI-431A 펩티드 합성기상에서 수행하였다(어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems), 미국 캘리포니아주 포스터 시티). Fmoc-Aeea-OH를 ShK의 조립 후에 N 말단에 커플링시켰다. 상기 수지를 9개의 분취액으로 나누었다. Fmoc-Tyr(PO<sub>3</sub>Bzl)-OH, Fmoc-D-Tyr(PO<sub>3</sub>Bzl)-OH, Fmoc-Tyr(PO<sub>3</sub>Me<sub>2</sub>)-OH, Fmoc-Pmp-OH, Fmoc-D-Pmp-OH, Fmoc-Pmp(에틸)-OH, Fmoc-Pmp(Et)<sub>2</sub>-OH, Fmoc-Tyr(3급-부틸)-OH, 또는 Fmoc-p-아미노-L-페닐알라닌(3급-부틸옥시-카르보닐)-OH를 디이소프로필카르보디이미드 및 1-하이드록시벤조트리아졸을 사용하여 상기 수지 분취액들 중 하나에 커플링시켰다. 탈블록킹된 펩티드 수지를 5% 트리이소프로필실란을 함유하는 시약 K로 실온에서 2시간 동안 절단하고 탈보호시켰다(King et al., 1990). Met(O)는 고체 NH<sub>4</sub>I를 t - 15분에서 절단 카테일에 첨가하여 환원시켰다(Nicholas et al., 1995). Tyr(PO<sub>3</sub>Me<sub>2</sub>)-OH를 함유하는 펩티드의 경우, 소거제로서 티오아니솔을 함유하는 TFA(트리플루오로아세트산) 중의 1 M 트리메틸실릴 브로마이드를 함유하는 절단 카테일을 4°C에서 18시간 동안 사용하였다(Tian et al., 1993). 메틸 보호기의 불완전한 제거는 이러한 방법을 사용할 때 통상적이며, 2가지 화학종[p-포스포티로신 및 Tyr(PO<sub>3</sub>HMe)]이 RP-HPLC에 의해 쉽게 정제되었다. Tyr(PO<sub>3</sub>Me<sub>2</sub>) 함유 유사체를 양 메틸기는 그대로 유지하면서 표준 시약 K 절단법으로 절단하였다. 각각의 경우, 절단 혼합물을 여과하고 조질 펩티드를 빙냉 디에틸 에테르에 침전시켰다. 침전물을 수거하였는데, 200 mg 수지로부터 대략 75 mg의 펩티드가 수득되었다. 조질 생성물을 20 ml의 50% 수성 AcOH에 용해시키고 0.75 l의 H<sub>2</sub>O로 희석시켰다. 용액의 pH를 NH<sub>4</sub>OH로 8.2로 조정하고, 글루타치온(2 mM : 1 mM)(환원형:산화형)을 첨가하여 하룻밤 동안 풀딩시켰다. 모든 유사체를 이전에 기재한 바와 같이 물 대 트리플루오로아세트산으로 완충화된 아세트오니트릴의 선형 구배를 사용하여 RP-HPLC를 사용하여 정제하였다(Pennington et al., 1995, 1996a,b). 순수 분획을 모으고 동결건조시켜, 각 펩티드의 트리플루오로아세테이트 염을 수득하였다. 펩티드의 순도는 95% 초과이었다. 각 시료를 역상 고성능 액체 크로마토그래피, 아미노산 분석, 및 플라이트(flight) 질량 스펙트로메트리의 매트릭스-보조된 레이저 탈착 이온화/시간에 의해 확인하고, 생물학적인 분석하기 전에 펩티드 함량을 조정하였다. ShK 및 마르가톡신을 바켄 바이오사이언시즈(Bachem Biosciences)(미국 펜실바니아주 킹 오브 프루시아)로부터 구입하였다. 루테올린은 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)(미국 미주리주 세인트 루이스)로부터 구입하였다.

[0193] **이온 채널.** 본 저자들은 본 논문에서 기재된 이온 채널들에 대해 IUPHAR 명명법을 사용하였다(Gutman et al., 2003). mKv1.1, rKv1.2, mKv1.3, hKv1.5, 및 mKv3.1을 안정하게 발현하는 세포는 이전에 기재되어 있다(Grissmer et al., 1994). 다른 포유동물 이온 채널을 안정하게 발현하는 세포주는 몇몇 공급원으로부터 공급받았다: 오로라 바이어사이언시즈 코포레이션(Aurora Biosciences Corp.)(미국 캘리포니아주 샌디에고)으로부터의 CHL 세포에서의 mKv 1.7 및 COS-7 세포에서의 hKCa2.3; 마이클 탐쿰(Michael Tamkun)(미국 콜로라도주 보울더 소재의 콜로라도 대학)으로부터의 LTK 세포에서의 hKv1.4; 짐 트리머(Jim Trimmer)(미국 캘리포니아주 데이비스 캘리포니아 대학)로부터의 HEK293 세포에서의 hKv2.1; 크레이그 재뉴어리(Craig January)(미국 위스콘신주 매디슨 소재의 위스콘신 대학)로부터의 HEK293 세포에서의 Kv11.1(HERG); 칼레드 후아메드(Khaled Houamed)(미국 일리노이주 시카고 소재의 시카고 대학)로부터의 hKCa1.1, 또는 rKCa2.1, 또는 hKCa3.1을 발현하는 HEK293 세포; 프랭크 레만-호른(Frank Lehmann-Horn)(독일 울름 대학)으로부터의 HEK-293 세포에서의 hNav1.4; 및 프란츠 호르만(Franz Hofmann)(독일 뮌헨)으로부터의 HEK-293 세포에서의 Cav1.2. RBL-2H3(Kir2.1 발현) 및 N1E-115 신경모세포종 세포(Nav1.2 발현)는 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection)(미국 버지니아주 마나사스)으로부터 구입하였다. hKv1.6 및 rKv3.2(모두 pcDNA3 중에

서)는 프로티낙 게엠베하(Protinac GmbH)(독일 함부르크)로부터 구입하였고 제조사의 프로토콜에 따라 푸젠(Fugene)-6(독일 만하임 소재의 로슈(Roche))로 COS-7 세포 일시적으로 형질감염시켰다.

[0194] **림프계세포 및 세포주.** 히스토파크(histopaque)-1077 구매(시그마-알드리치)를 사용하여 루이스 래트로부터 지라세포를 단리하고 건강한 지원자들의 혈액으로부터 인간 말초혈액 단핵세포(PBMC)를 단리하였다. 인간 미엘린 회소돌기아교세포 당단백질- 또는 파상풍 변성독소-특이적 T<sub>EM</sub> 세포를 상기 기술한 바와 같이 생성하였다(Wulff et al., 2003). 뇌염유발성 CD4<sup>+</sup> 루이스 래트 T 세포주 PAS(Beraud et al., 1993)는 이블린 베로드(Evelyne Beraud)(프랑스 마르세이유 소재의 마르세이유 대학)로부터 기증받았고, RPMI 8226 형질세포종 세포는 샤스트리 골라푸디(Shastri Gollapudi)(미국 캘리포니아주 어바인 소재의 캘리포니아 대학)로부터 기증받았다. 위르캣(Jurcat) 및 버킷(Burkitt) 세포는 아메리칸 타입 컬처 컬렉션으로부터 구입하였다.

[0195] **전기생리학적 분석법.** 막전압고정 기술의 전세포 구조로 실험을 수행하였다. K<sub>v</sub> 전류는 이전에 기재한 바와 같이 -80 내지 40 mV의 유지 전위로부터 200 ms 탈분극 펄스에 의해 야기되었다(Zhou et al., 1998; Wulff et al., 2000; Bardien-Kruger et al., 2002; Kolski-Andreaco et al., 2004; Venekamp et al., 2004). 각 채널 차단제를 여러 농도로 시험하였다. 각 농도에서 40 mV에서의 피크 전류의 측정된 감소를 사용하여 투여량-반응 곡선을 생성하고 K<sub>d</sub> 및 힐 계수를 이전에 기재된 바와 같이 오리진 소프트웨어로 결정하였다(미국 매사추세츠주 노쓰암튼 소재의 오리진랩 코포레이션(OriginLap Corp.))(Zhou et al., 1998; Wulff et al., 2000; Bardien-Kruger et al., 2002; Kolski-Andreaco et al., 2004; Venekamp et al., 2004). K<sub>d</sub>를 또한 채널 차단에 대해 온(on)(T<sub>ON</sub>) 및 오프(off)(T<sub>OFF</sub>) 속도로부터 측정하였다. 피크 Kv1.3 전류 진폭을 안정화시킨 후에, 70 pM ShK(L5)을 세포상에 관류시키고, 시간의 함수로서 플롯팅된 피크 전류 수치를 단일 지수 함수로 정합시켜 T<sub>ON</sub>을 측정하였다. 평형 차단에 도달한 후에, 무차단제 욕 용액으로 다시 관류를 전환하였다. 피크 전류를 상기한 바와 같이 플롯팅하여 T<sub>OFF</sub>를 측정하였다. K<sub>ON</sub>, K<sub>OFF</sub> 및 K<sub>d</sub>를 ShK(L5)와 Kv1.3 사이의 단순 이분자 반응으로 추정하여 계산하였다:  $K_{ON} = 1 - T_{ON} \times K_{OFF} / [T_{ON} \times \text{ShK(L5) 농도}]$ ;  $K_{OFF} = 1 / T_{OFF}$ ;  $K_d = K_{OFF} / K_{ON}$  (Peter et al., 2001). Kv11.1 채널의 경우, 전류 차단을 20 및 -50 mV(테일(tail) 전류) 둘다에서 측정하였다. Kca 채널, K<sub>ir</sub>2.1, 및 팽윤-활성화 클로라이드 전류를 위해, 본 저자들은 ShK 유사체에 의한 기울기 전도도의 변화를 측정하였고, Na<sup>+</sup> 및 Ca<sup>2+</sup> 전류를 위해, 최소 전류의 감소를 측정하였다.

[0196] **유량 세포분석법 및 형광 현미경분석법을 위한 착색.** 인간 PBMC, 래트 지라세포, 및 PAS T 세포의 T 세포 표현형을 유량 세포분석법으로 측정하였다. PBMC를 Cy-크롬에 컨주게이트된 항-CD3 항체(미국 캘리포니아주 샌디에고 소재의 BD 파르민젠(Pharmingen)), 피코에리트린에 컨주게이트된 항-CD45RA 항체, 및 플루오레세인 이소스티오시아네이트에 컨주게이트된 항-CCR7 항체(미국 미네소타주 미네아폴리스 소재의 알앤디 시스템스(R&D Systems))로 3중 착색시켰다. 래트 지라세포 및 PAS-착색된 T 세포는 Cy-크롬에 컨주게이트된 항-CD3 항체 및 플루오레세인 이소스티오시아네이트에 컨주게이트된 항-CD45RC 항체(BD 파르민젠)로 이중 착색시켰다. 착색된 세포는 FACSscan(미국 캘리포니아주 샌 조스 소재의 BD 바이오사이언시즈(Biosciences))으로 분석하였다.

[0197] 2가지 접근법을 사용하여 PAS T 세포에서의 Kv1.3 단백질 발현을 평가하였다. 첫째로, PAS 세포를 형광발색단-태그가 부착된 ShK 유사체인 ShK-F6CA(10 nM; 바켄 바이오사이언시즈, 인코포레이티드)로 착색시키고, 이전에 기재된 유량 세포분석법으로 분석하였다(Beeton et al., 2003). 경쟁 실험을 위해, PAS 세포를 10 nM의 ShK-F6CA를 첨가하기 전에 미리 과량의 비표지된 ShK(L5)(100 nM)로 항온처리하였다. 둘째로, PAS 세포를 침투시키고 항-Kv1.3 항체로 착색한 후(Koch et al., 1997)(오스트리아 인스부르크 소재의 한스-건터 나우스(Hans-Gunther Knaus)로부터의 기증), Alexa-488에 컨주게이트된 제2 항체(미국 오레곤주 유진 소재의 몰레큘라 프로브스(Molecular Probes))로 착색시켰다. 착색된 세포를 제이스(Zeiss) LSM-510 META 공초점 현미경(독일 제나 소재의 칼 제이스 게엠베하(Carl Zeiss GmbH))으로 가시화하였고, 형광 세기는 개개의 세포(n = 10 내지 15)에 대해 측정하였으며, 만-휘트니 U 시험을 사용하여 통계 분석을 수행하였다.

[0198] **기능적 연구.** 인간 및 래트 T 세포의 증식을 이전에 기술한 바와 같은 [<sup>3</sup>H]티미딘 혼입 분석법으로 측정하였다(Beeton et al., 2001a,b; Wulff et al., 2003). IL2 생산의 척도로서, PAS T 세포를 ShK 또는 ShK(L5)의 존재 또는 부재하에 8시간 동안 MBP를 활성화하고, 배양 상청액을 이전에 기술한 바와 같이 모았다(Beeton et al., 2001a). IL2를 제조사의 지시에 따라 래트 IL2 퀀티킨 키트(Quantikine kit)(알앤디 시스템스)를 사용하여 상청액 중에서 측정하였다. PAS T 세포의 증식에 대한 외인성 IL2(20 유닛/ml; 시그마-알드리치, 미국 세인트 미

주리주)의 영향을 이전에 기재된 바에 따라 측정하였다(Beeton et al., 2001a).

[0199]

**순환 반감기 측정 및 혈장 안정성.** 공지된 양의 ShK(L5)를 루이스 래트 혈청에 첨가하고, Kv1.3 채널에 대한 차단 활성을 막전압고정법에 의해 시험하여 표준 투여량-반응 곡선을 설정하였다. ShK(L5)의 단일 피하 또는 정맥내 주사 후의 다양한 시간에서 수득된 루이스 래트로부터 혈청 시료를 막전압고정법 및 이전에 기재한 바와 같은 표준 곡선으로부터 결정된 ShK(L5)의 수준에 의해 Kv1.3 차단 활성에 대해 시험하였다(Beeton et al., 2001b). 다른 실험에서, 루이스 래트는 10 µg/kg ShK(L5)의 단일 1일 주사를 투여받았고, ShK(L5)의 혈청 수준을 각각 1일 내지 5일째에 주사한 후 24시간에 측정하였다. ShK(L5)의 혈장 안정성을 측정하기 위해, 공지된 양의 ShK(L5)로 스파이크된 래트 혈장을 다양한 기간 동안 37°C에서 항온처리한 후, Kv1.3 차단 활성에 대해 시험하였다. 이들 시료에서의 잔존 ShK(L4)의 양은 표준 곡선으로부터 측정하였다.

[0200]

**세포독성 분석 및 에임스 시험.** 인간 PBMC, PAS, 워프켓, RPMI 8226 및 버킷 세포를 100 nM ShK(L5)의 존재 또는 부재하에 48시간 동안 생육시켰다. 그다음 세포를 LIVE/DEAD 생존성/세포독성 키트(몰레큘라 프로브스)로 제조사의 지시에 따라 착색시키고, 생세포와 사세포의 백분율을 형광 마이크로플레이트 판독기(CytoFluor; 미국 캘리포니아주 포스터 시티 소재의 어플라이드 바이오시스템즈)를 사용하여 측정하였다. 트리톤 X-100(0.1%)을 세포 사멸에 대해 양성 대조군으로 사용하였다. 에임스 시험을 위해, ShK(L5)의 돌연변이 유발 활성을 벨슨 래보라토리즈(Nelson Laboratories)(미국 유타주 솔트 레이크 시티)에 의해 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*) 시험 중에 대해 측정하였다.

[0201]

**심장 독성을 평가하기 위한 EKG 연구.** 이식된 EKG 전달물질을 사용하는 심전도 연구(미국 미네소타주 아르덴 힐 소재의 데이터 사이언스 인터내셔널(Data Sciences International))를 사용하여 ShK(L5) 또는 비히클을 투여받은 동물에서의 심장박동수 변동성을 분석하였다. 실험 프로토콜은 UC 데이비스의 제도적 동물 보호 및 사용 위원회에 의해 검토되고 승인되었다. 6마리의 루이스 래트(9 내지 11주령; 체중 = 219 ± 9 g)에게 케타민(80 mg/kg) 및 크실라진(7.5 mg/kg)의 혼합물을 근육내 주사하여 마취시켰다. EKG 전달물질을 각 래트의 복막강에 넣고, 2개의 EKG 도선을 우측 어깨로 그리고 흉곽에 대해 검사 공간 꼬리(xiphoid space caudal)로 피하로 터널을 만들었다. 진통제로서, 카르프로펜(5 mg/kg, 피하)을 수술 말미에 투여하였다. 수술 후 2주 후에, 본 저자들은 2시간 동안(1일째) 래트에서 기본선 EKG 기록을 수행하였다. 그다음 본 저자들은 비히클(PBS + 2% 래트 혈청)을 피하로 주사하고 계속 추가의 8시간 동안 기록하였다. 그다음 동물을 우리로 돌려보냈다. 2일째에, 본 저자들은 ShK(L5)(비히클에 용해된 10 µg/kg)를 피하로 주사한 후 2시간 동안 기본선 EKG 기록을 수행하고, EKG 기록을 추가의 8시간 동안 계속하였다. 주사 후 1.5 내지 3.5시간 동안 기록된 데이터를 사용하여 네보카르드(Nevokard) 소프트웨어(미국 노쓰 캐롤라이나주 채플 힐 소재의 바이오-임피던스 테크놀로지, 인코포레이티드(Bio-Impedance Technology, Inc.))를 사용하여 시간 및 박동수 도메인 둘다에서 표준 심장박동수 변동 파라미터-분석을 수행하였다.

[0202]

**중기 독성 연구.** 루이스 래트(9 내지 11주령; 체중, 199 ± 7 g)에게 2주간 ShK(L5) 10 µg/kg/일(n = 6) 또는 식염수(n = 6)를 피하로 주사하였다. 래트의 체중을 매일 측정하였다. 캘리포니아 대학의 비교 생물학 실험실에서, 데이비드는 2주 끝에 채취한 혈액 시료에 대해 화학적(코바스 미라 플러스(COBAS MIRA Plus); 미국 뉴저지주 브랜치부르크 소재의 로슈 다이아그노스틱 시스템즈(Roche Diagnostic Systems)) 및 혈액학적(헤마베트(HEMAVET, 등록상표) 850 멀티스피시스 헤마톨로지 어날라니저(Multispecies Hematology Analyzer); 미국 코네티컷주 옥스포드 소재의 CDC 테크놀로지스(Technologies)) 분석을 수행하였다. ShK(L5)가 주어진 6마리의 동물 및 식염수가 주어진 6마리의 동물로부터 제거된 흉선 및 지라로부터 제조된 단세포 현탁액을 다양한 T 및 B 세포 마커(BD 파르민젠)에 특이적인 항체로 착색하고 유량 세포분석법으로 분석하였다.

