

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **037308**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.03.10

(51) Int. Cl. **C12P 19/34** (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(21) Номер заявки
201591380

(22) Дата подачи заявки
2014.01.24

(54) ВЫДЕЛЕННЫЙ ПЕПТИДНЫЙ АНТАГОНИСТ ПОТЕНЦИАЛ-ЗАВИСИМОГО КАЛИЕВОГО КАНАЛА Kv1.3

(31) 61/756,777; 61/757,389

(32) 2013.01.25; 2013.01.28

(33) US

(43) 2015.12.30

(86) PCT/US2014/012932

(87) WO 2014/116937 2014.07.31

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ЯНССЕН БАЙОТЕК, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Чи Эллен, Эдвардс Уилсон, Хуан
Чичи, Леунг Вай-Пин, Свансон
Роналд, Уикенден Алан (US)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) US-A1-20110045587
ALPHONSE, S., et al. Solution Structure
Of Two Analogues Of The Osk1 Toxin.
NCBI PDB Accession No. 2CK4_A, Chain
A, Solution Structure Of Aosk1. Submitted
10 April 2006; downloaded from the
internet [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/159163804?report=genbank&log\\$=protalign
&blast_rank=3&RID=HHCJJOREO1R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/159163804?report=genbank&log$=protalign&blast_rank=3&RID=HHCJJOREO1R) on 06 March
2014, page 1
US-A1-20110236461

(57) Изобретение относится к выделенному пептидному антагонисту потенциал-зависимого калиевого канала Kv1.3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и его применению для подавления Т-клеточной активации у субъекта, имеющего состояние, связанное с нежелательной Т-клеточной активацией, а также описываются выделенный полинуклеотид, вектор, клетка-хозяин, способ получения выделенного антагониста, фармацевтическая композиция, способ подавления Т-клеточной активации.

B1

037308

037308

B1

Настоящая заявка испрашивает преимущество по предварительной заявке на патент США № 61/757389, поданной 28 января 2013 г., и предварительной заявке на патент США № 61/756777, поданной 25 января 2013 г., которые полностью включены в настоящий документ путем ссылки.

Область применения изобретения

Настоящее изобретение относится к антагонистам Kv1.3, кодирующим их полинуклеотидам, а также способам их получения и применения. Антагонисты основаны на вариантах пептида OdK2.

Предпосылки создания изобретения

Ионные каналы посредством генерирования ионных токов регулируют множество клеточных функций, включая физиологию сердца, ЦНС и иммунной системы. Согласно оценкам 5-30% присутствующих на рынке лекарственных средств могут регулировать активность ионных каналов (Overington et al., *Nat. Reviews Drug Discovery* 5:993-6, 2006). Селективность к подсемейству является желаемым элементом новых терапевтических средств, улучшающим эффективность и безопасность имеющихся неселективных лекарственных средств, и представляет собой серьезную проблему для малых молекул и известных встречающихся в природе пептидных токсинов (Wickenden et al., *Future Med. Chem.* 4:661-79, 2012). Особенно это касается больших гомологичных семейств, таких как потенциал-зависимые K⁺, Ca⁺ и Na⁺ каналы.

Kv1.3, член 3 подсемейства А калиевого потенциал-зависимого канала, экспрессируется на Т-клетках и регулирует Т-клеточную активацию. Непрерывная кальциевая сигнализация требуется для Т-клеточной активации с целью положительной регуляции маркеров клеточной поверхностной активации и увеличения продукции цитокина и пролиферации посредством кальциейрин-зависимого дефосфорилирования и ядерной транслокации ядерного фактора активированных Т-клеток (NFAT). Инозитолтрифосфат-(IP3)-зависимое высвобождение внутренних кальциевых резервов из эндоплазматического ретикулума активирует активируемые высвобождением кальция кальциевые каналы (CRAC) на поверхности клеток, обеспечивая приток внеклеточного кальция и непрерывную кальциевую сигнализацию (обзор в Cahalan et al., *Immunol. Rev.* 231:59-87, 2009). Отток калия требуется для сохранения клеток в гиперполяризованном состоянии и поддержания притока кальция с целью полной Т-клеточной активации. Такой отток калия, по всей видимости, регулируется посредством потенциал-зависимого калиевого канала Kv1.3 и кальций-активируемого калиевого канала KCa3.1. Селективные к Kv1.3 блокаторы продемонстрировали, что Kv1.3 представляет собой калиевый канал, ответственный за регулирование кальциевой сигнализации, даже при отсутствии какого-либо ингибирования KCa3.1. (Beeton et al., *Mol. Pharmacol.* 67:1369-81, 2005). Блокирование Kv1.3 деполяризует Т-клетки и ингибирует проникновение кальция, продукцию цитокинов и пролиферацию активированных Т-клеток *in vitro* (обзор в Cahalan et al., *Immunol Rev.* 231:59-87, 2009).

Показано, что блокаторы Kv1.3 снижают зависимое от Т-клеток прогрессирование заболевания в аутоиммунных моделях, таких как экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (ЕАЕ), экспериментальный артрит, гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ), аллергический контактный дерматит и гломерулонефрит (Rangaraju et al., *Expert Opin. Ther. Targets* 13:909-24, 2009; Beeton et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103:17414-9, 2006; Koo et al., *J. Immunol.* 158:5120-8, 1997; Hyodo et al., *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 299:F1258-69, 2010). Ингибиторы пути кальций-кальциейрин-NFAT циклоспорин А (Neoral, Sandimmune, Gengraf) и такролимус (FK-506 или фуджимицин) представляют собой лекарственные средства, одобренные для лечения тяжелых иммунных расстройств, включая отторжение трансплантата и тяжелый ревматоидный артрит. Широкое распространение кальциейрина в таких тканях, как почки может привести к более высокой степени основанной на данном механизме токсичности, узкому диапазону безопасности и ограниченному терапевтическому применению данных композиций. Т-клеточное ингибирование при помощи селективных блокаторов Kv1.3 может привести к улучшенному профилю безопасности и повышенной эффективности лечения опосредованных Т-клетками воспалительных и аутоиммунных заболеваний.