[0203]

**루이스 래트에서 급성 입양 EAE의 예방 및 치료 및 DTH의 예방.** 9 내지 11주령의 근친교배 암컷 루이스 래트를 하틀란-스프라그-돌리(Harlan-Sprague-Dawley)(미국 인디애나주 인디애나폴리스)로부터 구입하고, 조사된 설치류 먹이 및 산성화된 물을 임의로 섭취할 수 있는 장벽 조건하에서 사육하였다. 모든 실험은 미국국립보건원에 따라 이루어졌고 어바인 소재 캘리포니아 대학에서의 제도적 동물 보호 및 사용 위원회에 의해 승인되었다. ShK(L5)를 피하 주사를 위해 PBS + 2% 루이스 래트 혈청(식염수)에 용해시켰다. 급성 입양 EAE를 이전에 기재된 바와 같이 6 내지 8 x 10<sup>6</sup> 미엘린 염기성 단백질(MBP)-활성화 PAS 세포로 유도하였다(Beeton et al., 2001a, b). MBP를 이전에 기재된 바와 같이(Deibler et al., 1972) 냉동된 기니아 피그 척수(미국 인디애나주 인디애나폴리스 소재의 하틀란 바이오프로덕츠(Harlan Bioproducts))로부터 추출하였다. 래트의 체중을 매일 측정하고 1일 2회씩 EAE의 임상적 증후에 대해 관찰하였다. 예방 시도를 위해, 래트에게 0일째 내지 5일째에 10 µg/kg/일의 ShK(L5)를 투여하였고, 대조군에게는 식염수를 투여하였다. 치료 시도를 위해서는, 10 µg/kg/일의

ShK(L5) 또는 식염수의 투여를 질병이 발병한 후에 개시하고(래트는 늘어진 꼬리를 가졌고, 구부정하였으며, 24 시간에 걸쳐 6% 이상 체중이 빠졌다), 3일간 계속하였다.

[0204]

DTH 시도를 위해서는, 루이스 래트들을 완전한 프로인트(Freund) 보조제(미국 미시간주 디트로이트 소재의 디프코(Difco)) 중의 난백단백질의 유화액으로 면역화시켰다. 7일 후에, 상기 래트들에게 식염수에 용해된 난백단백질을 한쪽 귀의 귓바퀴에 주사하였고, 다른 한쪽 귀에는 식염수를 주사하였다. 그다음 래트에게 ShK(L5)(10 µg/kg/일) 또는 비히클(PBS + 2% 루이스 래트 혈청)을 피하로 주사하였다. 귀 팽윤을 24시간 및 48시간 후에 스프링-로딩된 마이크로미터(spring-loaded micrometer)(미국 워싱턴주 스포칸 소재의 미투토요(Mitutoyo))를 사용하여 측정하였다.

[0205]

**결과**

[0206]

**Kv1.1에 비해 Kv1.3에 대해 100배 선택성을 나타내는 신규한 ShK 유사체인 ShK(L5).** ShK는 대략 동등한 효능으로 뉴런의 Kv1.1, 채널 및 Kv1.3 채널을 차단한다. 따라서, 혈액-뇌-장벽이 손상되어 Kv1.1 채널을 차단하기에 충분한 양의 ShK의 도입을 허용하는 경우에 신경독성이 문제가 된다. Kv1.3-특이적 저해제를 고안하는 본 저자들의 전략은 ShK의 N-말단에 대해 20Å-길이의 Aeea 연결자를 통해 부착된 플루오레세인-6-카르복실레이트(F6CA)를 함유하는 ShK-F6CA가 Kv1.1에 비해 Kv1.3에 대해 80배의 선택성을 나타냈다는 본 저자들의 발견에 의해 유도되었다(Beeton et al., 2003). F6CA는 제한된 카르복실레이트 또는 또한 환화된 락톤으로서 존재할 수 있기 때문에, ShK-F6CA의 Kv1.3에 대한 특이성이 F6CA의 음전하, 이러한 거대한 벌키(bulky) 플루오레세인 핵에 의해 생성된 소수성, 잠재적인 평면 -p 전자적 스택킹(stacking), 또는 이들 잠재적인 모든 기여원인들의 조합에서 기인하였는지 여부가 명확하지 않았다. 이들 가능성들의 차이를 구별하고 비-형광 Kv1.3-선택적 저해제를 개발할 의도로, 본 저자들은 이들 상호작용의 일부를 탐색하기 위해 일련의 12개의 신규한 N-말단-치환된 ShK를 제조하였다. ShK의 N-말단에 Aeea 연결자를 통해 티로신, 페닐알라닌 또는 이들의 유사체(다양한 전하, 크기 및 소수성을 가짐)를 부착시킴으로써, 본 저자들은 전하와 소수성의 효과를 탐색하여 F6CA 치환에서 보여진 본 저자들의 선택성 강화를 파악할 수 있다.

[0207]

도 1A에 도시된 예들에서, L-포스포티로신(L-pTyr), 즉 음전하(순전하 -2) 후-해독적으로 변형된 방향족 아미노산을 AEEA 연결자를 통해 ShK-Arg<sup>1</sup>에 부착시켜 신규한 유사체 ShK(L5)를 생성하였다. ShK 독소 및 ShK(L5)를 L929 세포에서 발현된 Kv1.3 및 Kv1.1 채널상에서 시험하였다. 도 1B는 80 mV 내지 40 mV의 유지 전위에서 200 ms 탈분극 펄스(pulse)에 의해 유도된 Kv1.3 및 Kv1.1 전류에 대한 ShK 및 ShK(L5)의 영향을 도시한 것이다. 양 펩티드들은 둘다 1의 힐(Hill) 계수로 투여량-의존적 방식으로 Kv1.3 및 Kv1.1을 가역적으로 차단하였다(도 1, B 내지 D). K<sub>d</sub> 수치는 마이크로칼 오리진(Microcal Origin) 소프트웨어를 사용하여 도 1C에 도시된 투여량-반응 곡선으로부터 측정하였다. ShK는 예상한 바와 같이 대략 동등한 효능으로 Kv1.3 (K<sub>d</sub> = 10 ± 1 pM) 및 Kv1.1 (K<sub>d</sub> = 28 ± 6 pM)을 차단하였다(도 1C). 대조적으로, ShK(L5)는 Kv1.1 (K<sub>d</sub> = 7.4 ± 0.8 nM)에 비해 Kv1.3 (K<sub>d</sub> = 69 ± 5 pM)에 대해 100배 더 민감하였다(도 1B, 1C). ShK(L5)에 의한 Kv1.3 전류 차단 시간 경과 및 그의 위시아웃은 도 1D에 도시되어 있다. ShK(L5) 위시아웃의 시간 상수(T<sub>ON</sub>)는 131 ± 21 초(n = 7)인 반면, 펩티드 위시아웃의 시간 상수(T<sub>OFF</sub>)는 150 ± 28 초(n = 4)이었다. K<sub>ON</sub>(15 x 10<sup>6</sup> ± 0.5 x 10<sup>6</sup> M<sup>-1</sup>초<sup>-1</sup>) 및 K<sub>OFF</sub>(0.0059 ± 0.0013 초<sup>-1</sup>) 수치로부터 계산된 K<sub>d</sub>(57 ± 7 pM)는 마이크로칼 오리진 소프트웨어로부터 결정된 K<sub>d</sub>(69 ± 5 pM)와 일치한다.

[0208]

다른 ShK 유사체를 또한 Kv1.3 및 Kv1.1 채널에 대해 시험하였다(도 1E). D-포스포티로신(D-pTyr) 함유 ShK(D5)는 Kv1.1에 비해 Kv1.3에 대해 35배 더 선택적이었지만, ShK(L5)에 비해 효능 크기 차수는 더 낮았다. L-pTyr-모노메틸을 함유하는 ShK(L6)는 온건한 (11배) Kv1.3 선택성을 나타내었지만, L-pTyr-디메틸 또는 L-Tyr을 함유하는 ShK 유사체는 Kv1.1에 비해 Kv1.3에 대해 더 선택적이지 않았다(도 1E). 페닐알라닌 또는 그의 유도체를 함유한 유사체(다양한 벌크, p 전자 밀도 및 전하를 가짐)는 Kv1.1에 비해 Kv1.3에 대해 약하게 특이적이거나 전혀 특이적이지 않았다(도 1E). Kv1.1에 비해 Kv1.3에 대한 ShK(L5)의 100배 특이성은 ShK-F6CA(80배), ShK(D5)(35배), ShK-Dap<sup>22</sup>(33배) 또는 임의의 다른 시험된 ShK 유사체에 비해 더 크다(도 1C).

[0209]

**ShK(L5)는 고도로 특이적인 Kv1.3 저해제이다.** 본 저자들은 20개의 이온 채널의 페널에 대한 ShK(L5)의 특이성을 분석하였다(표 1). ShK(L5)는 클로닝된 채널에 대한 K<sub>d</sub>(69 pM)와 동등한 K<sub>d</sub>(76 pM)로 T 세포내 Kv1.3 채널

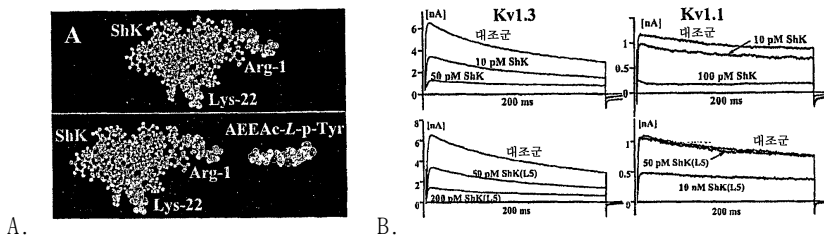


을 차단하였다. ShK(L5)는 Kv1.1에 비해서는 100배, Kv1.6에 비해서는 260배, Kv3.2에 비해서는 280배, Kv1.2에 비해서는 680배 및 모든 다른 시험된 채널들에 비해서는 >1000배로 Kv1.3에 대해 선택적이었다. 중요하게는, ShK(L5)는 인간 천연 및 T<sub>CM</sub> 세포의 활성화를 조절하는 칼슘-활성화 K<sup>+</sup> 채널인 KCa3.1에 비해 1600배 더 Kv1.3에 선택적이었다(Wulff et al., 2003). 천연 ShK는 ShK(L5)보다 덜 선택적이었다. ShK는 Kv1.1(K<sub>d</sub> 28 ± 6 pM)에 비해서는 2.8배, Kv1.6(200 ± 20 pM)에 비해서는 20배, Kv3.2(K<sub>d</sub> = 5,000 ± 1,000 pM)에 비해서는 500배, 및 Kv1.2(10 ± 1 nM) 및 KCa3.1(K<sub>d</sub> = 28 ± 3 nM)에 비해서는 >1000배 더 Kv1.3(K<sub>d</sub> = 10 ± 1 pM)에 대해 선택적이었다. 특이적 Kv1.3 저해제로서 알려져 있는 전갈 독액으로부터의 펩티드인 마르가톡신(Koo et al., 1997; Lin et al., 1993; Middleton et al., 2003)도 또한 특이적이지 않았다. 이것은 Kv1.2(K<sub>d</sub> = 520 ± 1 pM)에 비해서는 5배, Kv1.1(10 ± 1 nM)에 비해서는 9배 및 Kv1.6 및 Kv3.2(K<sub>d</sub> > 100 nM)에 비해서는 >1000배 더 Kv1.3(110 ± 12 pM)에 대해 선택적이었다. Kv1.3 저해제인 점에 기초하여 자가면역 질환에 대해 시판중인(www.lutimax.com) 기능식품인 루테올린(Lahey and Rajadhyaksha, 2004)은 Kv1.3을 약하게 차단하였고(K<sub>d</sub> = 65 ± 5 mM), Kv1.1(K<sub>d</sub> = 77 ± 5mM), Kv1.2(K<sub>d</sub> = 63 ± 4 mM) 또는 Kv1.5(K<sub>d</sub> = 41 ± 3 mM)에 대해 선택성을 나타내지 않았다. ShK(L5)는 Kv1.3에 대한 정교한 특이성 및 채널에 대한 피코몰 친화성을 가짐에 따라 잠재적으로 매력적인 면역억제제이다.

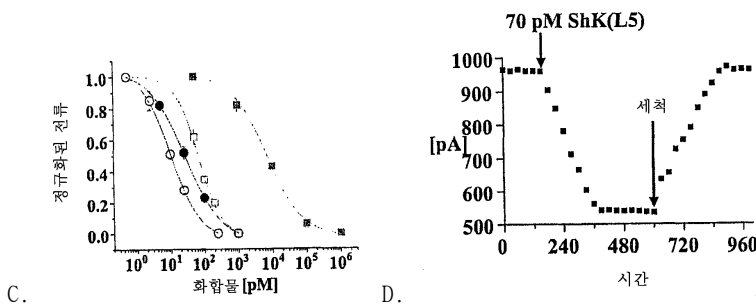
[0210]

**도 1.** 선택적 Kv1.3 차단제의 생성. A, 공개된 NMR 구조에 기초한 ShK의 분자 모델. 채널 차단에 중요한 Lys<sup>22</sup>가 오렌지색으로 강조되어 있다. L-pTyr은 Aeea 연결자(우측)를 통해 ShK의 Arg<sup>1</sup>의 α-아미노기(청록색으로 강조됨)에 부착되었다. 연결자 및 L-pTyr의 구조식은 하이퍼켄에서 AM1로 모델화시켰다. B, 안정하게 형질감염된 세포에서의 Kv1.3 및 Kv1.1 전류에 대한 ShK(위) 및 ShK(L5)(아래)의 효과. C, ShK(청색) 및 ShK(L5)(적색)에 의한 Kv1.3(개방 기호) 및 Kv1.1(폐쇄 기호)의 투여량-의존적 저해. Kv1.3에 대한 K<sub>d</sub> 수치 = 10 ± 1 pM(ShK) 및 69 ± 5 pM(ShK(L5)); Kv1.1에 대한 K<sub>d</sub> 수치 = 28 ± 6 pM(ShK) 및 7.4 ± 0.8 nM(ShK(L5)). D, Kv1.3 세포에 대한 ShK(L5)의 위시인 및 위시아웃의 시간 경과. 세포를 -80 mV의 유지 전위에서 유지하고 매 30초마다 40 mV로 200 ms간 탈분극시켰다. E, ShK 유사체들에 의한 Kv1.3 및 Kv1.1의 저해에 대해 나타난 K<sub>d</sub> 수치. ShK-F6CA 및 ShK-Dap<sup>22</sup>에 대한 K<sub>d</sub> 수치는 공개된 문헌에 제공되어 있다(Kalman et al., 1998; Beeton et al., 2003; Chandy et al., 2004).

[0211]



[0212]



화합물	2번 위치에서 결합된 잔기	2번 위치에서의 순 전하	Kv1.3에 대한 $K_d$ [pM]	Kv1.1에 대한 $K_d$ [pM]	$K_{ds}$ 의 비
ShK	없음	없음	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 모노메틸	-1	10 ± 1	112 ± 9	11.2
ShK(L7)	L-p-Tyr 디메틸	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 모노메틸	-1	311 ± 16	1,100 ± 100	3.5
ShK(L3)	L-Pmp 디메틸	0	71 ± 6	1,100 ± 200	15.5
ShK(D3)	D-Pmp 디메틸	0	70 ± 9	166 ± 13	2.4
ShK(L9)	L-p-COOH-Phe	-1	94 ± 7	319 ± 36	3.4
ShK-L8	L-p-아미노-Phe	+1	65 ± 4	142 ± 13	2.2
ShK-F6CA	F6CA	-1	48 ± 4	4,000 ± 300	83
ShK-Dap <sup>22</sup>	없음	없음	52 ± 3	1,800 ± 577	35

E.

표 1

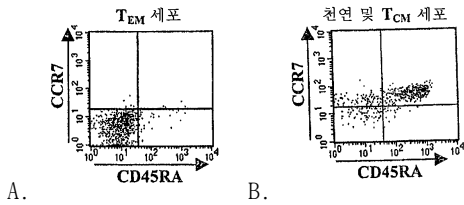
Shk(L5)의 선택성

채널	ShK(L5)의 $K_d$ [pM]
<b>Kv1.1</b>	<b>7,000 ± 1,000</b>
<b>Kv1.2</b>	<b>48,000 ± 7,000</b>
<b>Kv1.3 (클로닝됨)</b>	<b>69 ± 5</b>
<b>Kv1.3 (천연)</b>	<b>76 ± 8</b>
<b>Kv1.4</b>	<b>137,000 ± 3,000</b>
<b>Kv1.5</b>	<b>100,000 효과 없음</b>
<b>Kv1.6</b>	<b>18,000 ± 3,000</b>
<b>Kv1.7</b>	<b>100,000 효과 없음</b>
<b>Kv2.1</b>	<b>100,000 효과 없음</b>
<b>Kv3.1</b>	<b>100,000 효과 없음</b>
<b>Kv3.2</b>	<b>20,000 ± 2,000</b>
<b>Kir2.1</b>	<b>100,000 효과 없음</b>
<b>Kv11.1 (HERG)</b>	<b>100,000 효과 없음</b>
<b>K<sub>Ca</sub>1.1</b>	<b>100,000 효과 없음</b>
<b>K<sub>Ca</sub>2.1</b>	<b>100,000 효과 없음</b>
<b>K<sub>Ca</sub>2.3</b>	<b>100,000 효과 없음</b>
<b>K<sub>Ca</sub>3.1</b>	<b>115,000 ± 5,000</b>
<b>Nav1.2</b>	<b>100,000 효과 없음</b>
<b>Nav1.4</b>	<b>100,000 효과 없음</b>
<b>평윤-활성화된 T 세포</b>	<b>100,000 효과 없음</b>
<b>Cl- 채널</b>	<b>100,000 효과 없음</b>
<b>Cav1.2</b>	<b>100,000 효과 없음</b>

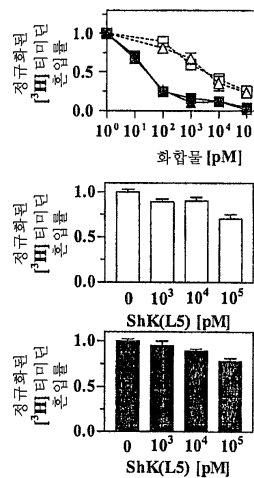
ShK(L5)는 인간 T<sub>EM</sub> 세포 증식을 우선적으로 지속적으로 억제한다. ShK(L5)의 시험관내 면역억제 활성을 평가하기 위해, 본 저자는 인간 T<sub>EM</sub> 세포주 대 천연 및 T<sub>CM</sub> 세포의 혼합물을 함유하는 인간 PBMC의 항-CD3 항체-자극된 증식을 억제하는 능력을 비교하였다. 유량 세포분석법은 연구된 2가지 집단들의 세포 표면 표현형을 확인하였다. 도 2A에 도시된 바와 같이, T<sub>EM</sub> 세포주는 >90% CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>인 반면, 도 2B에 도시된 바와 같이, PBMC는 65% CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> (천연) 및 18% CCR7<sup>+</sup>CD45RA<sup>-</sup> (T<sub>CM</sub>) 세포를 함유하였다. 도 2C는 ShK(L5) 및 ShK가 PBMC(IC<sub>50</sub> = 5 nM, p < 0.05)에 비해 T<sub>EM</sub> 세포(IC<sub>50</sub> = 약 80 pM)의 증식을 억제하는데 있어서 60배 더 효과적임을 보여준다. PBMC의 더 낮은 민감도는 이전에 보고된 바와 같이 자극시 천연 및 T<sub>CM</sub> 세포에서의 KCa3.1 채널의 급속한 상향조절로 설명될 수 있다(Ghanshani et al., 2000; Wulff et al., 2003). 이러한 해석과 일치하게, 도 2D의 위 화살표로 나타난 바와 같이, 48시간 동안 활성화되어 KCa3.1 발현을 상향조절한 후, 12시간 동안 휴지기에 있고, 다시 항-CD3 항체로 재활성화된 PBMC는 ShK(L5) 차단작용에 대해 완전히 저항성이었다. 초회 자극 동안 ShK(L5)에 의해 억제된 PBMC는 세포를 세척하고 휴지기에 있고 다시 항-CD3 항체로 재접종하였을 때 ShK(L5)에 대해 동일한 저항성을 나타내었다. 이러한 결과는 천연 및 T<sub>CM</sub> 세포가 KCa3.1 채널을 상향조절함으로써 Kv1.3 저해제를 피함을 나타내는 이전 연구를 확인시켜 준다(Wulff et al., 2003). 따라서, ShK(L5)는 우선적으로 지속적으로 T<sub>EM</sub> 세포의 증식을 억제한다.

도 2. ShK(L5)는 인간 T<sub>EM</sub> 세포의 증식을 우선적으로 억제한다. 인간 PBMC(A) 및 인간 T<sub>EM</sub> 세포주(B)를 CD3, CD45RA 및 CCR7에 대한 항체로 착색시켰다. CD45RA 및 CCR7의 착색 강도를 CD3<sup>+</sup>-관문 집단에서의 유량 세포분

석법에 의해 측정하였다. C, 48시간 동안 항-CD3 항체로 자극된 PBMC(개방 기호, 천연/ $T_{EM}$  세포의 혼합물) 및  $T_{EM}$  세포(폐쇄 기호)에 의한  $[^3H]$ 티미딘 혼입의 ShK(정색) 및 ShK(L5)(적색)에 의한 투여량-의존적 저해. D, KCa3.1 발현을 상향조절하는 미리 활성화된 인간 PBMC(천연/ $T_{EM}$  세포)(Ghanshani et al., 2000)는 항-CD3 항체로 재활성화되었을 때 ShK(L5) 저해에 저항성으로 된다. 이들 세포는 이전에 KCa3.1-특이적 저해제 TRAM-34에 대해 민감한 것으로 알려져 있었다(Ghanshani et al., 2000).



[0219] A. B.



[0220] D. C.

ShK(L5)는 래트  $T_{EM}$  세포의 증식 및 이에 의한 IL2 생산을 저해한다; 외인성 IL2는 부분적으로 억제를 무효화시킨다. ShK(L5)의 치료 효과를 평가하기 위한 전제로서, 본 저자는 래트에서 MS-유사 질환을 일으키는 기억 T 세포주, PAS의 증식을 억제하는 능력을 조사하였다. 대조군으로서, 본 저자들은 래트의 지라 T 세포를 사용하였다. 2가지 세포 집단의 분화 상태를 확인하기 위해, 본 저자들은 천연 T 세포의 마커인 CD45RC의 발현을 평가하였다(Bunce and Bell, 1997). 래트 지라 T 세포는 76% CD45RC<sup>+</sup>(즉, 주로 천연 세포)인 반면, PAS 세포는 CD45RC<sup>-</sup>이었는데, 이는 이들이 도 3A에 도시된 바와 같이 기억 세포들임을 암시한다. PAS 세포가  $T_{EM}$ -상태 또는  $T_{CM}$ -상태인지 여부를 결정하기 위해, 본 저자들은 활성화하기 이전 및 활성화후 48시간에 Kv1.3 발현을 조사하였다.  $T_{CM}$  세포가 아니라  $T_{EM}$  세포가 자극시 Kv1.3 수준을 상당히 상향조절할 것으로 예상된다. 도 3B를 참조하면, 막전압고정법 실험에서 PAS 세포의 MBP-자극 후의 Kv1.3 전류에서의 놀라운 증가가 나타났는데, 이는 이들이  $T_{EM}$  세포인 사실과 일치한다. PAS 세포에 대한 Kv1.3 채널의 수의 독립적인 척도로서, 본 저자들은 이전에 Kv1.3에 특이적으로 결합하는 것으로 보고되어 온 형광 표지된 ShK 유사체인 ShK-F6CA를 사용하였다. 유량 세포분석법에 의해 측정된 ShK-F6CA 착색의 강도는 세포 표면에서 발현된 Kv1.3 4량체의 수를 반영한다. 도 3C에서 알 수 있는 바와 같이, ShK-F6CA (10 nM) 착색 강도는 PAS 세포의 MBP-활성화에 따라 증가하였으며, 과량의 비표지된 ShK(L5)(100 nM)는 ShK-F6CA 착색을 경쟁적으로 저해하였다. 최종 시험으로, 본 저자들은 고정되고 Kv1.3-특이적 항체로 착색된 정지 및 MBP-자극된 PAS 세포에 대해 공초점 현미경검사를 수행하였다. 도 3B 및 도 3C에서의 자료와 일치하게, 휴지기 PAS T 세포는  $4.4 \pm 0.6$ 의 Kv1.3 착색 강도를 가졌으며, 이 수치는 항원-유도된 활성화 후에  $10.6 \pm 2.3$  ( $p < 0.005$ )으로 증가하였는데(도 3D 참조), 이는 활성화 이후에 Kv1.3 단백질 발현의 증대를 보여준다. 따라서, MBP-활성화 PAS 세포는 CD45RC<sup>-</sup> Kv1.3<sup>hi</sup>  $T_{EM}$  세포인 반면, 본 저자들의

[0221]

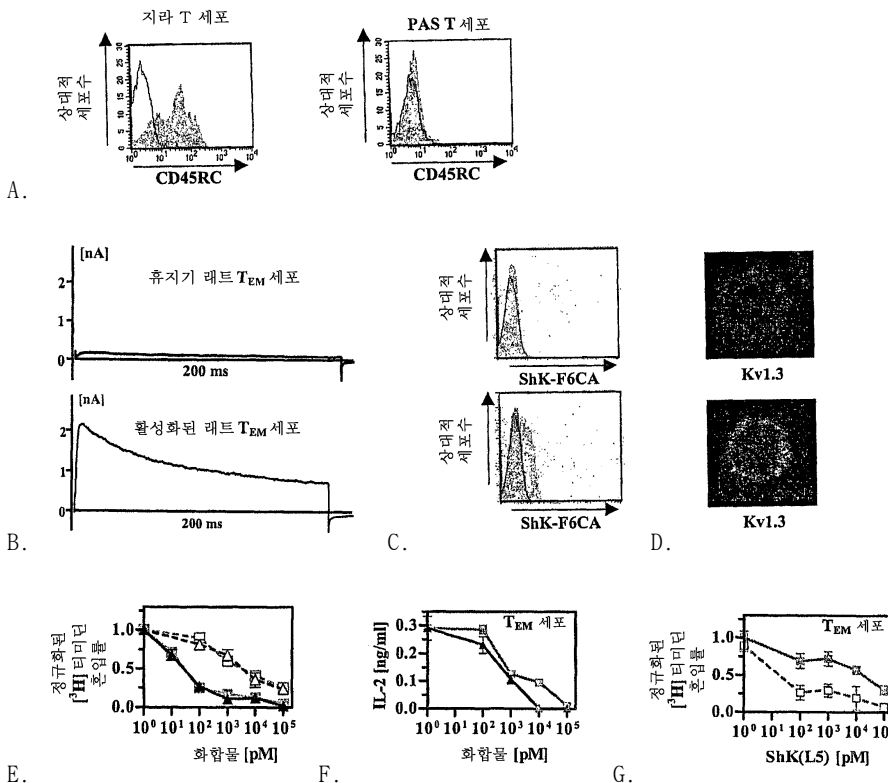
실험에 사용된 래트 지라 T 세포는 주로 천연 상태로 존재한다.

[0222]

PAS 세포의 MBP-유발된 증식은 래트 지라 T 세포의 유사분열물질-유도성 증식(도 3E 참조, IC<sub>50</sub> 약 100 nM; p < 0.05)에 비해 약 1000배 더욱 효과적으로 ShK(L5) 및 ShK(IC<sub>50</sub> = 약 80 pM)를 억제하였다. 이러한 결과는 상기 인간 T 세포에서 발견을 확인시켜 준다(도 2). ShK(L5)는 PAS 세포에 의해 MBP-유도된 IL2 생산을 저해하였으며(도 3F), 외인성 IL2는 부분적으로 PAS 세포 증식의 ShK(L5) 억제를 무효화시켰다(도 3G). 초기 연구들은 인간, 래트 및 미니 돼지 T 세포에 대해 덜 특이적인 Kv1.3 채널들을 사용하여 유사한 발견을 보고하였다(Chandy et al., 1984; Koo et al., 1997; Beeton et al., 2001a). 요약하면, ShK(L5)는 인간 및 래트 T<sub>EM</sub> 세포의 강력한 선택적 저해제이며, 따라서 자가면역 질환들의 발병기전에 기여하는 T<sub>EM</sub> 세포를 우선적으로 표적화함으로써 이들 질환에서 치료적 용도를 가질 수 있다(Chandy et al., 2004).

[0223]

**도 3.** ShK(L5)는 래트 T<sub>EM</sub> 세포의 증식을 우선적으로 억제한다. A, 래트 지라 T 세포(좌측) 및 PAS T 세포(우측)의 CD45RC 착색을 유량 세포분석법으로 검출하였다. B, Kv1.3 전류는 정지(위) 및 미엘린 항원-활성화된(아래) PAS T 세포에서 나타났다. C, 정지(위) 및 미엘린 항원-활성화된(아래) PAS T 세포에서의 ShK-F6CA-착색의 유량 세포분석법 프로파일. 비착색된 세포(흑색선) 및 ShK-F6CA로 착색된 세포(녹색으로 채워짐). 비표지된 ShK(L5)에 의한 ShK-F6CA 착색의 경쟁은 적색으로 채워져 있다. D, 정지(위) 및 미엘린 항원-활성화된(아래) PAS T 세포에서의 Kv1.3 면역착색의 공초점 영상들. 만-휘트니 U 시험을 사용하여 통계 분석을 수행하였다. E, Con A(1 µg/ml)로 활성화된 래트 천연/T<sub>CM</sub>(개방 기호) 및 T<sub>EM</sub>(폐쇄 기호) 세포에 의한 [<sup>3</sup>H]티미딘 혼입의 ShK(청색) 및 ShK(L5)(적색)에 의한 투여량-의존적 저해. F, MBP로 자극된 후 7시간 후에 PAS T 세포에 의한 IL2 분비의 ShK(청색) 및 ShK(L5)(적색)에 의한 투여량-의존적 저해. G, PAS T 세포에 의한 미엘린-항원 유발된 [<sup>3</sup>H]티미딘 혼입의 ShK(L5)-유도된 저해(개방 기호)는 20 유닛/ml의 IL2의 첨가(폐쇄 기호)에 의해 역전된다.



[0224]

A.

[0225]

B.

C.

D.

[0226]

E.

F.

G.

[0227]

**피하 투여 후의 ShK(L5) 혈장 수치.** 래트 EAE 모델에서 생체내 연구를 착수하기 전에, 본 저자들은 막전위 고정 생물학적분석법을 사용하여 피하 주사 후 ShK(L5)의 순환 수준이 T<sub>EM</sub> 세포를 저해하는데 충분한지 여부를 확인하였다. ShK(L5)-시험 래트 및 대조군 래트로부터의 혈청 시료를 Kv1.3 채널에 대한 차단 활성화에 대해 시험하였



다. 대조군 혈청은 검출가능한 차단 활성을 나타내지 않았는데, 이는 내인성 채널 차단제의 부재를 나타내는 것이다. 분석법을 표준화하기 위해, 공지된 양의 ShK(L5)를 래트 혈청에 첨가하고 이들 시료를 Kv1.3 채널에 대해 시험하였다. 스파이크된(spiked) 혈청 시료는 투여량-의존적 방식으로 Kv1.3 전류를 차단하였는데( $K_d$   $77 \pm 9$  pM), 이는 혈청 부재시의 ShK(L5)의 효과와 구별할 수 없었다(도 4A). 처리된 동물에서의 ShK(L5)의 수준은 표준 곡선과 비교하여 측정하였다. ShK(L5)는 200  $\mu$ g/kg의 단일 피하 주사 후 5분 이내에 혈청에서 검출가능하였다(도 4B). 피크 수준(12 nM)은 30분 이내에 도달한 후, 420분에 걸쳐 약 300 pM의 기본수준으로 떨어졌다(도 4B). 혈액으로부터의 ShK(L5)의 소실은 단일 지수에 의해 정합될 수 있었다(도 4C). 순환 반감기는 약 50분으로 추정되었다.

[0228]

200  $\mu$ g/kg 후의 피크 혈청 수준(12 nM)은 Kv1.3 채널 및 T<sub>EM</sub> 세포 기능의 선택적 차단에 대한 요구조건을 크게 초과하기 때문에, 본 저자들은 더 낮은 투여량을 시험하였다. 10  $\mu$ g/kg을 단일 주사한 후에, ShK(L5)의 피크 혈청 농도는 30분 이내에 약 500 pM에 도달하였는데(데이터는 도시되지 않음), 이는 Kv1.3을 >90%로 차단하기에 충분하지만 Kv1.1에는 영향을 미치지 않는 농도이다. 이 투여량의 반복된 1일 투여(10  $\mu$ g/kg/일)는 약 300 pM의 정상상태 수준을 제공하였는데(주사 후 24시간에 측정함, 도 4D), 이는 천연/T<sub>EM</sub> 세포에는 거의 영향을 미치지 않으면서 T<sub>EM</sub> 세포의 60 내지 70% 억제제를 야기하기에 충분하다. "정상상태" 수준은 약 50분의 추정된 순환 반감기를 볼 때 예상해낼 수 없는 것으로, 이는 ShK(L5)가 반복된 투여에서 "축적"됨을 지시하는 것이다. "테포"가 피부에 존재하는지 또는 체내 다른 부분에 존재하는지 여부를 결정하기 위해, 본 저자들은 래트에게 10  $\mu$ g/kg의 ShK(L5)를 단일 정맥내 또는 피하로 주사한 후 10시간에 ShK(L5)의 혈중 수준을 측정하였다. 상기 펩티드는 양 경로에 의해 투여한 후 동일한 시간 경과로 소실되었는데(도 4E), 이는 피부가 단일 10  $\mu$ g/kg/일 주사 후에 도달한 300 pM ShK(L5)의 정상상태 수준을 담당하는 것이 아니며(도 4D), 테포가 다른 장소에 존재함을 나타낸다.

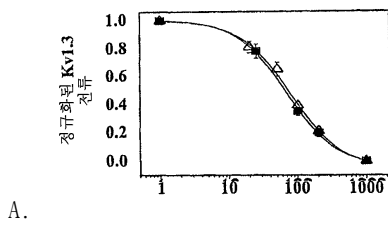
[0229]

10  $\mu$ g/kg/일의 1일 단일 주사 후에 300 pM ShK(L5)의 정상상태 수준을 성공적으로 달성하였다는 사실은 상기 펩티드가 생체내에서 안정할 수 있다는 점을 암시한다. 그의 안정성을 직접 조사하기 위해, 본 저자들은 래트 혈장 또는 2% 래트 혈장을 함유하는 PBS중에서 ShK(L5)를 37°C에서 다양한 기간 동안 항온처리한 후, Kv1.3 차단 활성을 측정하였다. 스파이크된 시료의 양 세트(set)(혈청 및 PBS)에서, 본 저자들은 약 5시간 후에 Kv1.3-차단 활성의 50% 감소를 관찰하였는데, 이는 아마도 시험관의 플라스틱 표면에서의 펩티드 결합에서 기인하는 것으로 보이며, 그 후 상기 수준은 다음 2일간 정상상태로 유지되었다(도 4F). 안정성의 추가 시험으로, 본 저자들은 ShK(L5)-처리 래트로부터의 혈청의 Kv1.3-차단 활성 대 Kv1.1-차단 활성을 비교하였다. ShK(L5)가 pTyr의 탈인산화에 의해 또는 Aeea-pTyr 측쇄의 절단에 의해 생체내에서 변형되는 경우, 이는 각각 Kv1.1에 비해 Kv1.3에 대해 선택적이지 않은 ShK(L4) 및 ShK를 제공할 것이다(도 1E). ShK(L5)-처리 동물로부터의 혈청 시료는 ShK(L5)와 같이 Kv1.1에 비해 Kv1.3에 대해 동일한 선택성을 나타내었으며, 이는 상기 펩티드가 전술한 바와 같이 변형되지 않음을 지시한다. 이들 결과를 함께 조합하면, ShK(L5)가 혈장중에서 상당히 안정하며 10  $\mu$ g/kg의 단일 1일 피하 주사 후에 약리학적으로 적절한 혈청 농도로 유지됨을 나타내는 것이다.