Kv1.3 может участвовать в регулировании набора массы тела и улучшении чувствительности к инсулину. Мыши с недостаточностью Kv1.3 демонстрируют сниженный набор массы тела, повышенную чувствительность к инсулину и сниженные уровни глюкозы в плазме (Xu et al., *Hum. Mol. Genet.* 12:551-9, 2003). Показано, что блокаторы Kv1.3 увеличивают экспрессию на поверхности клеток переносчика глюкозы 4 (GLUT4) в скелетных мышцах и жировой ткани и приводят к увеличению чувствительности к инсулину у нормальных мышей и мышей линии ob/ob, страдающих ожирением, а также увеличивают потребление глюкозы в первичных адипоцитах *in vitro* (Xu et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101:3112-7, 2004). У людей однонуклеотидный полиморфизм (SNP) в гене Kv1.3 связан со сниженной чувствительностью к инсулину и нарушенной толерантностью к глюкозе (Tschritter, *Clin. Endocrinol. Metab.* 91:654-8, 2006).

Kv1.3 может выполнять важную функцию при пролиферативных расстройствах гладких мышц, таких как рестеноз у пациентов после хирургического вмешательства на сосудах, например ангиопластики. Экспрессия Kv1.3 увеличивается в пролиферирующих гладкомышечных клетках человека и мыши. Блокаторы Kv1.3 ингибируют проникновение кальция, снижают миграцию гладкомышечных клеток и ингибируют гиперплазию неоинтимы в образцах вен человека *ex vivo* (Cheong et al., *Cardiovasc Res.* 89:282-9, 2011).

Появляется все больше доказательств того, что каналы Kv1.3 участвуют в активации и/или пролиферации многих типов клеток, включая опухолевые клетки (Bielanska et al., *Curr. Cancer. Drug Targets* 9:904-14, 2009), микроглию (Khanna et al., *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 280:C796-806, 2001), и дифференциации клеток-предшественников нейронов (Wang et al., *J. Neurosci* 30:5020-7, 2010), указывающих, что блокаторы Kv1.3 могут быть полезными в лечении нейровоспалительных и нейродегенеративных и раковых заболеваний.

Пептидные токсины, продуцируемые различными организмами, способны оказывать целевое воздействие на ионные каналы. Змеи, скорпионы, пауки, пчелы, улитки, актинии, насекомые, паукообразные, кишечнополостные, рептилии и моллюски представляют собой несколько примеров организмов, которые продуцируют яд, способный выступать в качестве богатого источника малых биоактивных пептидных токсинов или "токсинов", которые оказывают мощное и селективное целевое воздействие на ионные каналы и рецепторы. В большинстве случаев эти пептидные токсины выступают в качестве мощных антагонистов или ингибиторов ионных каналов посредством связывания с порой канала и физиологической блокировки пути ионной проводимости или посредством обеспечения антагонизма с функцией канала путем связывания с областью за пределами поры (например, потенциал-чувствительный домен). Пептидные токсины обычно имеют длину приблизительно 20-80 аминокислот с четким спариванием с помощью дисульфидной связи, и их можно разделить на ряд суперсемейств на основании их дисульфидных соединений и сложений пептидов. Разрабатывается множество ядовитых токсинов с целью улучшения таких свойств, как селективность (King, *Expert Opin. Biol. Ther.* 11:1469-84, 2011; Escoubas and King, *Expert Review Proteomics* 6:221-4, 2009).

Пептидные яды, вызывающие блокировку Kv1.3, включают ShK, OdK2, OsK1, маргатоксин, калиотоксин и т.д. (см. Chandy et al., *Trends in Pharmacol Sci.* 25:280-9, 2004). Блокаторы Kv1.3, OdK2 и OsK1 (α -КТх3,7) представляют собой гомологичные члены семейства токсинов скорпиона α -КТх3 из ядов *Odontobuthus doriae* и *Orthochirus scrobiculosus* соответственно (Abdel-Mottaleb et al., *Toxicon* 51:1424-30, 2008; Mouhat et al., *Biochem J.* 385(Pt 1):95-104, 2005; *Int. Pat. Publ. № WO 2006/002850*). Было зарегистрировано, что OsK1 (α -КТх3,7) сильно блокирует каналы Kv1.3, Kv1.1 и Kv1.2 и умеренно канал KCa3.1 (Mouhat et al., *Biochem. J.* 385(Pt 1):95-104, 2005). Было зарегистрировано, что OdK2 (α -КТх3.11) блокирует Kv1.3, при этом не действует на Kv1.1, Kv1.2, Kv1.4, Kv1.5 и Kv1.6 (Abdel-Mottaleb et al., *Toxicon* 51:1424-30, 2008; *Epub 2008 Mar 29*).

Сообщалось о разработке пептидных токсинов с увеличенной активностью, селективностью и/или периодом полужизни, включая OsK1 и ShK (публикация международной заявки на патент № WO 2006/002850; публикация международной заявки на патент № WO 2006/042151; публикация международной заявки на патент № WO 2008/088422; публикация международной заявки на патент № WO 2006/116156).