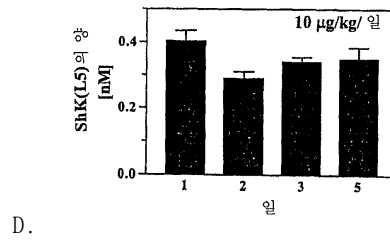
[0230]

**도 4.** ShK(L5)의 순환 반감기 및 안정성. A, 공지된 양의 ShK(L5)를 래트 혈청( $\Delta$ )에 그리고 PBS( $\blacksquare$ )에 첨가하고 차단 활성을 L929 세포에서 안정하게 발현된 Kv1.3 채널에 대해 측정하였다. B, 200  $\mu$ g/kg의 ShK(L5)의 단일 투여량을 4마리의 래트에게 피하로 주사하였다. 혈액을 지시된 시간에 채취하고 혈청을 막전압고정법에 의해 시험하여 ShK(L5)의 양을 측정하였다. C, 데이터를 단일 지수 감소에 대해 정합시켰다. 반감기 = 약 50분. D, 5마리의 루이스 래트에게 5일간 10  $\mu$ g/kg/일의 ShK(L5)의 단일 1일 피하 주사를 투여하였다. 혈액을 매일 아침마다 채취하고(이전 주사 후 24시간) 막전압고정법에 의해 Kv1.3 채널에 대한 차단 활성에 대해 시험하였다. E, 래트에게 10  $\mu$ g/kg의 ShK(L5)의 단일 투여량을 피하로(개방 막대; n = 4) 또는 정맥내로(폐쇄 막대; n = 4) 투여하였다. 혈액을 지시된 시간에 채취하였다. 혈청을 막전압고정법에 의해 시험하여 혈액중의 ShK(L5)의 양을 측정하였다. F, ShK(L5)의 절반-차단 투여량을 래트 혈장( $\square$ ) 또는 2% 래트 혈장을 함유하는 PBS( $\blacksquare$ )에 첨가하고 다양한 기간 동안 37°C에서 항온처리하였다. 분취액을 지시된 시간에 채취하고 차단 활성을 Kv1.3 채널에 대해 측정하였다.

[0231]

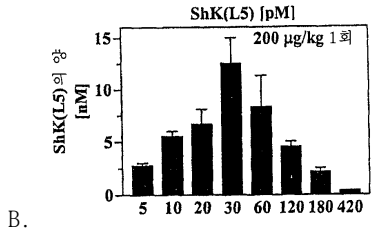


A.

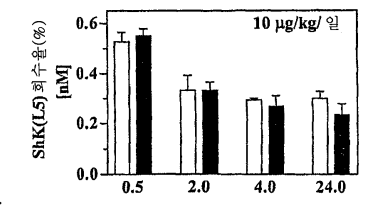


D.

[0232]

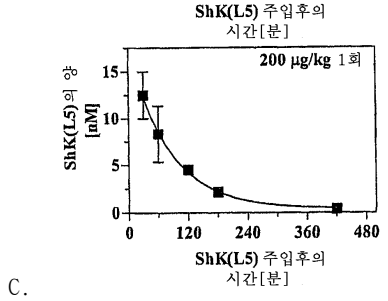


B.

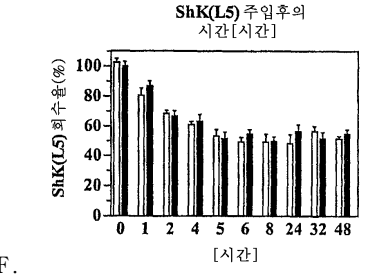


E.

[0233]



C.



F.

[0234]

**독성 연구.** 본 저자들은 ShK(L5)가 독성을 나타내는지 확인하기 위해 몇가지 시험관내 및 생체내 시험을 수행하였다(표 2). 이들 연구의 결과를 부록 A에 요약하였다. 인간 및 래트의 림프계 세포를 최소 세포독성을 나타내는 Kv1.3 절반-차단 투여량 또는  $T_{EM}$  억제에 대한  $IC_{50}$ (70 내지 80 pM)보다 >1200배 더 큰 농도(100 nM)의 ShK(L5)로 48시간 동안 항온처리하였다. ShK(L5)의 동일한 고농도는 시험 균주 TA97A에 대한 에임스 시험에서 음성이었는데, 이는 상기 펩티드가 돌연변이원이 아님을 제시한다. 양 시험관내 시험 둘다에서 임의의 상당한 독성을 검출하는데 실패하였다.

[0235]

Kv11.1 (HERG) 채널의 약물-유도성 차단은 주요한 심장 독성에 기여하여 시중으로부터 몇가지 의약품의 회수를 초래하여 왔다. ShK(L5)는 100 nM(Kv1.3에 대해 >1430배  $K_d$ )에서 Kv11.1 채널에 대해 어떠한 영향도 미치지 않았으며, 본 저자들이 선택한 치료 요법(10 µg/kg/일, 300 pM 정상상태 순환 수준)은 따라서 심장독성을 일으키지 않을 것이다. 추가 시험으로서, 본 저자들은 1일째에 비히클(PBS + 2% 래트 혈청) 및 이후 2일째에 10 µg/kg/일 ShK(L5)가 투여된 의식이 있는 래트에서 심장박동수 변동성 분석을 수행하였다. ShK(L5)는 심장박동수나 시간 및 박동수 도메인 둘다에서의 표준 HRV(심장박동수 변동성) 파라미터에 어떠한 영향도 미치지 않았다(Task force of the European Society of Cardiology and the North American Society of Pacing Electrophysiology, 1996).

[0236]

상기 단기 독성 시험에 힘입어, 본 저자들은 래트에게 2주간 10 µg/kg ShK(L5) 또는 비히클을 1일 피하 주사로 투여한(각 군에서 n = 6) 중기 독성 연구를 수행하였다. ShK(L5)-처리 동물은 비히클을 투여받은 래트와 동일한 정도로 체중이 증가하였다(표 2). 혈액학적 및 혈액 화학적 분석결과 ShK(L5)-처리 및 비히클-처리 래트 사이에 어떠한 차이점도 보이지 않았으며, 유량 세포분석법으로 분석한 결과 흉선세포 또는 림프구 아집단들의 비율에서 전혀 차이가 없었다(표 2). 총괄적으로, 이들 연구는 ShK(L5)가 안전함을 제시한다.

[0237]

치료적 안전성 지수를 확인하기 위해, 본 저자들은 건강한 래트에게 5일간 60배 고 투여량(600 µg/kg/일)의 ShK(L5)를 투여하였으나, 어떠한 독성의 임상적 증후도 관찰되지 않았으며, 건강한 래트에게 1000 µg/kg ShK(L5)를 단일 주사한 경우에도 전혀 독성이 보이지 않았다. EAE 및 MS에서 나타나는 바와 같이 혈액-뇌-장벽이 손상되는 경우에는 상기한 상황은 덜 낙관적이다. 10일간 10 µg/kg/일을 투여받은 EAE 래트에서는 어떠한

독성의 증후도 보이지 않았다. 이와 대조적으로, 이들에게서 EAE의 임상적 증후가 나타났을 때 5일간 600 μg/kg/일을 투여받은 래트는 이들의 40%(5/12)가 5일째에 죽었다(외삽 LD<sub>50</sub> = 750 μg/kg/일). 200 μg/kg의 단일 주사 후 혈청 중의 ShK(L5)의 피크 농도(12 nM)는 Kv1.1 채널의 >50%를 차단하기에 충분하기 때문에, 600 μg/kg/일 ShK(L5)가 투여된 EAE 래트에서 관찰되는 독성은 Kv1.1을 차단하기에 충분한 양의 ShK(L5)가 뇌로 유입되었기 때문인 것 같다. 따라서, ShK(L5)의 치료적 유효 안전성 지수는 혈액-뇌 장벽이 손상되지 않은 경우(중추신경계(CNS)에는 영향을 미치지 않는 자가면역질환에서 볼 수 있는 바와 같이)에서는 100의 과량에서도 양호하였으나, 혈액-뇌 장벽이 갈라진 경우에는 치료적 안전성 지수는 75이다.

[0238] 표 2.

ShK(L5)의 독성 연구

시험관내 시험		100 nM ShK(L5)	
세포독성(% 사멸 세포율)			
인간 PBMCs		7.5 ± 4.3	
PAS T 세포		8.1 ± 0.8	
위트캣 세포		5.5 ± 3.3	
버킷 킬프종		3.1 ± 0.9	
RPMI 8226 플루종		6.5 ± 2.1	
에이스 시험		음성	
단기 생체내 시험		식염수	ShK(L5) 10 μg/kg
심전도 *			
심장 박동수	302 ± 13		311 ± 20
SDNN	13.3 ± 3.0		17.8 ± 4.4
CV%	6.7 ± 1.4		9.2 ± 2.2
SDANN <sub>5min</sub>	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
중기 생체내 시험		식염수	ShK(L5) 10 μg/kg/일 2주간
체중 증가율 (%)			
	7.2 ± 1.8		6.2 ± 1.7
전혈구 계산치			
적혈구 용적율 (%)	40.3 ± 1.4		39.0 ± 4.9
헤모글로빈 (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
총 백혈구 (x10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	7.1 ± 2.1		7.1 ± 2.5
총 적혈구 (x10 <sup>6</sup> mm <sup>-3</sup> )	8.3 ± 0.3		8.1 ± 1.0
총 혈소판 (x10 <sup>3</sup> mm <sup>-3</sup> )	656 ± 214		606 ± 106
혈액 화학			
알칼리 포스파타제 (U/l)	170 ± 26		150 ± 18
글루코스 (mg/dl)	139 ± 21		150 ± 18
혈중 우레아 질소 (mg/dl)	17.1 ± 2.6		15.0 ± 1.7
크레아티닌 (mg/dl)	0.6 ± 0		0.6 ± 0.1
알부민 (g/dl)	5.0 ± 0.3		4.5 ± 0.4
가슴샘 세포 집단 (%)			
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	3.6 ± 1.1		4.3 ± 0.7
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	77.8 ± 6.1		76.8 ± 4.1
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup>	8.5 ± 1.7		11.2 ± 2.0
CD4 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	10.0 ± 3.3		7.6 ± 1.3
CD3 <sup>+</sup>	89.5 ± 1.6		93.2 ± 3.5
지라 집단 (%)			
CD3 <sup>+</sup>	72.4 ± 4.4		65.4 ± 0.1
CD3 <sup>+</sup> CD45RC <sup>+</sup>	35.6 ± 2.6		39.8 ± 1.1
CD3 <sup>+</sup> CD45RC <sup>-</sup>	23.6 ± 2.3		26.5 ± 1.3
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	62.7 ± 0.1		66.6 ± 1.2
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	26.9 ± 0.1		25.0 ± 0.2
IgM <sup>+</sup>	38.8 ± 1.5		33.3 ± 0.3

데이타는 평균 ± SD(표준편차)로 표시하였다. \*t-검정으로 시험됨, 모든 파라미터에 대해 p < 0.05; SDNN: 모든 정상-대-정상 RR 간격의 표준편차; CV%: 100 x SDNN/평균 RR 간격; SDANN<sub>5분</sub>: 각각 5분의 기간 동안의 정상 RR 간격의 평균의 표준편차; rMSSD: 연속 차이의 제곱근평균제곱; HF(n.u.): 정규화 단위에서의 고주파수(0.75 내지 2.5 Hz) 힘; LF(n.u.): 정규화 단위에서의 저주파수(0.2 내지 0.75 Hz) 힘. MCV는 평균 적혈구 용적을 나타내고, MCH는 평균 적혈구 헤모글로빈을 나타내며, MCHC는 평균 적혈구 헤모글로빈 농도를 나타낸다.

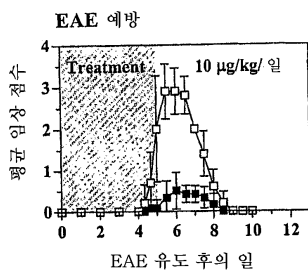
ShK(L5)는 루이스 래트에서 급성 입양 EAE를 예방 및 치료하고 DTH를 예방한다. ShK(L5)를 2마리의 동물 모델

에서 면역억제 활성화에 대해 평가하였다. 본 저자들은 루이스(Lewis) 래트로의 MBP-활성화된 PAS T<sub>EM</sub> 세포의 전달에 의해 유도된 급성 EAE를 예방 및 치료하기 위한 능력 및 T<sub>EM</sub> 세포에 의해 매개된 DTH 반응을 억제하기 위한 능력을 시험하였다. PAS 세포를 48시간 동안 시험관내에서 MBP로 활성화시킨 후, 루이스 래트로 입양전달하였다(6 내지 8 x 10<sup>6</sup> 세포). 예방 시도를 위해, 래트에게 5일간 식염수(대조군 래트) 또는 ShK(L5)(10 µg/kg/일)를 피하 주사하였다. 첫번째 예방 시도에서, 대조군 래트는 평균 5.6 ± 0.6일의 발병으로 온건한 EAE(평균 최대 임상 점수 2.0 ± 1.2)를 나타내었다(도시되지 않음). ShK(L5)는 질환 중증도를 감소시켰다(평균 최대 임상 점수 0.7 ± 0.6, p < 0.05). 두번째 예방 시도에서, 대조군 래트는 평균 4.8 ± 0.4일의 발병으로 더욱 심각한 EAE(평균 최대 임상 점수 3.2 ± 0.4)를 나타내었다(도 5A). ShK(L5)는 질환 중증도를 상당히 감소시켰지만(평균 최대 임상 점수 0.6 ± 0.4, p < 0.007), 질환 발병을 상당히 지연시키지는 않았다(5.5 ± 0.7일; p = 0.07). 이들 연구에서는 어떠한 독성 증후도 보이지 않았다.

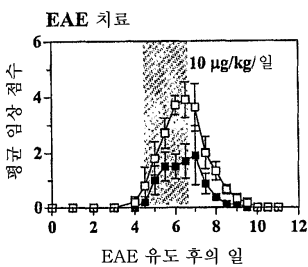
[0242] 치료 시도(도 5B)에서는, 래트에게 MBP-활성화 PAS 세포를 주입하고, 이들이 최초로 EAE의 발병 증후들(늘어난 꼬리, 구부정한 자세 및 24시간에 걸쳐 체중의 6% 이상의 감소)을 나타내었을 때 식염수 또는 10 µg/kg/일 ShK(L5)를 투여하였으며, 치료법을 3일간 계속하였다. EAE의 임상적 증후는 대조군에서는 6일째에 최고에 도달하였고(점수 = 3.9 ± 0.7) 처리군에서는 7일째에 도달하였다(점수 = 1.9 ± 0.9; p < 0.05).

[0243] ShK(L5)의 생체내 면역억제 활성화의 독립적 평가법으로서, 본 저자 피부-각질화 T<sub>EM</sub> 세포에 의해 주로 매개되는 DTH 반응을 저해하는데 있어서의 효과를 조사하였다. 난백알부민 및 보조제로 면역화된 루이스 래트를 7일 후에 한쪽 귀에 난백알부민을 접종하고 다른 쪽 귀에는 식염수를 접종하였다. 그다음 래트에게 식염수(대조군) 또는 ShK(L5)(10 µg/kg/일)를 주사하고, 귀 두께를 DTH의 지표로서 측정하였다. 모든 대조군 래트는 난백알부민 접종 후 24 및 48시간에 귀 팽윤을 나타낸 반면, DTH 반응은 ShK(L5)-처리 동물에서 상당히 더 약했다(도 5C). 따라서, ShK(L5)는 T<sub>EM</sub>-매개 DTH 반응을 저해하며, 미엘린-활성화 T<sub>EM</sub> 세포에 의해 유도된 심각한 임상 EAE를 완화시킨다.

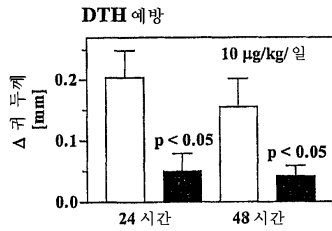
[0244] 도 5. ShK-L5는 루이스 래트에서 DTH 및 급성 임상 EAE를 예방한다. A, EAE의 예방. PAS T 세포를 시험관내에서 활성화시키고, 세척하였으며, 0일째에 복강내로 주사하였다. EAE의 임상 점수: 0 = 임상적 증후 없음, 0.5 = 늘어난 원위 꼬리, 1 = 늘어난 꼬리, 2 = 경미한 하반신마비 또는 운동실조, 3 = 중등 하반신마비, 4 = 뒷다리 완전 마비, 5 = 4 + 실금, 6 = 사망. 래트(n = 6/군)에게 비히클 단독(□; n = 6) 또는 ShK(L5)(■; n = 6; 10 µg/kg/일)를 0일 내지 5일째에 피하로 주사하였다. B, EAE의 치료. PAS T 세포를 시험관내에서 활성화시키고, 세척하였으며, 0일째에 복강내로 주입하였다. 10 µg/kg/일에서 ShK(L5)로의 치료는 래트가 EAE의 임상적 증후를 나타내었을 때 개시하였으며 3일간 계속하였다. C, DTH 반응은 난백단백질에 대해 유발되었으며, 래트 (n = 6/군)를 귀 팽윤정도를 측정한 후에, 2일간 10 µg/kg/일의 ShK(L5)로 처리하였다. 통계 분석은 만-휘트니 U-시험을 사용하여 수행하였다.



[0245] A.



[0246] B.



[0247] C.

[0248] 논의

[0249] 본 저자들은 20 Å 친수성 연결자를 통해 ShK의 N-말단에 음전하를 띠는 아미노산 L-pTyr을 부착함으로써 고도로 특이적인 Kv1.3 저해제를 개발하였다. ShK(L5)는 69 pM의  $K_d$ 로 Kv1.3을 차단하며 Kv1.1에 비해서는 100배, Kv1.6에 비해서는 260배, Kv3.2에 비해서는 280배, Kv1.2에 비해서는 680배 및 시험된 다른 모든 채널들에 비해서는 >1000배로 Kv1.3에 대해 선택성을 나타낸다. Kv1.3의 다른 공지된 차단제는 ShK(L5)에 비해 상당히 덜 선택적이다. 센트로로이데스 마르가리타투스(*Centruroides margaritatus*) 전갈 독액 유래 펩티드인 마르가톡신은 미니 돼지에서 DTH를 억제하였지만(Koo et al., 1997), Kv1.2( $K_d$ , 520 pM)에 비해서는 단지 5배 및 Kv1.1( $K_d$ , 10 nM)에 비해서는 단지 9배만큼만 Kv1.3( $K_d$ , 110 pM)에 대한 선택성을 나타낸다. 전갈 안드로토누스 마루리타 니쿠스(*Androctonus mauritanicus*) 유래의 칼리오톡신은 래트에서 DTH를 억제하고 EAE를 개선시키며(Beeton et al., 2001a), 실험적 치주 질환에서의 염증성 골흡수를 억제시키지만(Valverde et al., 2004), ShK(L5)에 비해 덜 효과적이고(Kv1.3,  $K_d$ , 650 pM) 덜 선택적이다(Grissmer et al., 1994). 발견된 나노몰 친화성을 갖는 최초의 소분자 Kv 1.3 차단제 - 이미노디하이드로퀴놀린류인 WIN 17317 및 CP-339818 및 벤즈하이드릴 피페리딘 UK-78282 -는 또한 나트륨 채널(Wanner et al., 1999) 및 뉴런 Kv1.4 채널(Hanson et al., 1999)을 차단한다. 머르크(Merck)에 의해 개발된 소분자 Kv1.3 저해제 - 코레올리드(Felix et al., 1999; Hanner et al., 1999; Koo et al., 1999; Bao et al., 2005), 사이클로헥실-치환된 벤즈아미드(Schmalhofer et al., 2002) 및 칸델랄리드 A-C(Singh et al., 2001) -는 Kv1.3에 대한 선택성이 부족하다. 가장 강력한 소분자 Kv1.3 차단제인 Psora-4( $K_d$ , 3 nM)는 Kv1.1 및 Kv1.2에 비해 Kv1.3 차단제에 대해 단지 16배 내지 20배 선택적이며 심장 Kv1.5 채널에 비해서는 2.5배 선택적이다(Vennekamp et al., 2004). 래트에서 EAE를 개선시키는 플라보노이드인 루테올린(Hendriks et al., 2004)은 표면상으로는 KV1.3 채널을 차단하는 능력으로 인해 기능식품으로 시판된다(<http://www.lutimax.com>; <http://www.synorx.com>)(Lahey and Rajadhyaksha, 2004). 그러나, 루테올린은 약한 Kv1.3 저해제이며( $K_d$ , 65 μM), 이것은 Kv1.1, Kv1.2 또는 Kv1.5에 비해 Kv1.3에 대해 선택적이지 않다. 다른 공지된 Kv1.3 소분자 차단제 - 술파미드벤즈아미도인단(Castle et al., 2000), 디클로로페닐피라졸로피리미딘(Atwal et al., 2001), 프로퀴놀린 Ibu-8(Butenschon et al., 2001), 테트라페닐포르피린(Gradl et al., 2003), 3-알킬- 및 3-아릴-7H-푸로[3,2-g]크로멘-7-온(Wernekenschnieder et al., 2004), 및 켈리논 및 칼콘 유도체(Baell et al., 2004), 카리브도톡신, 녹시우스톡신(Grissmer et al., 1994), 아지톡신-2(Garcia et al., 1994), BgK(Cotton et al., 1997), 판디니우스 임페라토르(*Pandinius imkperator*) 독소 1(Peter et al., 2001), HsTx1 -는 ShK(L5)만큼 강력하지도 선택적이지도 않다. 이들 차단제는 Kv1.3 선택성이 부족하기 때문에, 이들이 뉴런 채널을 차단하기에 충분한 농도로 중추신경계로 들어가면 잠재적으로 신경독성일 수 있다. ShK(L5)에 필적하는 효능 및 Kv1.3-특이성을 갖는 유일한 Kv1.3 차단제는 전갈 오르토키루스 스크로비쿨루스(*Orthochirus scrobiculosus*) 유래 OSK1 독소의 최근에 기재된 합성 유사체(OSK1-Lys<sup>16</sup>Asp<sup>20</sup>)(Mouhat et al., 2005)이지만, 그의 면역조절제로서의 활성은 여전히 밝혀지지 않고 있다.

[0250] ShK(L5)의 정교한 Kv1.3-특이성으로 인해 이는 매력적인 전도유망한 약물이다. ShK(L5)는 혈장에서 매우 안정하며 10 μg/kg의 반복된 단일 1일 피하 주사 후에 약 300 pM의 정상상태 혈중 수준에 도달하였다. 이러한 ShK(L5)의 혈중 농도는 다른 이온 채널에 영향을 미치지 않으면서 Kv1.3을 90% 초과로 차단하고 천연/ $T_{CM}$  세포를 보존하면서  $T_{EM}$  세포의 60 내지 70% 억제를 야기하기에 충분하다. 그의 약리학적 투여량의 1200배를 초과하는 ShK(L5)의 농도는 시험관내에서 세포독성이거나 돌연변이원성이기 않았다. ShK(L5)는 약물-유도성 긴 QT 증후군(Recanatini et al., 2005)을 담당하는 심장 Kv11.1(HERG)  $K^+$  채널을 차단하지 않았으며, 약리학적 농도(10



$\mu\text{g/kg/일}$ )의 ShK(L5)의 생체내 투여는 연속 EKG 관측에 기초하여 건강한 래트에서 심장 기능을 변형시키지 않았다. 2주간  $10\ \mu\text{g/kg/일}$  ShK(L5)의 반복된 생체내 투여는 임상 화학적 또는 혈액학적 프로파일을 변화시키지 않았다. 단일  $1000\ \mu\text{g/kg/일}$ 의 ShK(L5) 주사(약리학적 투여량의 100배) 또는 5일간  $600\ \mu\text{g/kg/일}$ 의 반복된 주사(약리학적 투여량의 60배)로 투여된 건강한 동물은 어떠한 과잉 독성 증후도 나타내지 않았다. 이러한 결과는 약리학상 적절한 혈중 농도가 ShK(L5)의 단일 1일 피하 주사후에서 달성될 수 있으며, 건강한 래트에서의 치료적 유효 안전성 지수가 100을 초과함을 나타내는 것이다.

[0251]

ShK(L5)는 MS, 1형 당뇨병, 류마티스 관절염 및 건선과 관련된 연속적으로 활성화되는 자가반응성  $T_{EM}$  세포를 우선적으로 표적화시킴으로써 자가면역 질환에서 치료제로서 사용될 수 있다(Ezawa et al., 1997; Lovett-Racke et al., 1998; Scholz et al., 1998; Friedrich et al., 2000; Markovic-Plese et al., 2001; Viglietta et al., 2002; Soler et al., 2003; Wulff et al., 2003). ShK(L5)는 인간 및 래트의  $T_{EM}$  세포의 증식을 억제하고(양 경우에 있어서,  $IC_{50} = \text{약 } 80\ \text{pM}$ ), 피코몰 농도로 IL2 생산을 저해하였다(도 2 및 3). 외인성 IL2는 이러한 차단을 부분적으로 무효화시켰다. 인간 천연/ $T_{CM}$  세포는 초기에는 인간  $T_{EM}$  세포에 비해 ShK(L5)에 대해 60배 덜 민감하였으며 활성화 동안 차단제에 대해 완전히 저항성으로 되었는데(도 2), 이는 아마도 KCa3.1을 상향 조절하였기 때문인 것으로 여겨진다(Ghanshani et al., 2000; Wulff et al., 2003). 래트 천연/ $T_{CM}$  세포는  $T_{EM}$  세포에 비해 ShK(L5)에 대해 1000배 덜 민감하였다. 이러한  $T_{EM}$  세포와 비교한 천연/ $T_{CM}$  세포의 ShK(L5)-민감도에서의 중간 차이 - 인간에서는 60배 더 낮고 래트에서는 1000배 더 낮음 - 는 인간과 래트의 천연/ $T_{CM}$  세포 사이의  $K^+$  채널 발현에서의 차이에 의해 설명할 수 있다. 정지 인간 천연/ $T_{CM}$  세포는 KCa3.1 채널(10-20)에 비해 세포당 더욱 많은 Kv1.3 채널(250-400)을 발현하며, 따라서 KCa3.1 차단제에 비해 Kv1.3 차단제에 의해 더욱 효과적으로 저해된다(Ghanshani et al., 2000; Wulff et al., 2003). 대조적으로, 정지 래트 천연/ $T_{CM}$  세포는 Kv1.3 채널(1-10)에 비해 세포당 더욱 많은 KCa3.1 채널(10-20)을 발현하며, 따라서 Kv1.3 차단제에 비해 KCa3.1 차단제에 대해 더욱 민감하다(Beeton et al., 2001b). 채널 발현에서의 래트/인간 차이는 ShK(L5)에 대한 래트 천연/ $T_{CM}$  세포( $IC_{50} = 100\ \text{nM}$ )와 인간 천연/ $T_{CM}$  세포( $IC_{50} = 5\ \text{nM}$ )의 분화 민감도의 기초가 될 수 있다. 요약하면, ShK(L5)는  $T_{EM}$  세포를 우선적으로 억제하는 반면, 천연/ $T_{CM}$  세포는 처음에는 상기 차단제에 덜 민감하고 이어서 KCa3.1 채널을 상향조절함으로써 급속히 억제를 피한다((Ghanshani et al., 2000; Beeton et al., 2001b; Wulff et al., 2003).

[0252]

인간 유형-전환 기억 B 세포(예를 들어,  $CD27^+IgG^+IgD^-$ )는 자가면역 질환의 병원성에 관여한다(Iglesias et al., 2001; O'Connor et al., 2001; Corcione et al., 2004). Kv1.3 차단제는 우선적으로 후기 기억 B 세포의 분화를 억제하는 반면, 천연 및 초기 기억 B 세포( $CD27^+IgD^+$ )는 상당히 덜 민감하다(Wulff et al., 2004). ShK(L5)는 따라서 자가면역 질환의 발병에 기여하는  $T_{EM}$  및 유형-전환 기억 B 세포의 기능을 정지시킬 수 있다. 체액 면역(IgG 항체의 생산)에서의 유형-전환 기억 B 세포의 중요한 역할 및 이들 세포의 채널-기재 억제의 결과로서 일어날 수 있는 박테리아 접종에 대한 유효한 면역 반응을 설치하는 기능의 감소가 관심대상이다. 인간 유형-전환 기억 B 세포는 휴지기에서  $T_{EM}$  세포(250 내지 400/세포)에 비해 더 많은 수의 Kv1.3 채널(약 2000/세포)을 발현하기 때문에, 인간  $T_{EM}$  세포( $IC_{50} = 80\ \text{내지 } 400\ \text{pM}$ )에 비해 ShK에 의한 차단( $IC_{50} = 1\ \text{내지 } 4\ \text{nM}$ ) 덜 민감하다는 것은 다행스런 일이다(Wulff et al., 2004). 따라서, 자가면역 질환의 치료법 동안 기억 세포들의 한 군 또는 양 군을 우선적으로 억제하는 Kv1.3 차단제의 투여량을 적정할 수 있다.

[0253]

본 저자들은  $T_{EM}$  세포-유도성 질환의 2마리의 래트 모델, 즉 미엘린-특이적  $T_{EM}$  세포의 입양전달에 의해 유도된 EAE(Beeton et al., 2001b) 및 피부-각질화 T 세포에 의해 유발된 DTH(Soler et al., 2003)에서 ShK(L5)를 평가하였다. ShK(L5)는 입양 세포 전달 시간으로부터 단일 1일 주사( $10\ \mu\text{g/kg/일}$ )로 투여된 경우, EAE를 예방하였으며, 이는 치료법을 증상 발병시 개시하였을 때에는 질환 중증도를 상당히 감소시켰다. 처리된 EAE 래트에서는 어떠한 독성도 관찰되지 않았는데, 이는 이러한 치료 요법으로 달성된 ShK(L5)의 혈액 및 조직중 농도가 Kv1.3 채널을 포함하는 이질다합체적 Kv 채널을 포함하는 뉴런 채널을 차단하는데 충분하지 않음을 암시하는 것이다(Koch et al., 1997). ShK(L5)는 또한 DTH를 억제하는데 효과적이었다. 이러한 개념 검증 연구는 래트 모델에서  $T_{EM}$ -매개 질환을 경감하는데 있어서 ShK(L5)의 치료적 효과를 증명한다. 본 저자들은 치료적 유효량보다 60배 더 많은 투여량( $600\ \mu\text{g/kg/일}$ )을 1일 주사함으로써 EAE 래트(혈액-뇌 장벽이 손상된 것 같은 경우)의

ShK(L5)의 치료적 안전성 지수를 결정하였다. 상기 투여량을 투여받은 EAE 래트의 40%가 5일째에 죽었는데(5일 간 외삽 LD<sub>50</sub> = 750 µg/kg/일), 이는 대략 75의 치료적 안전성 지수에 상응하는 것이다.

[0254]

결론적으로, ShK(L5)는 임의의 다른 공지된 저해제보다 더욱 선택적인 Kv1.3 차단제이며, T<sub>EM</sub> 세포 및 유형-전환 기억 B 세포를 표적화함으로써 자가면역 질환에서 이로운 것으로 증명될 수 있다. 그의 Kv1.3에 대한 피코몰 친화성 및 상당한 혈장 안정성은 건강한 래트(> 100) 및 EAE 래트(약 75)에서의 높은 치료적 안전성 지수와 커플링되어 치료적 면역조절제로서의 잠재적인 용도를 제공할 수 있다. ShK(L5)의 단일 1일 피하 주사는 EAE를 개선시키고 DTH를 예방하는데 효과적이며, 이는 이러한 펩티드 전달 경로가 치료법으로 사용될 수 있을 것임을 나타낸다.

[0255]

**감사의 말씀**

[0256]

본 저자들은 뛰어난 기술적 도움을 준 점에 대해 폴 문치, 수레쉬 라만 및 다니엘 호머리크에게 감사의 말을 전한다.

**참고문헌**

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.

Baell JB, Gable KW, 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, Lincea AF, Gáspár R, Possani LD, and Fanyí G (2005) Anuroctoxin, a new scorpion toxin of the  $\alpha$ -KTx 6 subfamily, is highly selective for Kv1.3 over IRCa1 ion channels of human T lymphocytes. *Mol Pharmacol* 67:1-11.

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 corroleide-modification of the C18 position. *Bioorg Med Chem Lett* 15:447-451.

Bardien-Kruger S, Wulff H, Arieff Z, Brink P, Chandu 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<sup>+</sup> channels improves experimental autoimmune encephalomyelitis and inhibits T cell activation. *J Immunol* 166:936-944.

Beeton C, Wulff H, Barbaria J, Clot-Faybessé O, Pennington M, Bernard D, Cahalan M, Chandu K, and Beraud E (2001b) Selective blockade of T lymphocyte K<sup>+</sup> 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 Chandu 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.

Beraud E, Balzano C, Zamora AJ, Varriale S, Bernard D, and Ben-Nun A (1999) 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.

Butenschoen I, Moller K, and Hansel W (2001) Angular methoxy-substituted furo- and pyranquinolinones as blockers of the voltage-gated potassium channel Kv1.3. *J Med Chem* 44:1249-1256.

Castle NA, Hollinshead SP, Hughes PF, Mendoza GS, Searaffin J, Wilson JW, Amato

[0257]

GS, Beaudoin S, Gross M, and McNaughton-Smith G (2000) inventors, ICAgen and Eli Lilly & Company, assignee. Potassium channel inhibitors. U.S. patent 6,083,966. 2000 Jul 4.

Chandy KG, DeCoursey TE, Cahalan MD, McLaughlin C, and Gupta S (1994) Voltage-gated potassium channels are required for human T lymphocyte activation. *J Exp Med* 169:369-385.

Chandy KG, Wulff H, Beeton C, Pennington M, Gutman GA, and Cahalan MD (2004) K<sup>+</sup> channels as targets for specific immunomodulation. *Trends Pharmacol Sci* 25:280-289.

Corcione A, Casazza S, Ferretti E, Giunti D, Zappia E, Pistorio A, Gambini C, Mancardi GL, Uccelli A, and Pistorio V (2004) Reacquisition 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 P, Alessandrini 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.

Deibler GE, Martenson RB, and Kies MW (1973) 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<sup>+</sup> and CD45RO<sup>+</sup> positive CD4<sup>+</sup> T cells in peripheral blood, synovial fluid and synovial tissue in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Acta Med Okayama* 51:26-31.

Felix JP, Bugianesi RM, Schmalhofer WA, Borris R, Goetz MA, Hensens OD, Bao JM, Kayser F, Parsons WH, Rupprecht K, et al. (1989) Identification and biochemical characterization of a novel nontriterpene inhibitor of the human lymphocyte voltage-gated potassium channel, Kv1.3. *Biochemistry* 28:4922-4930.

Friedrich M, Krammig S, Henze M, Doeke 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.

Fujwara Y, Aikaji K, and Kiso Y (1994) Racemization-free synthesis of C-terminal cysteine-peptide using 2-chlorotriyl 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<sup>+</sup> channels from *Leiurus quinquestriatus* var. *hebraeus* venom. *Biochemistry* 33:8834-8839.

Ghanehaji B, 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.

Gradi SN, Felix JP, Inscoff EY, Garcia ML, and Trauner D (2008) Protein surface recognition by rational design: nanomolar ligands for potassium channels. *J Am Chem Soc* 130:12668-12669.

Grismer 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<sup>+</sup> channels, types Kv1.1, 1.2, 1.3, 1.5, and 3.1, stably expressed in mammalian cell lines. *Mol Pharmacol* 46:1227-1234.

Gutman GA, Chandy KG, Abdelman JF, Aiyar J, Bayliss DA, Clapham DE, Covarrubias M, Desai GV, Furuchi K, Gwosdzky B, et al. (2003) International Union of Pharmacology. XLII compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. *Pharmacol Rev* 55:583-588.

Hammerschmidt F and Hanbauer M (2000) Transformation of arylmethylamines into alpha-aminophenonic acids via metalated phosphoramidates: rearrangements of partly configurationally stable N-phosphorylated alpha-aminocarbanions. *J Org Chem* 65:6121-6131.

Hanner M, Schmalhofer WA, Green E, Bordini C, Liu J, Slaughter RS, Kaczorowski GJ, and Garcia ML (1999) Binding of corrolide to Kv1 family potassium channels. *J Biol Chem* 274:25237-25244.

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* 128:1707-1716.

Hendriks JJA, Alblas J, van der Pol SMA, van Tol BAF, Dijkstra OD, and de Vries HE (2004) Flavonoids influence monocyte GTPase activity and are protective in experimental allergic encephalitis. *J Exp Med* 200:1697-1673.

Iglesias A, Bauer J, Litzemburg T, Schubart A, and Limington 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, Mahmir V, Paschetto K, Kem WR, Grissmer S, Gutman GA, et al. (1998) ShK-Dap<sup>22</sup>, a potent Kv1.3-specific immunosuppressive polypeptide. *J Biol Chem* 273:32697-32707.

Kling 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* 36:265-266.

Koch RO, Wanner SG, Koechak A, Hanner M, Schwarzer C, Kaczorowski GJ, Slaughter RS, Garcia ML, and Knaus HG (1997) Complex subunit assembly of neuronal voltage-gated K<sup>+</sup> channels. Basis for high-affinity toxin interactions and pharmacology. *J Biol Chem* 272:27577-27581.

Kolski-Andreaco A, Tomita H, Shakokhatta VG, Gutman GA, Cahalan MD, Gargus JJ, and Chandy KG (2004) SK3-1C, a dominant-negative suppressor of SK<sub>Ca</sub> and IK<sub>Ca</sub> channels. *J Biol Chem* 279:6893-6904.