Существует необходимость в более сильных и селективных блокаторах Kv1.3 для терапевтического лечения Kv1.3-опосредованных заболеваний, таких как опосредованные Т-клетками воспалительные и аутоиммунные заболевания, например волчанка и рассеянный склероз.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - выравнивание аминокислотной последовательности нативного OdK2 (SEQ ID NO: 1) и OsK1 (SEQ ID NO: 2) (на фигуре показан как OsK-1). Остатки цистеина выделены серым. Показаны дисульфидные мостики и цистеиновые пары. Девять расходящихся остатков между OdK2 и OsK1 выделены черным;

фиг. 2 - связывание А) KV1C2 (слияние Odk2-Fc); и В) KV1N2 (слияние OsK1-Fc) с клетками Kv1.3 E3C (площадная черная), клетками Kv1.3 E3C в присутствии 10-кратного избытка ShK (прерывистая серая) и с Kv1.5 (клетки отрицательного контроля; пунктирная серая). С помощью проточной цитометрии обнаружено связывание с антителами Fc-Cy5 к антителам человека. Данные приведены в виде наложенных гистограмм геометрического среднего интенсивности флуоресценции (GMFI) (Geom. Mean, Red A: Cy5);

фиг. 3 - ингибирование пролиферации Т-клетки памяти с помощью KV1C2 (слияние Odk2-Fc) (▼). Каждое значение представляет собой среднее \pm стандартное отклонение (СО) трех параллельных взаимодействий. IgG4 Fc (○) отрицательного контроля не ингибировали Т-клеточную пролиферацию;

фиг. 4 А) - аминокислотные последовательности, В) активность и селективность слитых белков с пептидными вариантами, определенные в анализах связывания и потока таллия с использованием клеток, экспрессирующих Kv1.3 и Kv1.1;

фиг. 5 А) - ингибирование Т-клеточной активации с помощью очищенных химерных слитых белков Fc Odk2 в одной концентрации 100 нМ. KV1B03 (■) идентичен KV1C2 (слияние Odk2 Fc) (□); В) зависимость от концентрации ингибирование Т-клеточной активации с помощью KV1D261. IgG4 Fc отрицательного контроля не ингибировали продукцию Т-клетками IL-2; С) корреляция между связыванием с клетками Kv1.3 E3C и ингибированием Т-клеток для выбранных вариантов;

фиг. 6 - библиотека активности слитого белка HSA с С-концевым удлинением p261. Показаны аминокислотные последовательности С-концевых удлинений и полученные удлиненные аминокислотные

последовательности p261 вместе с активностью в анализах связывания и потока таллия;

фиг. 7 - описание характеристик слитых белков HSA с С-концевым удлинением А) p261; В) p579;

фиг. 8 - характеристики слитых белков с выбранным вариантом OdK2;

фиг. 9 - фармакокинетика KV1D261_34 у карликовых свиней;

фиг. 10 - ингибирование ex vivo секреции IL-17A из лимфоцитов у карликовых свиней после введения KV1D261_34 in vivo;

фиг. 11 - количество клеток из дренирующих лимфатических узлов на 10 день после антигенной стимуляции в модели гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) у карликовых свиней.

Изложение сущности изобретения

В настоящем изобретении предложен выделенный пептидный антагонист потенциал-зависимого калиевого канала Kv1.3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.

В настоящем изобретении также предложены слитые белки, содержащие пептидный антагонист настоящего изобретения.

В настоящем изобретении также предложен выделенный полинуклеотид, кодирующий пептидный антагонист или слитый белок настоящего изобретения.

В настоящем изобретении также предложен вектор, содержащий выделенный полинуклеотид настоящего изобретения.

В настоящем изобретении также предложена клетка-хозяин, содержащая вектор настоящего изобретения.

В настоящем изобретении также предложен способ получения антагониста или слитого белка настоящего изобретения, включающий культивирование клетки-хозяина настоящего изобретения и выделение антагониста или слитого белка, экспрессируемого клеткой-хозяином.

В настоящем изобретении также предложена фармацевтическая композиция, содержащая антагонист или слитый белок настоящего изобретения и фармацевтически приемлемый носитель.

В настоящем изобретении также предложен способ подавления Т-клеточной активации у субъекта, имеющего состояние, связанное с нежелательной Т-клеточной активацией, включающий введение субъекту эффективного количества антагониста или слитого белка настоящего изобретения для подавления Т-клеточной активации.

Подробное описание изобретения

Все публикации, упоминаемые в данном описании, включая, без ограничений, патенты и патентные заявки, упоминаемые в настоящем описании, являются частью настоящего документа, как если бы они были изложены непосредственно в настоящем документе.

Используемые в настоящем описании и в формуле изобретения формы единственного числа включают ссылки на множественные объекты, если иное не следует явно из контекста.

Все используемые в настоящем документе технические и научные термины, если только не дано иное их определение, имеют общепринятое значение, понятное любому специалисту в области настоящего изобретения. В настоящем документе описаны примеры композиций и способов, хотя для проверки или реализации на практике настоящего изобретения могут быть использованы любые композиции и способы, подобные или эквивалентные описанным в настоящем документе.

Термин "полипептид" обозначает молекулу, содержащую по меньшей мере два аминокислотных остатка, связанных пептидной связью с образованием полипептида. Полипептиды, содержащие менее чем приблизительно 80 аминокислот, могут называться "пептидами". Полипептиды могут также называться "белками".

Термин "полинуклеотид" означает молекулу, содержащую цепь нуклеотидов, ковалентно связанных через сахарофосфатную основную цепь или другую эквивалентную ковалентную химическую структуру. Двухцепочечные и одноцепочечные молекулы ДНК и РНК представляют собой типичные примеры полинуклеотидов.