Koo GC, Blake JT, Staruch MJ, Staruch M, Dumont F, Wunderler D, Sanchez M, McManus OB, Sirotna-Melcher A, Fischer P, et al. (1999) Corrolide and derivatives are novel immunosuppressants blocking the lymphocyte Kv1.3 potassium channels. *Cell Immunol* 197:99-107.

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.

Koechak 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 limbatulus* venom. *J Biol Chem* 273:2639-2644.

Lahay T and Rajadhyaksha VJ (2004) 9-Deoxyflavonoid inhibition of T-lymphocyte activation and therapeutic use, pp 19, US patent 2004102386.

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, Jones 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 Invest* 101:726-730.

Markovic-Plese S, Cortese I, Wandinger KP, McFarland HF, and Martin R (2001) CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> costimulation-independent T cells in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 108:1185-1194.

Middleton RE, Sanchez M, Linde AR, Bugianesi RM, Dal G, Felix JP, Koyrak SL, Staruch MJ, Bruguera M, Cox R, et al. (2003) Substitution of a single residue in Stichodactyla helianthus peptide, ShK-Dap<sup>22</sup>, 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<sup>+</sup> channel types targeted by synthetic OSK1, a toxin from *Orthochirus serobiculosis* scorpion venom. *Biochem J* 385:96-104.

Nicolas E, Vilaseca M, and Giralt E (1995) A study of the use of NH<sub>2</sub> for the reduction of methionine sulfoxide in peptides containing cysteine and cystine. *Tetrahedron* 51:5701-5710.

O'Connor K, Bar-Or A, and Hafler DA (2001) The immunopathology 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, Krafft D, Hill R, Mahmir 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.

Pennington M, Mahmir 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, Mahmir V, Krafft 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, Posaani LD, and Panyi G (2001) Effects of toxins P2 and P3 on human T lymphocyte Kv1.3 channels: the role of Glu1 and Lys24. *J Membr Biol* 179:13-25.

Rosentini M, Fohuzi E, Masetti M, Cavalli A, and De Ponti F (2005) QT prolongation through hERG K<sup>+</sup> channel blockade: current knowledge and strategies for the early prediction during drug development. *Med Res Rev* 25:133-166.

Regaya I, Beeton C, Forrat 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 HaTx1 scorpion toxins. *J Biol Chem* 279:55680-55696.

Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, and Lanzavecchia A (1999) Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature (Lond)* 401:708-712.

Schmalhofer WA, Bao J, McManus OB, Green E, 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.

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, Deseny G, Bills GF, Felix J, Slaughter RS, and Goetz MA (2001) Candelalides A-C: novel diterpenoid pyrones from fermentations of *Sequoiellum candelabrum* as blockers of the voltage-gated potassium channel Kv1.3. *Org Lett* 3:247-250.

Soler D, Humphreys TL, Spinola SM, and Campbell JJ (2003) CCR4 versus CCR10 in human cutaneous T1t 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.

Tian Z, Gu C, Roesske RW, Zhou M, and Van Etten RL (1998) 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* 19:165-164.

Vannucchi J, Wulff H, Beeton C, Calaresi PA, Grissmer S, Hansel W, and Chandy KG (2004) Kv1.3 blocking 6-acylalkylthiopeptidals: 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 Invest* 109:895-903.

Wanner SG, Glosmann 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.

Wernkenschneider 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* 59:519-520.

Wulff H, Calaresi P, Allie R, Yun S, Pennington MW, Beeton C, and Chandy KG

[0258]

(2003) The voltage-gated Kv1.3 K<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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 Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel, IKCa1: a potential immunosuppressant. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:8161-8166.

[0259]

Zhou W, Cayabyab FS, Pennefather PS, Schlichter LC, and DeCoursey TE (1998) HERG-like K<sup>+</sup> channels in microglia. *J Gen Physiol* 111:781-794.

연락처 : Reprint requests to: K. George Chandy, M.D., Ph.D., Department of Physiology and Biophysics, Medical School, 291 Irvine Hall, University of California, Irvine, Irvine, CA 92697-4661. Tel: 949-824-7435, Fax: 949-824-3143, email: gchandy@uci.edu

도면의 간단한 설명

[0024]

도 1은 본 발명의 다수의 ShK 유사체의 화학 구조들을 도시한 것이다.

[0025]

도 2A는 채널 차단에 중요한 Lys<sup>22</sup>가 회색의 한 색조로 강조된, 공개된 NMR 구조를 기초로 한 ShK의 분자 모델을 도시한 것이다. L-pTyr은 Aeea 연결자(우측)를 통해 ShK의 Arg<sup>1</sup>의 α-아미노기(제2 회색 색조로 강조됨)에 부



착되어 있다. 연결자 및 L-pTyr의 구조는 하이퍼켄(Hyperchem)에서 AM1로 모델화되었다.

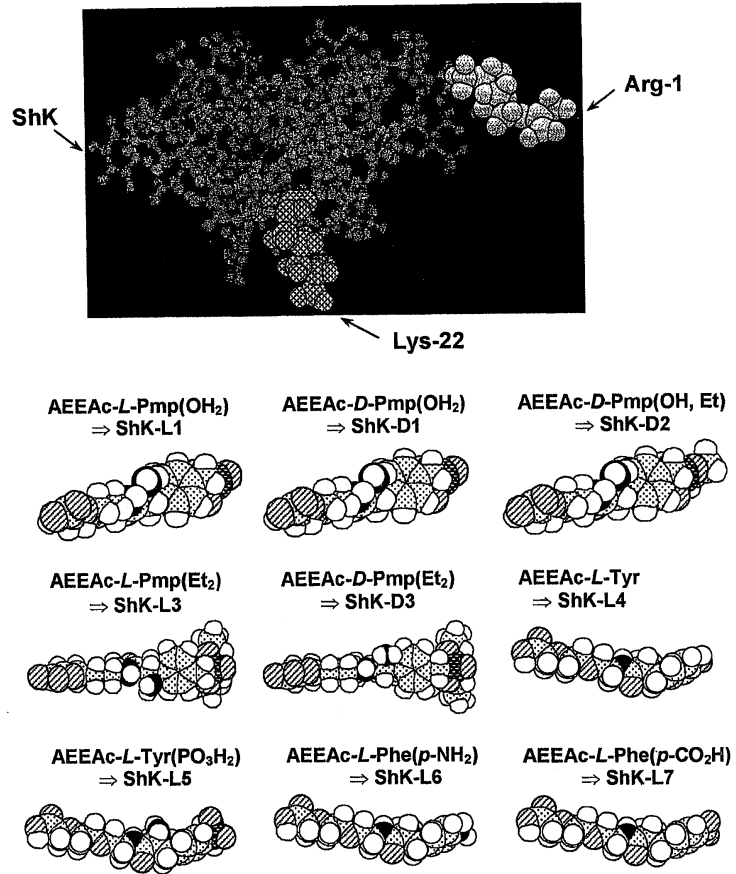
- [0026] 도 2B는 안정하게 형질감염된 세포에서 Kv1.3 및 Kv1.1 전류에 대한 ShK(위) 및 ShK(L5)(아래)의 효과를 도시한 것이다.
- [0027] 도 2C는 ShK(어두운 부분) 및 ShK(L5)(밝은 부분)에 의한 Kv1.3(개방 기호) 및 Kv1.1(폐쇄 기호)의 투여량-의존성 저해를 도시한 것이다. Kv1.3에 대한  $K_{dS} = 10 \pm 1 \text{ pM}$ (ShK) 및  $69 \pm 5 \text{ pM}$ (ShK(L5)); Kv1.1에 대한  $K_{dS} = 28 \pm 6 \text{ pM}$ (ShK) 및  $7.4 \pm 0.8 \text{ nM}$ (ShK(L5)).
- [0028] 도 2D는 Kv1.3에 대한 ShK(L5)의 워시인(wash-in) 및 워시아웃(wash-out) 시간 경과를 도시한 것으로, 이때 세포는 80 mV의 유지 전위(holding potential)에서 유지하였고 매 30초마다 200 밀리초 동안 40 mV로 탈분극하였다.
- [0029] 도 2E는 ShK 유사체에 의한 Kv1.3 및 Kv1.1의 저해에 대한  $K_d$  수치를 도시한 것이다. ShK-F6CA 및 ShK-Dap<sup>22</sup>에 대한  $K_{dS}$ 는 공개 문헌을 기초로 하였다.
- [0030] 도 3A는 CD3, CD45RA 및 CCR7에 대한 항체로 착색된 인간 PBMC의 CD3<sup>+</sup>-관문 집단에서 유량 세포분석법에 의해 측정시의 CD45RA 및 CCR7의 착색 강도를 도시한 그래프이다.
- [0031] 도 3B는 CD3, CD45RA 및 CCR7에 대한 항체로 착색된 인간 T<sub>EM</sub> 세포주 세포의 CD3<sup>+</sup>-관문 집단에서의 유량 세포분석법에 의해 측정시의 CD45RA 및 CCR7의 착색 강도를 도시한 그래프이다.
- [0032] 도 3C는 항-CD3 항체로 48시간 동안 자극된 PBMC(개방 기호, 천연/T<sub>CM</sub> 세포의 혼합물) 및 T<sub>EM</sub> 세포(폐쇄 기호)에 의한 [<sup>3</sup>H] 티미딘 혼입율에 대한 ShK(어두운 회색) 및 ShK(L5)(밝은 회색)의 저해 효과를 도시한 그래프이다.
- [0033] 도 3D는 KCa3.1 발현을 상향조절하는 미리-활성화된 인간 PBMC(천연/T<sub>CM</sub> 세포)를 항-CD3 항체로 재활성화시켰을 때 ShK(L5) 저해에 저항성으로 되는 것을 도시한 그래프이다. 이들 세포는 이전에는 KCa3.1-특이적 저해제 TRAM-34에 대해 민감성으로 되는 것으로 보고되어 있었다.
- [0034] 도 4A는 유량 세포분석법에 의해 검출된 래트 지라 T 세포(좌측) 및 PAS T 세포(우측)의 CD45RC 착색을 보여주는 그래프이다.
- [0035] 도 4B는 정지(위) 및 미엘린 항원-활성화된(아래) PAS T 세포에 의해 나타난 Kv1.3 전류를 도시한 그래프이다.
- [0036] 도 4C는 정지(위) 및 미엘린 항원-활성화된(아래) PAS T 세포에서 ShK-F6CA-착색의 유량 세포분석법 프로파일(profile)을 나타내는 그래프를 제공한 것이다. 비착색된 세포(흑색선) 및 ShK-F6CA로 착색된 세포(밝은 회색으로 채워진 영역). 비표지 ShK(L5)에 의한 ShK-F6CA 착색의 경쟁현상은 어두운 회색으로 채워진 영역으로 표시되어 있다.
- [0037] 도 4D는 정지(위) 및 미엘린 항원-활성화된(아래) PAS T 세포에서 Kv1.3 면역착색의 공초점 영상을 보여주는 것이다. 통계 분석은 만-위트니(Mann-Whitney) U-시험을 사용하여 수행하였다.
- [0038] 도 4E는 Con A(1  $\mu\text{g/ml}$ )로 활성화된 래트(좌측) 천연/T<sub>CM</sub> 세포(개방 기호) 및 T<sub>EM</sub> 세포(폐쇄 기호)에 의한 [<sup>3</sup>H] 티미딘 혼입율에 대한 ShK(어두운 선) 및 ShK(L5)(밝은 선)의 투여량-의존성 저해를 도시한 것이다.
- [0039] 도 4F는 MBP(미엘린 염기성 단백질)로 자극된 후 7시간 후 PAS T 세포에 의한 IL2 분비의 ShK(어두운 선) 및 ShK(L5)(밝은 선)에 의한 투여량-의존성 저해를 도시한 것이다. G, PAS T 세포(개방 기호)에 의한 미엘린-항원 유발된 [<sup>3</sup>H] 티미딘 혼입율의 ShK(L5)-유도된 저해는 20  $\mu\text{g/ml}$  IL2(폐쇄 기호)의 첨가에 의해 역전된다.
- [0040] 도 5A는 L929 세포에서 안정하게 발현된 Kv1.3 채널에 대해 측정시의 ShK(L5)의 Kv1.3 차단 활성을 보여주는 그래프이다.
- [0041] 도 5B는 4마리의 래트에서 200 mg/kg의 ShK(L5)를 단일 피하 주입한 후의 다양한 시간에서의 ShK(L5)의 혈중 수준을 보여주는 그래프이다. 혈액을 지시된 시간에 채취하고 혈청을 막전압고정법(patch-clamp)에 의해 시험하여 ShK(L5)의 양을 측정하였다.

- [0042] 도 5C는 대략 50분의 반감기를 나타내는, 도 5B의 데이터를 단일 지수함수적 감쇠로 정합시킨 그래프이다.
- [0043] 도 5D는 5일간 10  $\mu\text{g/kg/일}$ 의 ShK(L5)의 1회 1일 피하 주사액을 투여받은 5마리의 루이스(Lewis) 래트에서의 혈중 ShK(L5) 수준을 도시한 그래프이다. 혈액을 매일 아침(이전 주사후 24시간)에 채취하고 막전압고정법에 의해 Kv1.3 채널에 대한 차단 활성에 대해 시험하였다.
- [0044] 도 5E는 10 mg/kg ShK(L5)의 단일 투여량을 피하로(개방 막대; n = 4) 또는 정맥내로(폐쇄 막대; n = 4)로 투여한 후의 다양한 시간에서의 래트의 Shk(L5)의 혈청 수준을 도시한 그래프이다. 혈액을 지시된 시간에 채취하고 혈청을 막전압고정법에 의해 시험하여 혈중 ShK(L5)의 양을 측정하였다. ShK(L5)는 단일 피하 주사후 거의 24시간 동안 혈액에서 300 pM의 정지상태 수준을 유지하였다. 이러한 농도는 T<sub>EM</sub> 세포의 기능을 선택적으로 저해하기에 충분하다.
- [0045] 도 5F는 절반-차단 투여량의 ShK(L5)를 래트 혈장 또는 2% 래트 혈장을 함유하는 PBS에 첨가하고 다양한 기간 동안 37°C에서 항온처리한 후의 ShK(L5)의 회수율(%)을 도시한 그래프이다. 분취액을 지시된 시간에 취하여 Kv1.3 채널에 대한 차단 활성을 측정하였다. ShK(L5)는 혈장에서 매우 안정하였다.
- [0046] 도 6A는 EAE의 점수화된 예방 효과를 도시한 그래프이다. PAS T 세포를 시험관내에서 활성화시키고, 세척하였으며, 0일째에 복강내로 주입하였다. EAE의 임상 점수: 0 = 임상적 증후 없음, 0.5 = 늘어진 원위 꼬리, 1 = 늘어진 꼬리, 2 = 경미한 하반신마비 또는 운동실조, 3 = 중등 하반신마비, 4 = 뒷다리 완전 마비, 5 = 4 + 실금, 6 = 사망. 래트(n = 6/군)에게 비히클 단독(n = 6) 또는 ShK(L5)(n = 6; 10 mg/kg/일)를 0일 내지 5일째에 피하로 주사하였다.
- [0047] 도 6B는 EAE의 점수화된 치료 효과를 도시한 그래프이다. PAS T 세포를 시험관내에서 활성화시키고, 세척하였으며, 0일째에 복강내로 주입하였다. 10 mg/kg/일에서 ShK(L5)로의 치료는 래트가 EAE의 임상적 증후를 나타내었을 때 개시하였으며 3일간 계속하였다.
- [0048] 도 6C는 래트에서 난백알부민에 대해 야기된 DTH(지연형 과민반응) 반응의 지시자로서의 귀 두께를 도시한 그래프이다. 동물(n = 6/군)을 귀 팽윤정도를 측정한 후에, 2일간 10 mg/kg/일의 ShK(L5)로 처리하였다. 통계 분석은 만-휘트니 U-시험을 사용하여 수행하였다.
- [0049] 도 7A는 ShK(L5) 구조 및 ShK(L5) 농도의 함수로서 T<sub>EM</sub> 세포에서의 Kv1.3 채널 저해를 보여주는 그래프를 도시한 것이다. 각 데이터-점은 3가지 측정치의 평균을 나타낸다.
- [0050] 도 7B는 Kv1.3-함유 신호전달 복합체의 다이어그램이다.
- [0051] 도 7C는 IS에서의 CD4, Kv1.3, Kv $\beta$ 2, SAP97, ZIP 및 p56<sup>lck</sup>의 공-편재화를 도시한 것이다.
- [0052] 도 7D는 육안상 T<sub>EM</sub>-APC 접촉의 부재하의 CD4 및 Kv1.3 착색을 도시한 것이다.
- [0053] 도 7E는 MBP-로딩된 APC에 노출된 GAD65-특이적 T<sub>EM</sub> 세포에서의 CD4 및 Kv1.3 착색을 도시한 것이다.
- [0054] 도 7F는 100 nM의 ShK(L5)가 IS 형성을 방해하지 않음을 보여준다.
- [0055] 도 7G는 100 nM의 ShK(L5)가 IS를 파괴하지 않음을 보여준다.
- [0056] 도 8A는 0.1 nM(어두운 회색), 1 nM(중간 회색) 또는 100 nM(밝은 회색)의 ShK(L5)의 부재(흑색) 또는 존재하에 항-CD3 + 가교결합성 2차 항체(화살)에 의해 유발된 3명의 T1DM 환자로부터의 GAD-특이적 T<sub>EM</sub> 세포에서의 칼슘 신호전달을 나타낸 그래프이다.
- [0057] 도 8B는 천연/T<sub>CM</sub> 세포 및 T<sub>EM</sub> 세포(좌측) 및 T1DM 및 RA 환자로부터의 천연/T<sub>CM</sub> 세포-이펙터들 및 T<sub>EM</sub> 세포-이펙터우측)에 의한 [<sup>3</sup>H]-티미딘 혼입율을 보여주는 그래프이다. T<sub>EM</sub> 세포: 3명의 T1DM 환자들로부터의 GAD65-활성화된 T<sub>EM</sub> 클론 및 3명의 RA 환자들로부터의 항-CD3 항체 활성화된 SF-T<sub>EM</sub> 세포. 천연/T<sub>CM</sub> 세포: 동일한 3명의 RA 환자들로부터의 항-CD3 항체-활성화된 PB-천연/T<sub>CM</sub> 세포.
- [0058] 도 8C는 도 8B에서 사용된 T<sub>EM</sub> 및 천연/T<sub>CM</sub> 세포에 의한 사이토킨 생산을 보여주는 일련의 막대 그래프이다.
- [0059] 도 8D는 MS, T1DM 및 RA에서 질환-관련 및 질환-비관련 자가반응성 T 세포의 표현형을 도시한 것이다.

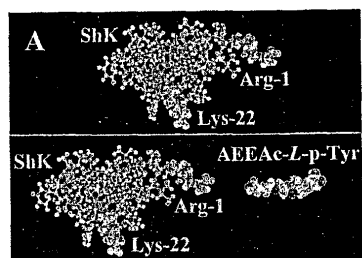
- [0060] 도 8E는 칼슘 신호전달, 림프구 증식 및 사이토킨 생산을 저해하지만 IS 형성은 저해하지 않는 방식을 보여주는 다이어그램이다.
- [0061] 도 9는 이펙터 기억 T 세포에 의해 야기된 지연형 과민반응(DTH)의 래트 모델을 나타내는 다이어그램이다.
- [0062] 도 10은 이펙터 기억 T 세포에 의해 야기된 지연형 과민반응(DTH)의 래트 모델에서 ShK(L5)에 대한 치료 프로토콜을 보여주는 다이어그램이다.
- [0063] 도 11은 천연 및 중앙 기억 T 세포 또는 B 세포의 기능을 손상시키지 않으면서 ShK(L5)에 의한 래트에서의 생체 내 이펙터 기억 반응의 특이적 억제를 나타내는 다이어그램이다.
- [0064] 도 12A는 신규 발병 1형 당뇨병(T1DM)환자, 건강한 대조군 및 다발성 경화증 환자로부터 유래한 GAD65-, 인슐린 및 미엘린-특이적 T 세포에서의 Kv1.3 전류(위) 및 채널수/세포(아래)를 도시한 것이다.
- [0065] 도 12B는 이들 환자들 유래의 개개의 T 세포의 Kv1.3 착색(위) 및 형광 세기(아래)를 도시한 것이다.
- [0066] 도 12C는 상대적 세포수 대 CCR7 착색 강도의 그래프를 도시한 것이다. Kv1.3을 고도로 발현하는 세포는 CCR7-음성이다. 즉, 이들은 T<sub>EM</sub>-이펙터이다. Kv1.3을 저도로 발현하는 세포는 CCR7-양성이다. 즉, 이들은 천연 또는 T<sub>CM</sub> 세포이다.
- [0067] 도 12D는 T1DM 및 MS를 갖는 환자(좌측), 5년 초과 기간 동안 T1DM을 가진 환자(중간) 및 비-자가면역 2형 DM을 갖는 환자 유래의 자가반응성 T 세포에서의 Kv1.3 수/세포를 도시한 것이다.
- [0068] 도 12E는 신규 발병 T1DM을 갖는 환자 유래의 CD4<sup>+</sup>GAD65-4량체<sup>+</sup> T 세포에서의 Kv1.3 수를 도시한 것이다.
- [0069] 도 13A는 RA 환자의 말초 T 세포, 혈액 및 윤활액 T 세포 및 OA(골다공증) 환자의 윤활액 T 세포에서의 세포당 Kv1.3 채널수를 도시한 것이다.
- [0070] 도 13B는 도 13A에 도시된 세포에서의 Kv1.3(밝은 회색) 및 Kvβ2(더 어두운 회색) 착색의 공초점 영상을 보여준다.
- [0071] 도 13C는 상대적 세포수 대 CCR7 착색 강도의 그래프를 도시한 것이다.
- [0072] 도 13D는 항-CD3 또는 항-Kv1.3 항체로 착색되고 헤마톡실린/에오신으로 역-착색된(40X) RA 및 OA 환자 유래 윤활막의 현미경사진(위) 및 염증 지수의 막대 그래프(아래)를 보여준다.

도면

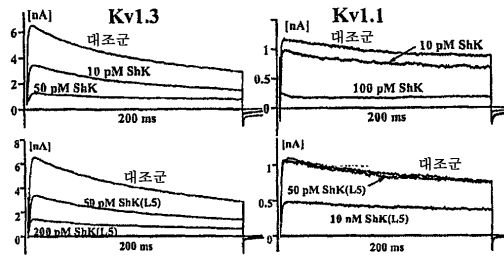
도면1



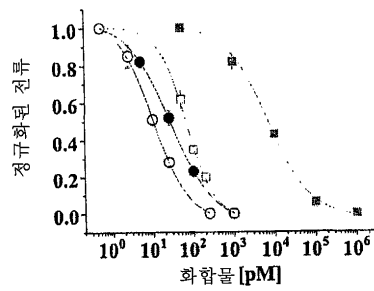
도면2A



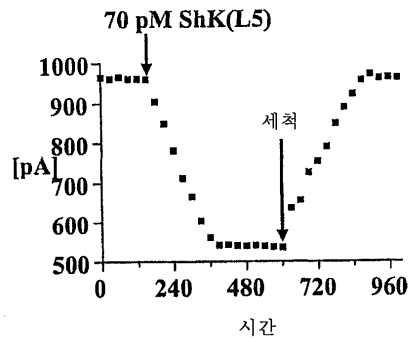
도면2B



도면2C



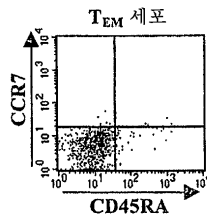
도면2D



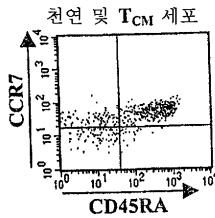
도면2E

화합물	2번 위치에서 결합된 잔기	2번 위치에서의 순 전하	Kv1.3에 대한 $K_d$ [pM]	Kv1.1에 대한 $K_d$ [pM]	$K_d$ 의 비
ShK	없음	없음	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 모노메틸	-1	10 ± 1	112 ± 9	11.2
ShK(L7)	L-p-Tyr 디메틸	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 모노메틸	-1	311 ± 16	1,100 ± 100	3.5
ShK(L3)	L-Pmp 디메틸	0	71 ± 6	1,100 ± 200	15.5
ShK(D3)	D-Pmp 디메틸	0	70 ± 9	166 ± 13	2.4
ShK(L9)	L-p-COOH-Phe	-1	94 ± 7	319 ± 36	3.4
ShK-L8	L-p-아미노-Phe	+1	65 ± 4	142 ± 13	2.2
ShK-F6CA	F6CA	-1	48 ± 4	4,000 ± 300	83
ShK-Dap <sup>zz</sup>	없음	없음	52 ± 3	1,800 ± 577	35

도면3A

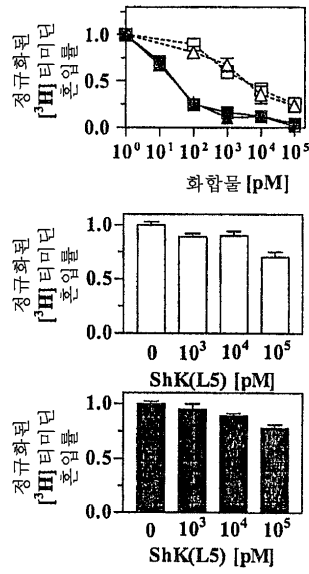


도면3B

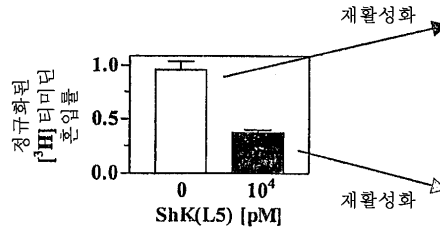




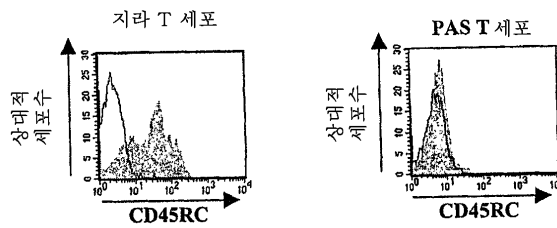
도면3C



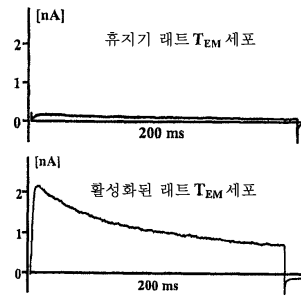
도면3D



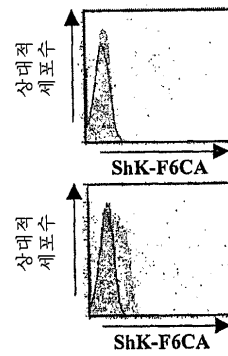
도면4A



도면4B



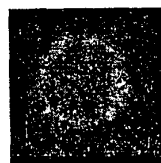
도면4C



도면4D

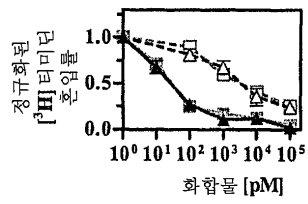


Kv1.3

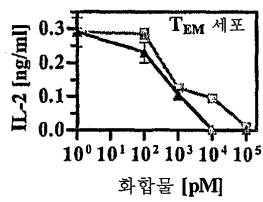


Kv1.3

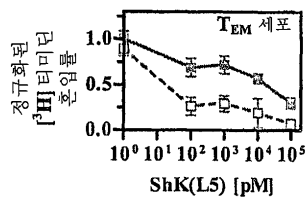
도면4E



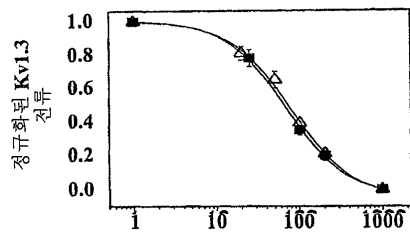
도면4F



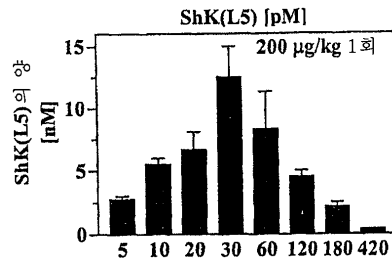
도면4G



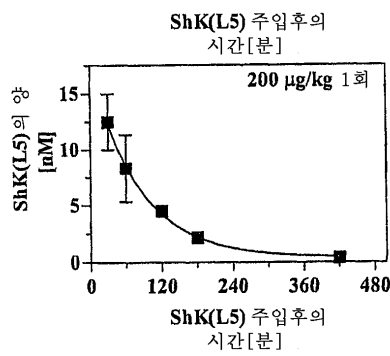
도면5A



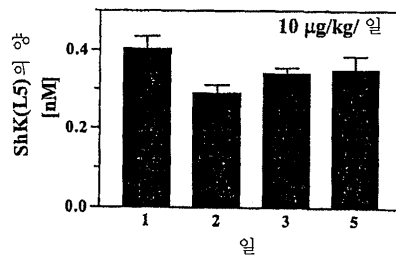
도면5B



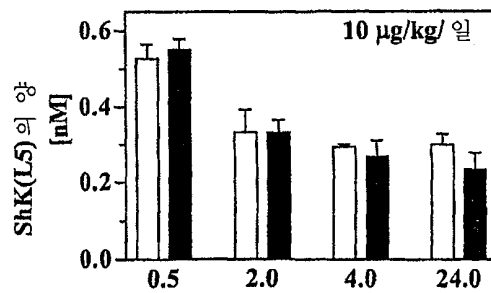
도면5C



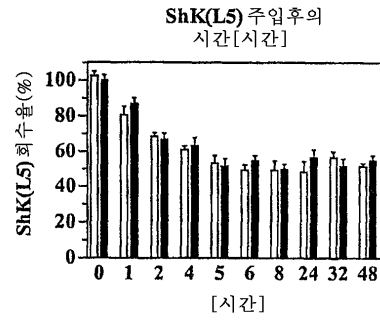
도면5D



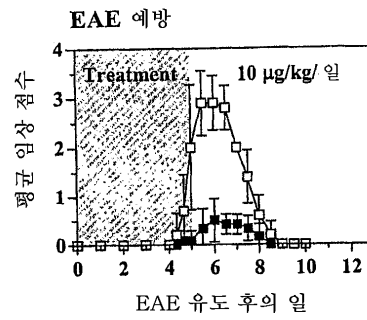
도면5E



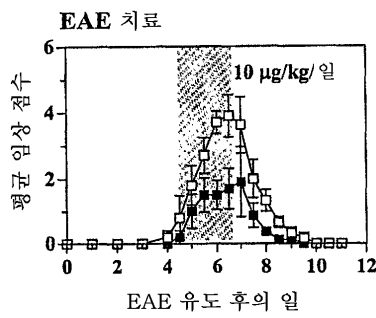
도면5F



도면6A

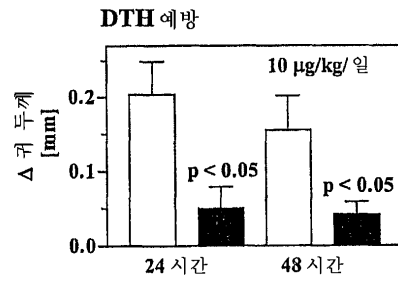


도면6B

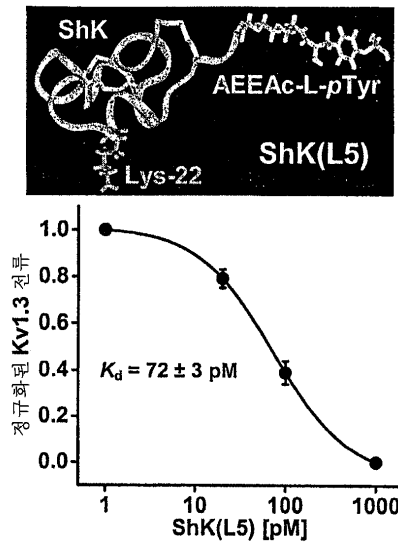




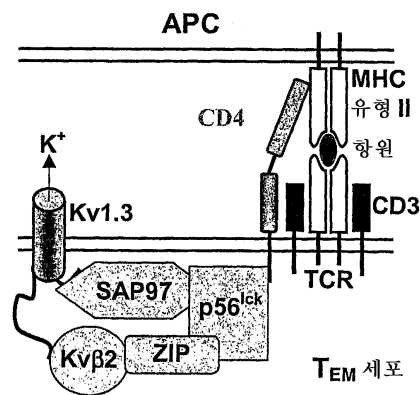
도면6C



도면7A

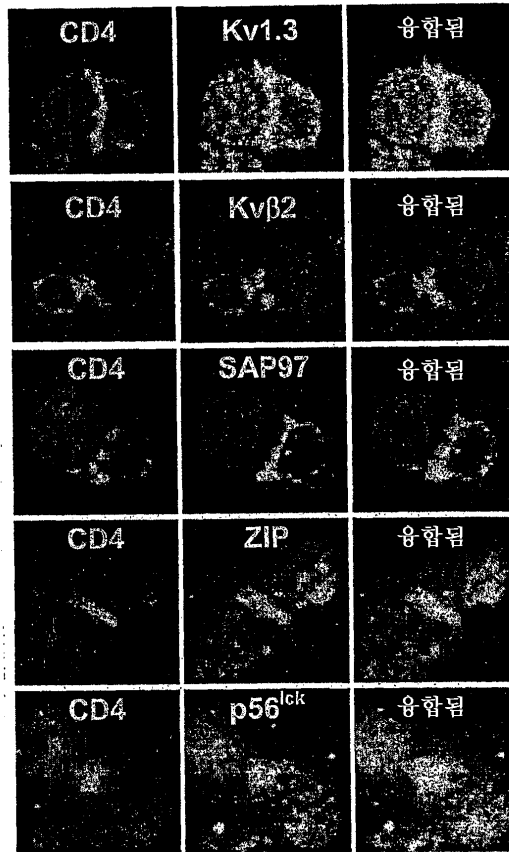


도면7B



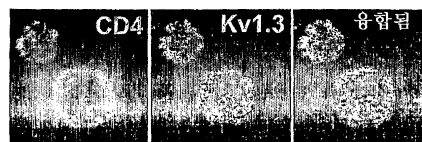
도면7C

GAD557I 및 DAPI로 로딩된 APC



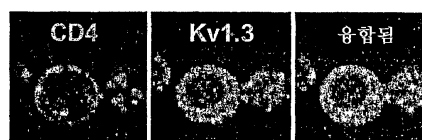
도면7D

GAD557I 및 DAPI로 로딩된 APC  
T 및 B 세포 사이의 접촉 없음



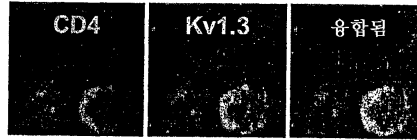
도면7E

MBP 및 DAPI로 로딩된 APC



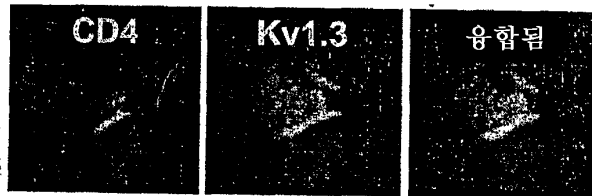
도면7A

GAD557I 및 DAPI로 로딩된 APC  
ShK(L5)는 IS 형성을 방지하지 않는다

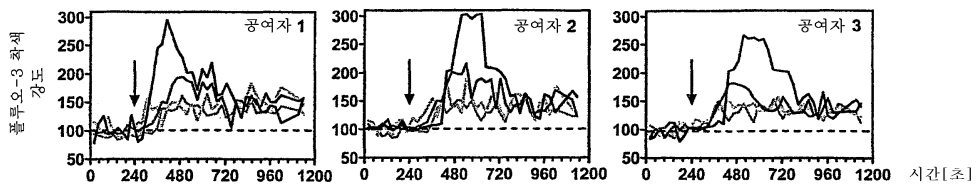


도면7G

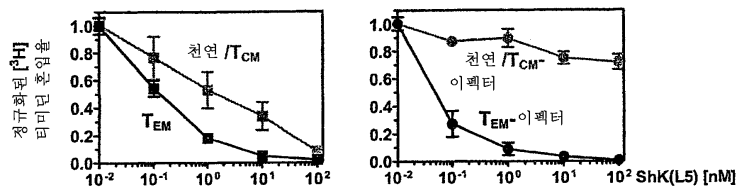
GAD557I 및 DAPI로 로딩된 APC  
ShK(L5)는 IS를 파괴하지 않는다