Термин "комплементарная последовательность" обозначает вторую выделенную полинуклеотидную последовательность, антипараллельную первой выделенной полинуклеотидной последовательности и содержащую нуклеотиды, комплементарные нуклеотидам первой полинуклеотидной последовательности.

Термин "вектор" обозначает полинуклеотид, способный к воспроизведению в биологической системе, или полинуклеотид, который можно переместить между такими системами. Полинуклеотиды-векторы, как правило, содержат элементы, такие как точки начала репликации, сигнал полиаденилирования или маркеры выбора, способствующие удвоению или сохранению данных полинуклеотидов в биологической системе. Примеры таких биологических систем могут включать клетку, вирус, животное, растение и реконструированные биологические системы, использующие биологические компоненты, способные к удвоению вектора. Полинуклеотидами, содержащими вектор, могут быть молекулы ДНК или РНК либо их гибриды.

Термин "вектор экспрессии" обозначает вектор, который можно использовать в биологической системе или реконструированной биологической системе для управления трансляцией полипептида, закодированного полинуклеотидной последовательностью, присутствующей в векторе экспрессии.

Термин "OdK2 дикого типа" или "OdK2" или "нативный OdK2", используемый в настоящем документе, обозначает полипептид OdK2 скорпиона *Odontobuthus doriae*, имеющий последовательность, показанную в SEQ ID NO: 1 (GVPTDVKCRGSPQCIQPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK).

Термин "OsK1 дикого типа" или "OsK1" или "нативный OsK1", используемый в настоящем документе, обозначает полипептид OsK1 скорпиона *Orthochirus scrobiculosus*, имеющий последовательность, показанную в SEQ ID NO: 2 (GVIIIVKCKISRQCLEPCKKAGMRFGKCMNGKCHCTPK).

Термин "вариант" или "вариант OdK2", используемый в настоящем документе, обозначает полипептид, который отличается от полипептида OdK2 дикого типа SEQ ID NO: 1 на одну или более модификаций, например замещения, вставки или делеции нуклеотидов или аминокислот.

В описании изобретения нумерация остатков вариантов OdK2 осуществляется согласно SEQ ID NO: 1. Например, "G10" в описании изобретения обозначает глициновый остаток в положении 10 SEQ ID NO: 1. Соответственно, OdK2 G10I обозначает вариант OdK2, в котором глицин в положении 10 замещен изолейцином, а OdK2 G10I, P12R обозначает вариант OdK2, в котором глицин в положении 10 замещен изолейцином и пролин в положении 12 замещен аргинином.

Нумерация данной аминокислотной или полинуклеотидной последовательности "соответствует" или "относится к" нумерации выбранной аминокислотной или полинуклеотидной последовательности, когда положение любого данного аминокислотного остатка или нуклеотидных остатков обозначается путем ссылки на то же или эквивалентное положение в выбранной аминокислотной или полинуклеотидной последовательности, а не по фактическому числовому положению компонента в последовательности. Таким образом, например, нумерация данного аминокислотного положения в данной полипептидной последовательности соответствует тому же самому или эквивалентному положению аминокислоты в выбранной полипептидной последовательности, используемой в качестве эталонной последовательности.

"Эквивалентное положение" (например, "эквивалентное положение аминокислоты", или "эквивалентное положение нуклеиновой кислоты", или "эквивалентное положение остатка") определяется в настоящем документе как положение (например, положение аминокислоты, или положение нуклеиновой кислоты, или положение остатка) исследуемой полипептидной (или исследуемой полинуклеотидной) последовательности, которая выравнивается с соответствующим положением в последовательности эталонного полипептида (или эталонного полинуклеотида) при оптимальном выравнивании с помощью алгоритма выравнивания, описанного в настоящем документе. Не нужно, чтобы эквивалентное положение аминокислоты исследуемого полипептида имело такой же числовой номер положения, как соответствующее положение эталонного полипептида; точно так же не нужно, чтобы эквивалентное положение нуклеиновой кислоты исследуемого полинуклеотида имело такой же числовой номер положения, как соответствующее положение эталонного полинуклеотида.

Две полипептидные последовательности являются "оптимально выровненными", когда они выровнены с использованием заданных параметров, т.е. заданных матрицы замещения аминокислоты, штрафа за наличие гэпа (также называемого штрафом за внесение гэпа) и штрафа за увеличение гэпа с получением наивысшего возможного количества баллов схожести для данной пары последовательностей. Матрица BLOSUM62 (Henikoff and Henikoff (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89(22):10915-10919) часто применяется в качестве матрицы замещения в алгоритмах выравнивания полипептидных последовательностей (например, BLASTP). Штраф за наличие гэпа налагают за внесение одиночного аминокислотного гэпа в одну из выровненных последовательностей, а штраф за увеличение гэпа налагают за каждое положение остатка в гэпе. При отсутствии иных указаний параметры выравнивания, используемые в настоящем документе, следующие: матрица замещений BLOSUM62, штраф за наличие гэпа = 11 и штраф за увеличение гэпа = 1. Количество баллов выравнивания определяется по положениям аминокислоты каждой последовательности, в которых выравнивание начинается и заканчивается (например, окно выравнивания), и необязательно по вставке гэпа или нескольких гэпов в одну или обе последовательности с получением наивысшего возможного количества баллов схожести.

"Kv1.3" (также известный как KCNA3, HPCN3, HGK5, HuKIII или HLK3), используемый в настоящем документе, обозначает хорошо известный член 3 подсемейства А человеческого калиевого потенциал-зависимого канала, имеющий последовательность, показанную в учетном номере UniProt P22001 и в SEQ ID NO: 418.

Термин "антагонист Kv1.3" или "антагонист", используемый в настоящем документе, обозначает вариант OdK2 или слитый белок с вариантом OdK2 настоящего изобретения, который ингибирует или блокирует функцию Kv1.3 по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 75, 80, 85, 90, 95 или 100%. Аминокислотная последовательность OdK2 дикого типа приведена в SEQ ID NO: 1.

Термин "слитый белок", используемый в настоящем документе, обозначает белок, который включает полипептидные или пептидные компоненты, полученные из более чем одного материнского полипептида или пептида.

Термин "фрагмент, увеличивающий период полужизни" используемый в настоящем документе, обозначает молекулу, или белок, или домен, который при конъюгации с вариантом OdK2 увеличивает период полужизни *in vivo* полученного слитого белка с вариантом OdK2 при сравнении с несвязанным пептидом.

Термин "процент связывания" или "% связывания", используемый в настоящем документе, обозначает соотношение геометрических средних интенсивности флуоресценции (Geo. MFI или GMFI) для слитого белка с вариантом OdK2 при сравнении с контролем, полученным в анализе флуоресцентно-активированной клеточной сортировки (FACS) с использованием клеток, экспрессирующих каналы Kv1.3 или Kv1.1.

Термин "селективность связывания", используемый в настоящем документе, обозначает соотношение % связывания, полученного для Kv1.3, и % связывания, полученного для Kv1.1.

Термин "селективный" или "селективность", используемый в настоящем документе, обозначает отношение значения IC₅₀ для Kv1.1 и значения IC₅₀ для Kv1.3 для слитого белка с вариантом OdK2 или вариантом OdK2. Селективность можно оценить с помощью различных способов, например электрофизиологических анализов фиксации потенциала или анализов потока таллия, как описано в настоящем документе. Селективность может немного изменяться в зависимости от анализа, выбранного для измерений.

Пептиды Odk2, блокирующие Kv1.3 (SEQ ID NO: 1) и Osk1 (SEQ ID NO: 2) являются членами семейства токсинов скорпиона α -КТх3, которые отличаются аминокислотной последовательностью в девяти положениях. Как OdK2, так и Osk1 имеют длину 38 аминокислот, и каждый из них стабилизирован тремя дисульфидными связями, создающими пары между Cys8-Cys28, Cys14-Cys33 и Cys18-Cys35 (Abdel-Mottaleb et al., *Toxicon* 51:1424-30, 2008; Mouhat et al., *Biochem J.* 385(Pt 1):95-104, 2005; публикация международной заявки на патент № WO 2006/002850). Сложенные пептиды формируют α -спираль, удерживаемую в непосредственной близости от 3-цепочечной встречно-параллельной β -складчатой конформации дисульфидными связями. OdK2 и Osk1 представляют собой блокаторы пор, которые ингибируют функцию каналов посредством связывания с наружным преддверием области поры, вставляя лизин 27 в заполненную водой пору и перекрывая поток ионов. Было зарегистрировано, что Osk1 (α -КТх3.7) сильно блокирует каналы Kv1.3, Kv1.1 и Kv1.2 и умеренно канал KCa3.1, при этом IC₅₀ составляет 0,014 нМ, 0,6 нМ, 5,4 нМ и 225 нМ соответственно (Mouhat et al., *Biochem J.* 385(Pt 1):95-104, 2005). Было зарегистрировано, что OdK2 (α -КТх3.11) блокирует Kv1.3 в ооцитах *Xenopus laevis* (IC₅₀ составляет 7,2 нМ) и не оказывает воздействия на другие протестированные подтипы Kv1.x (Kv1.1, Kv1.2, Kv1.4, Kv1.5 и Kv1.6) (Abdel-Mottaleb et al., *Toxicon* 51:1424-30, 2008). Эти данные указывают, что Osk1 является очень сильным, но в нем отсутствует достаточная селективность к подтипу, тогда как OdK2 является селективным, но не очень сильным.

В настоящем изобретении предложены выделенные варианты OdK2 и слитые белки с вариантом OdK2, которые ингибируют Kv1.3, кодирующие их полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева, и способы применения полинуклеотидов и полипептидов настоящего изобретения. Варианты OdK2 и слитые белки с вариантом OdK2 настоящего изобретения проявляют большую силу по отношению к Kv1.3 при сравнении с материнскими молекулами с сохраненной и/или увеличенной селективностью. Полипептиды настоящего изобретения ингибируют калиевые токи, поток таллия и/или Т-клеточную активацию, полученные в результате активности Kv1.3, и, следовательно, могут быть подходящими для лечения различных состояний, связанных с активированными Т-клетками, таких как воспалительные и аутоиммунные заболевания.

Пептидные антагонисты.

В настоящем изобретении предложен выделенный пептидный антагонист Kv1.3, имеющий аминокислотную последовательность, содержащую:

(i) последовательность, показанную в SEQ ID NO: 1, в которой глицин замещен на изолейцин в положении 10 (G10I), и которая необязательно имеет 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дополнительных замещений; или

(ii) аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 1, дополнительно содержащую замещение G10I.