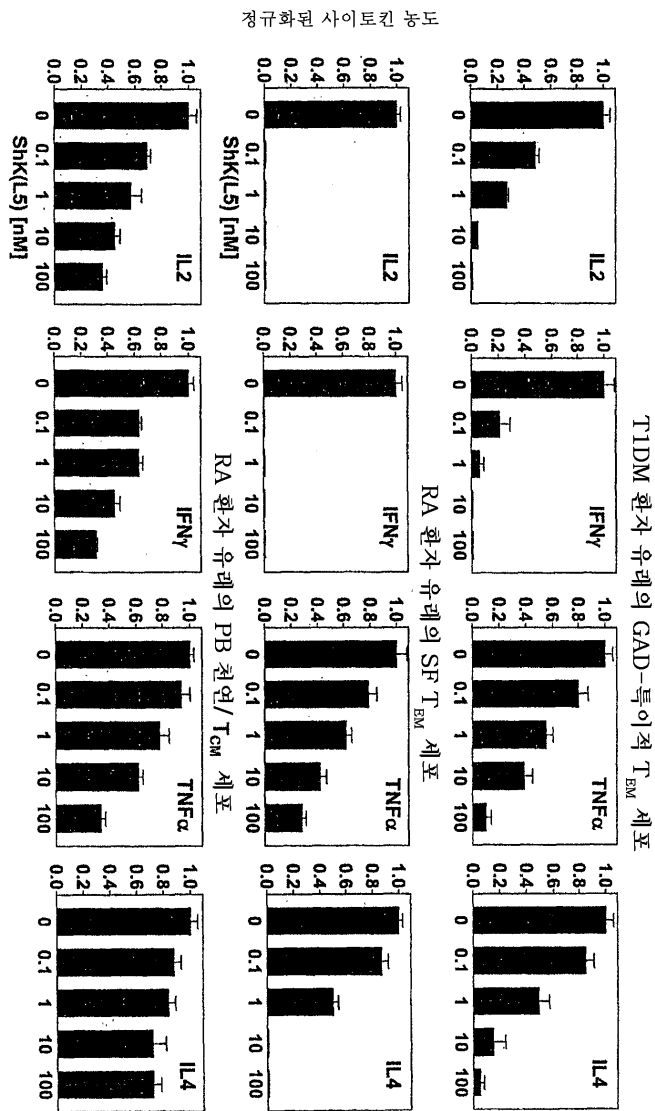
도면8A



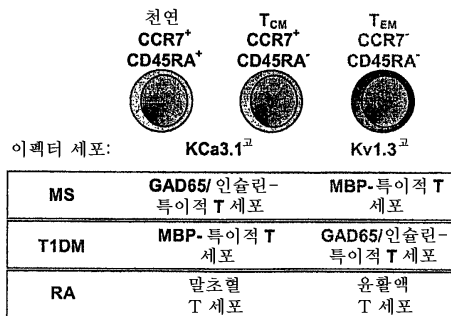
도면8B



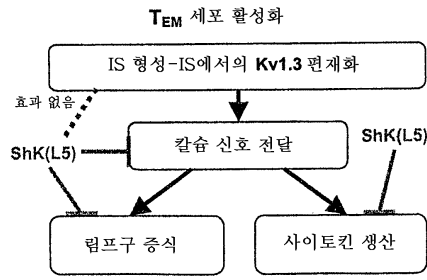
도면8C



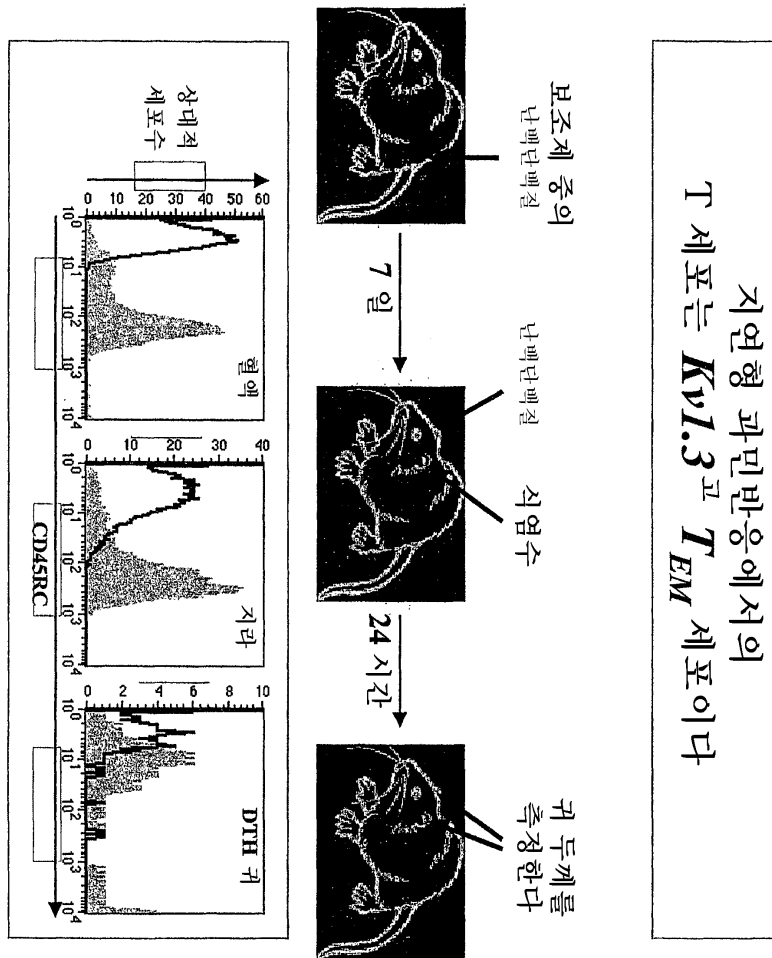
도면8D



도면8E

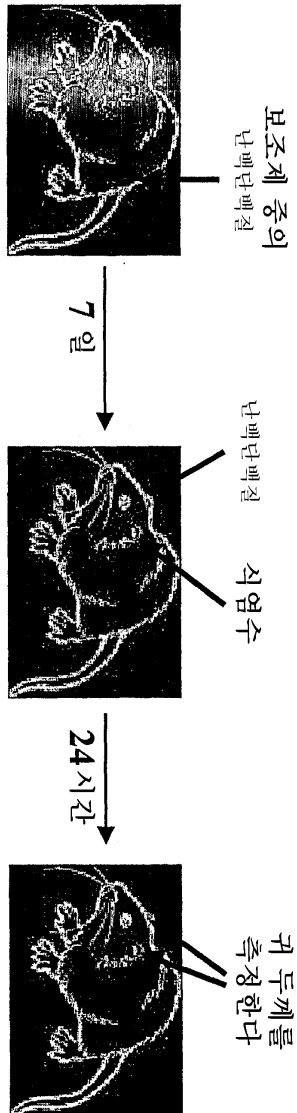


도면9





**Shk(L5)**는 지연형 과민반응을  
방해할 수 있는가?



**예방**  
포라이밍 시기(0-7일)

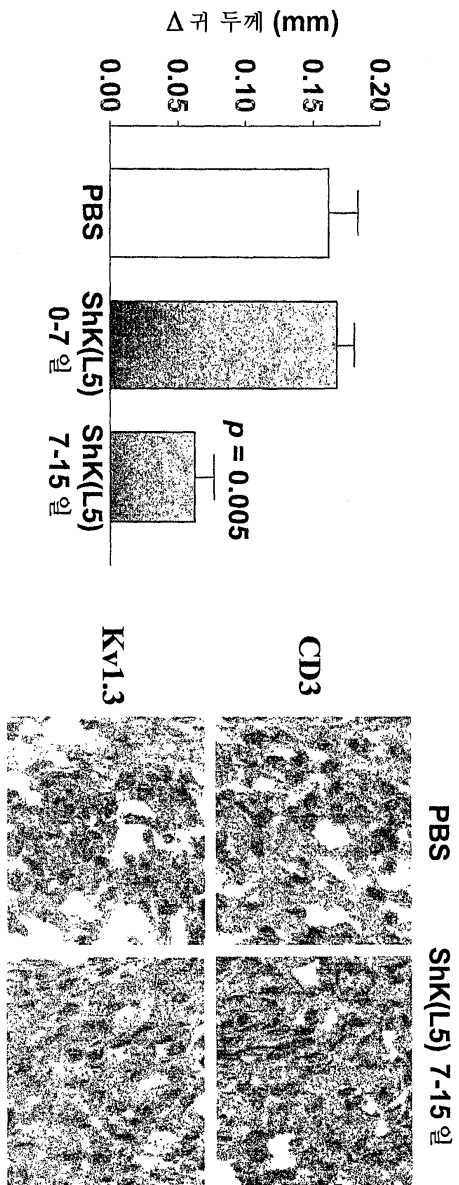
**치료**  
이펙터 시기(8-14일)

**T<sub>EM</sub>** 세포의 생성

**T<sub>EM</sub>** 세포의 기능

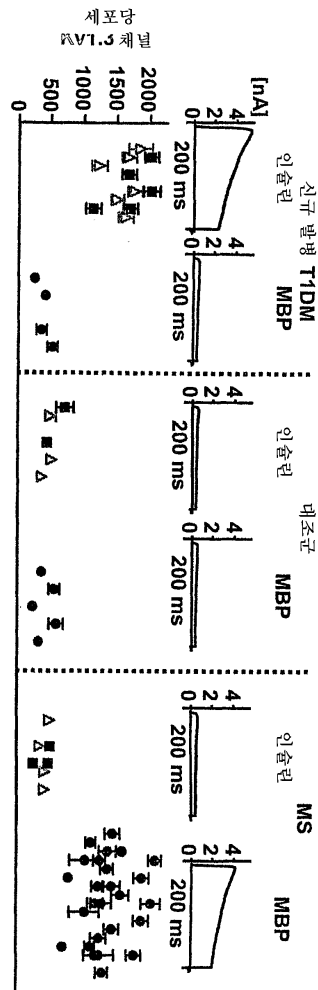
도면10

도면11

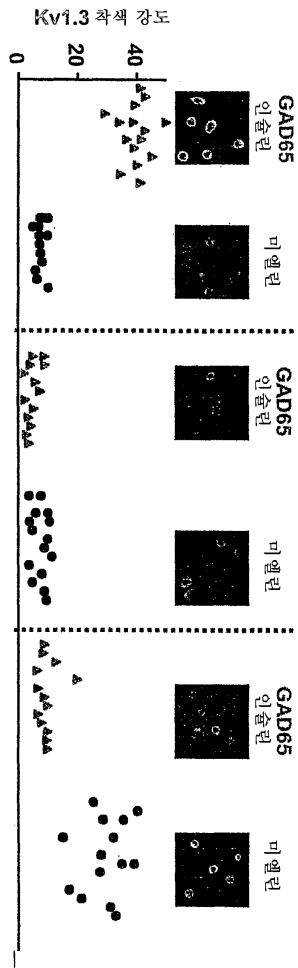


**ShK(L5) [110  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ]은 DTH의 이펙터 시기를 방해하지만, 프라이밍 시기는 방해하지 않는다**

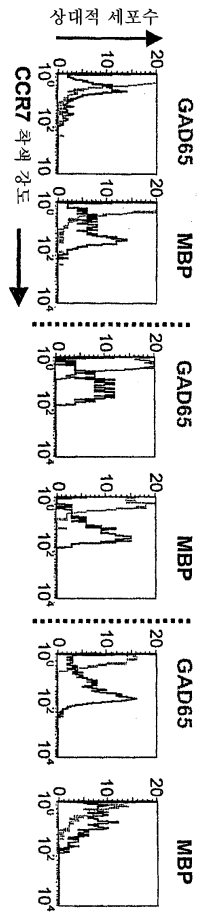
도면12A



도면12B

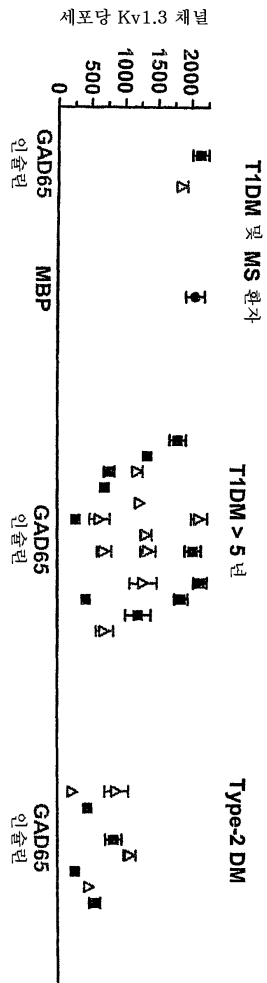


도면12C

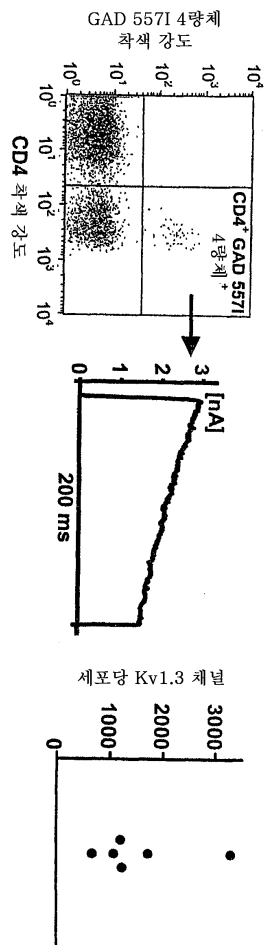




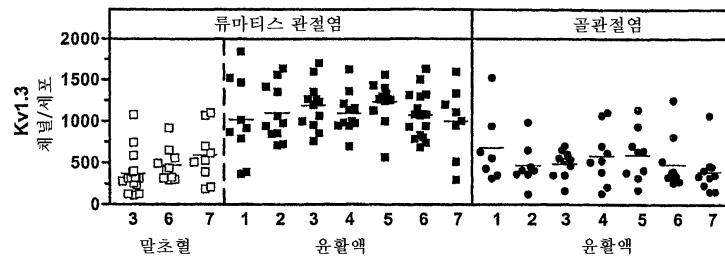
도면12D



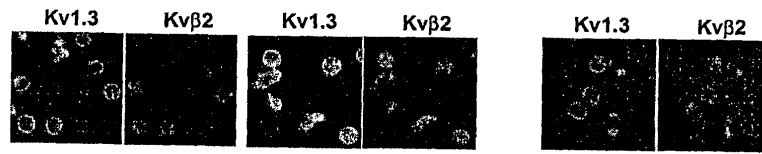
도면12E



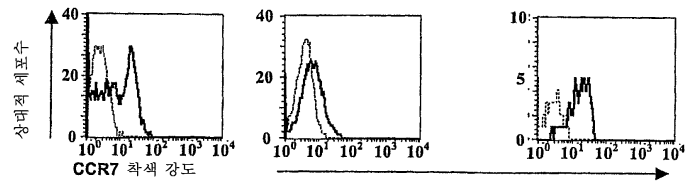
도면13A



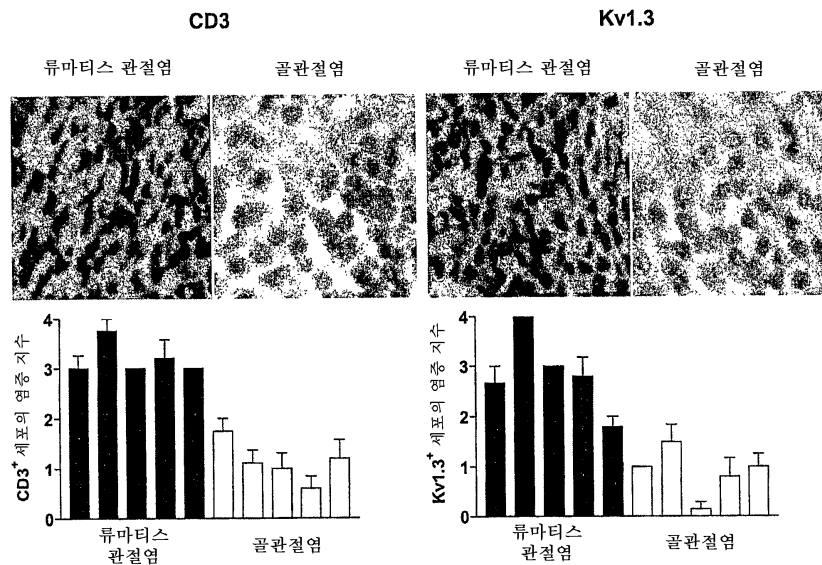
도면13B



도면13C



도면13D



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> CHANDY, GEORGE K.  
 BEETON, CHRISTINE  
 PENNINGTON, WILLIAM MICHAEL

<120> ANALOGS OF SHK TOXIN AND THEIR USES IN SELECTIVE INHIBITION OF  
 KV1.3 POTASSIUM CHANNELS

<130> UCIVN-066US

<140> 11/663,398

<141> 2007-08-16

<150> PCT/US2005/036234

<151> 2005-10-07

<150> 60/617,395

<151> 2004-10-07

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 35

<212> PRT

<213> *Stichodactyla helianthus*

<400> 1

Arg Ser Cys Ile Asp Thr Ile Pro Lys Ser Arg Cys Thr Ala Phe Gln  
1                    5                                    10                                    15

Cys Lys His Ser Met Lys Tyr Arg Leu Ser Phe Cys Arg Lys Thr Cys  
                  20                                    25                                    30

Gly Thr Cys  
          35

<210> 2

<211> 37

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> p-phospho-Tyr

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> AEEAc

<400> 2  
 Tyr Xaa Arg Ser Cys Ile Asp Thr Ile Pro Lys Ser Arg Cys Thr Ala  
 1                   5                   10                   15

Phe Gln Cys Lys His Ser Met Lys Tyr Arg Leu Ser Phe Cys Arg Lys  
                   20                   25                   30

Thr Cys Gly Thr Cys  
                   35

<210> 3  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (1)..(1)  
 <223> p-phospho-Tyr

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> AEEAc

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (37)..(37)  
 <223> C-term amidated

<400> 3  
 Tyr Xaa Arg Ser Cys Ile Asp Thr Ile Pro Lys Ser Arg Cys Thr Ala  
 1                   5                   10                   15

Phe Gln Cys Lys His Ser Met Lys Tyr Arg Leu Ser Phe Cys Arg Lys  
                   20                   25                   30

Thr Cys Gly Thr Cys  
                   35

<210> 4  
 <211> 37  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: Synthetic  
                   polypeptide

<220>  
 <221> MOD\_RES  
 <222> (2)..(2)  
 <223> AEEAc

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (37)..(37)  
 <223> C-term amidated

<400> 4  
 Tyr Xaa Arg Ser Cys Ile Asp Thr Ile Pro Lys Ser Arg Cys Thr Ala  
 1                   5                   10                   15

Phe Gln Cys Lys His Ser Met Lys Tyr Arg Leu Ser Phe Cys Arg Lys  
                   20                   25                   30

Thr Cys Gly Thr Cys  
                   35