В некоторых вариантах осуществления выделенный пептидный антагонист содержит последовательность не более чем с 7, не более чем 6, не более чем 5, не более чем 4, не более чем 3 или не более чем 2 замещениями по отношению к SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления выделенный пептидный антагонист содержит последовательность, по меньшей мере на 81%, по меньшей мере на 82%, по меньшей мере на 83%, по меньшей мере на 84%, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 86%, по меньшей мере на 87%, по меньшей мере на 88%, по меньшей мере на 89%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 91%, по меньшей мере на 92%, по меньшей мере на 93%, по меньшей мере на 94%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 96%, по меньшей мере на 97%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентичную SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления, следовательно, пептидный антагонист Kv1.3 может содержать любую последовательность из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109

или 110. Замещение G10I связано с улучшенной селективностью и/или улучшенной аффинностью к Kv1.3.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, антагонист Kv1.3 содержит последовательность

GVPXaa₁Xaa₂VKCXaa₃ISRQCXaa₄Xaa₅PCKDAGMRF^GKCMNGKCHCTPK (SEQ ID NO: 426);

причем

- a) Xaa₁ представляет собой I или T, Q или E;
- b) Xaa₂ представляет собой N или D;
- c) Xaa₃ представляет собой K или R, E, A или Q;
- d) Xaa₄ представляет собой I, E, L, D, Q, H, V, K или A;
- e) Xaa₅ представляет собой E, K, L, Q, D, V или H; и

пептидный антагонист Kv1.3 имеет необязательное С-концевое удлинение из четырех аминокислот.

Например, пептидный антагонист Kv1.3 может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 13, 21, 22, 24, 26, 29, 30, 32, 34, 38, 39, 42-46, 49, 51, 59, 63, 65, 69, 71, 73, 76, 78, 81-83, 85, 87, 89, 92, 96, 101, 103, 104 и 108.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, антагонист Kv1.3 содержит последовательность

GVPXaa₁Xaa₂VKCXaa₃ISRQCXaa₄Xaa₅PCKDAGMRF^GKCMNGKCHCTPK (SEQ ID NO: 427);

причем

- Xaa₁ представляет собой I или T;
- Xaa₂ представляет собой N или D;
- Xaa₃ представляет собой K или R;
- Xaa₄ представляет собой I или E;
- Xaa₅ представляет собой E или K; и

пептидный антагонист Kv1.3 имеет необязательное С-концевое удлинение из четырех аминокислот.

Например, пептидный антагонист Kv1.3 может содержать аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 22, 34 или 42.

Как видно при ссылке на фиг. 4А, пептидные антагонисты настоящего изобретения сохраняют нативные дисульфидные мостики между C8-C28, C14-C33 и C18-C35. Примеры антагонистов настоящего изобретения, описанные в данном разделе и в других разделах этого документа, могут иметь, по существу, увеличенную селективность к Kv1.3 по сравнению с Kv1.1, например селективность может быть выше в 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000 или по меньшей мере 7000 раз по сравнению с SEQ ID NO: 1.

Слитые белки.

Антагонист настоящего изобретения может быть выделенным слитым белком, который содержит пептидный антагонист настоящего изобретения. В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, слитый белок содержит последовательность, идентичную по меньшей мере на 80% SEQ ID NO: 1, и которая содержит замещение G10I по отношению к SEQ ID NO: 1.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, слитый белок содержит пептидный антагонист Kv1.3, конъюгированный с увеличивающим период полужизни фрагментом, причем пептидный антагонист Kv1.3 содержит последовательность, показанную в SEQ ID NO: 1, дополнительно содержащую замещение G10I, и необязательно имеющую 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 дополнительных замещений.

В некоторых вариантах осуществления, описанных в настоящем документе, слитый белок содержит пептидный антагонист Kv1.3, конъюгированный с увеличивающим период полужизни фрагментом, причем пептидный антагонист Kv1.3 содержит последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную аминокислотной последовательности, показанной в SEQ ID NO: 1, дополнительно содержащую замещение глицина на изолейцин в положении остатка 10 (G10I).

В некоторых вариантах осуществления слитый белок содержит пептидный антагонист Kv1.3, конъюгированный с увеличивающим период полужизни фрагментом, причем пептидный антагонист Kv1.3 содержит последовательность

GVPXaa₁Xaa₂VKCXaa₃ISRQCXaa₄Xaa₅PCKDAGMRF^GKCMNGKCHCTPK (SEQ ID NO: 426);

причем

- Xaa₁ представляет собой I или T, Q или E;
- Xaa₂ представляет собой N или D;
- Xaa₃ представляет собой K или R, E, A или Q;
- Xaa₄ представляет собой I, E, L, D, Q, H, V, K или A;
- Xaa₅ представляет собой E, K, L, Q, D, V или H; и

пептидный антагонист Kv1.3 имеет необязательное С-концевое удлинение из четырех аминокислот.

В некотором варианте осуществления, описанном в настоящем документе, пептидный антагонист Kv1.3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 13, 21, 22, 24, 26, 29, 30, 32, 34, 38,

39, 42-46, 49, 51, 59, 63, 65, 69, 71, 73, 76, 78, 81-83, 85, 87, 89, 92, 96, 101, 103, 104 и 108.

В некотором варианте осуществления, описанном в настоящем документе, антагонист представляет собой выделенный слитый белок, содержащий пептидный антагонист Kv1.3, конъюгированный с увеличивающим период полужизни фрагментом, причем пептидный антагонист Kv1.3 содержит последовательность

GVPXaa₁Xaa₂VKCXaa₃ISRQCXaa₄Xaa₅PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK (SEQ ID NO: 427);

причем

Хаа₁ представляет собой I или T;

Хаа₂ представляет собой N или D;

Хаа₃ представляет собой K или R;

Хаа₄ представляет собой I или E;

Хаа₅ представляет собой E или K; и

пептидный антагонист Kv1.3 имеет необязательное С-концевое удлинение из четырех аминокислот.

В некотором варианте осуществления, описанном в настоящем документе, пептидный антагонист Kv1.3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 22, 34 или 42.

В некотором варианте осуществления, описанном в настоящем документе, С-концевое удлинение содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 123-268.

В некотором варианте осуществления, описанном в настоящем документе, С-концевое удлинение содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 128, 143, 155, 188, 206-210, 212, 214, 216, 219, 223, 224, 227, 230, 232-235, 237, 239, 240, 243, 252, 261-263 или 268.

Слитые белки с вариантом OdK2 настоящего изобретения являются более сильными и селективными по сравнению со слитым белком нативной последовательности OdK2, таким как KV1C2 (материнский слитый белок KV1C2) SEQ ID NO: 425. Примеры слитых белков настоящего изобретения представляют собой белки, содержащие пептиды варианта OdK2 SEQ ID NO: 3, 22, 34 или 42, конъюгированные с человеческим сывороточным альбумином (HSA) посредством линкера AS(AP)₂₀GS (SEQ ID NO: 116).

Материнский слитый белок KV1C2 имеет IC₅₀ приблизительно 13 нМ ($1,3 \times 10^{-8}$ М) для ингибирования калиевых токов в исследованиях фиксации потенциала всей клетки в клетках яичника китайского хомячка (CHO), трансфицированных человеческим Kv1.3, и значение IC₅₀ приблизительно 21,4 нМ ($2,14 \times 10^{-8}$ М) для ингибирования потока таллия в клетках, экспрессирующих Kv1.3, с использованием прибора FLIPR[®] Tetra (Molecular Devices). Слитый белок с вариантом OdK2 настоящего изобретения, как описано в настоящем документе, является "равносильным или более сильным" ингибитором Kv1.3, когда значение IC₅₀ в анализе фиксации потенциала, описанном в разделе "Материалы и способы", составляет приблизительно 13 нМ ($1,3 \times 10^{-8}$ М) или менее, например $1,0 \times 10^{-8}$ М, $5,0 \times 10^{-9}$ М, $1,0 \times 10^{-9}$ М, $5,0 \times 10^{-10}$ М, $1,0 \times 10^{-10}$ М, $5,0 \times 10^{-11}$ М, $1,0 \times 10^{-11}$ М, $5,0 \times 10^{-12}$ М, $1,0 \times 10^{-12}$ М или менее, или значение IC₅₀ в анализе потока таллия, описанном в материалах и способах, составляет приблизительно 21,4 нМ ($2,14 \times 10^{-8}$ М) или менее, например $1,0 \times 10^{-8}$ М, $5,0 \times 10^{-9}$ М, $1,0 \times 10^{-9}$ М, $5,0 \times 10^{-10}$ М, $1,0 \times 10^{-10}$ М, $5,0 \times 10^{-11}$ М, $1,0 \times 10^{-11}$ М, $5,0 \times 10^{-12}$ М, $1,0 \times 10^{-12}$ М или менее. Значения IC₅₀ для фиксации потенциала и потока таллия для примеров слитых белков показаны на фиг. 8.

Вариант OdK2 и слитые белки с вариантом OdK2 настоящего изобретения, как описано в настоящем документе, являются селективными к Kv1.3. Селективность можно оценить по отношению к Kv1.1 с использованием соотношения значения IC₅₀ для Kv1.1 и значения IC₅₀ для Kv1.3 для слитого белка с вариантом OdK2 или варианта OdK2. Селективность можно дополнительно исследовать по отношению к другим каналам Kv, таким как Kv1.2, Kv1.4, Kv1.5 и по отношению к hERG, KCa3.1 или Nav1.5 при помощи стандартных способов. Примеры слитых белков с вариантом OdK2 настоящего изобретения, как описано в настоящем документе, могут иметь, по существу, увеличенную селективность к Kv1.3 по сравнению с Kv1.1, например селективность может быть выше в 100, 200, 300, 400, 500, 1000, 2000, 3000, 4000, 5000, 6000 или по меньшей мере 7000 раз. Материнский слитый белок KV1C2 является в 68 раз более селективным по отношению к человеческому Kv1.3 при сравнении с человеческим Kv1.1, следовательно, примеры слитых белков с вариантом OdK2 настоящего изобретения, как описано в настоящем документе, могут иметь, по существу, увеличенную селективность, например селективность может быть выше приблизительно в 1,5, 3, 4,5, 6, 7,5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 или по меньшей мере 105 раз по сравнению со слитым белком KV1C2. Обнаружено, что наличие глутаминовой кислоты в положении, соответствующем Хаа5, в SEQ ID NO: 426 улучшает селективность.

Можно выполнить замещения положений остатков 4, 5, 9, 15 и 16 (нумерация остатков согласно нативному пептиду OdK2 SEQ ID NO: 1) в нативном OdK2 для улучшения как силы, так и селективности полученных вариантов и их слитых белков. Можно выполнять замещения положений остатков любым аминокислотным остатком при условии, что полученный вариант OdK2 или его слитый белок в вышеописанном анализе фиксации потенциала всей клетки или анализе потока таллия сохраняет IC₅₀ на уровне приблизительно 13 нМ ($1,3 \times 10^{-8}$ М) или 21,4 нМ ($2,14 \times 10^{-8}$ М) соответственно или менее и имеет селективность (выраженную в виде соотношения значений IC₅₀, полученных при помощи фиксации потенциала, как описано выше) к Kv1.3 по сравнению с Kv1.1, по меньшей мере равную 100. Наборы аминокис-

лот, которые можно применять для внесения разнообразия в каждом выбранном положении, включают аминокислотные остатки TIQE в положении 4, ND в положении 5, REAKQ в положении 9, ELDIQHVKA в положении 15 и KELQDVH в положении 16. Глутаминовая кислота (E) в положении 15 связана с увеличенной селективностью к Kv1.3. Замещение G10I связано с улучшенной селективностью и/или улучшенной аффинностью к Kv1.3 (нумерация остатков согласно SEQ ID NO: 1). Внесение разнообразия в OdK2 и его слитые белки с использованием вышеописанных наборов аминокислот привело к получению вариантов, обладающих улучшенной аффинностью связывания и улучшенной селективностью связывания с Kv1.3 по сравнению с нативным пептидом или его слитым белком. В другой схеме внесения разнообразия наборы аминокислот, которые можно применять для внесения разнообразия в каждом выбранном положении, включают аминокислотные остатки IT в положении 4, ND в положении 5, KR в положении 9, IE в положении 15 и EK в положении 16. Полученные варианты и/или их слитые белки можно оценить на селективность, силу, аффинность связывания и селективность связывания при помощи хорошо известных анализов и анализов, описанных в настоящем документе. Примеры вариантов OdK2 и их слитых белков с улучшенными силой и селективностью представляют собой варианты SEQ ID NO: 3, 22, 34 и 42 и их человеческий сывороточный альбумин или слитые белки Fc. Примеры вариантов OdK2 с улучшенными аффинностью связывания и селективностью связывания в % представляют собой варианты SEQ ID NO: 3, 13, 21, 22, 24, 26, 29, 30, 32, 34, 38, 39, 42-46, 49, 51, 59, 63, 65, 69, 71, 73, 76, 78, 81-83, 85, 87, 89, 92, 96, 101, 103, 104 и 108.

Дополнительные варианты OdK2 и слитые белки с вариантом OdK2 находятся в пределах объема настоящего изобретения. Например, замещения можно выполнить в нативном пептиде OdK2 в других положениях, кроме положений 4, 5, 9, 15 и 16 при условии, что полученный вариант OdK2 и слитый белок с вариантом OdK2 сохраняют схожую селективность и силу по отношению к Kv1.3 при сравнении с материнской молекулой. Примеры модификаций представляют собой, например, консервативные замены, приводящие к получению слитых белков с вариантом OdK2 с характеристиками, которые аналогичны характеристикам материнских молекул. Консервативными называют замены, проводимые внутри семейства аминокислот с родственной структурой боковых цепей. Генетически кодируемые аминокислоты можно разделить на четыре семейства: (1) кислотные (аспартат, глутамат); (2) основные (лизин, аргинин, гистидин); (3) неполярные (аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан); и (4) незаряженные полярные (глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин). Фенилаланин, триптофан и тирозин иногда объединяют в одну группу ароматических аминокислот. Альтернативно набор аминокислот можно разделить на следующие группы: (1) кислотные (аспартат, глутамат); (2) основные (лизин, аргинин, гистидин), (3) алифатические (глицин, аланин, валин, лейцин, изолейцин, серин, треонин), причем серин и треонин можно необязательно объединить в отдельную группу алифатических гидроксильных аминокислот; (4) ароматические (фенилаланин, тирозин, триптофан); (5) амидные (аспарагин, глутамин); и (6) серосодержащие (цистеин и метионин) (Stryer (ed.), Biochemistry, 2nd ed, WH Freeman and Co., 1981). В нативном пептиде OdK2 можно выполнить неконсервативные замещения, которые включают замещения аминокислотных остатков между различными классами аминокислот для улучшения свойств вариантов OdK2 и слитых белков с вариантом OdK2. Чтобы быстро определить возможность получения функционального гомолога в результате изменения аминокислотной последовательности полипептида или его фрагмента, можно проанализировать способность модифицированного полипептида или фрагмента вызывать ответ аналогично немодифицированному полипептиду или фрагменту с использованием анализов, описанных в настоящем документе. Пептиды, полипептиды или белки с более чем одной заменой также можно легко протестировать аналогичным образом. Примеры дополнительных вариантов OdK2 и/или слитых белков с вариантом OdK2, имеющих замещения, приводящие к увеличению связывания или специфичности связывания, представляют собой такие, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4-12, 14-20, 23, 25, 27, 28, 31, 33, 35-37, 40, 41, 47, 48, 50, 52-58, 60-62, 64, 66-68, 70, 72, 74, 75, 77, 79, 80, 84, 86, 88, 90, 91, 93-95, 97-100, 102, 105-107, 109 и 110.

Варианты OdK2 (т.е. антагонисты согласно настоящему изобретению), как описано в настоящем документе, можно слить с увеличивающим период полужизни фрагментом с образованием слитых белков настоящего изобретения. Примеры увеличивающих период полужизни фрагментов, которые можно применять, включают хорошо известный человеческий сывороточный альбумин, транстиретин (TTR), тироксинсвязывающий глобулин (TGB), альбуминсвязывающие домены или Fc, или его фрагменты. Также могут применяться биологически подходящие полимеры или сополимеры, например этиленгликоль, молекулы полиэтиленгликоля (ПЭГ), такие как ПЭГ-5000 или ПЭГ-20000, декстран, полилизин, жирные кислоты и сложные эфиры жирных кислот с различной длиной цепи, например лаурат, мири-стат, стеарат, арахидат, бегенат, олеат, арахидонат, октандиовая кислота, тетрадекандиовая кислота, октадекандиовая кислота, докозандиовая кислота и т.п., полилизин, октан или углеводы (декстран, целлюлоза, олиго- или полисахариды).

В другом варианте осуществления увеличивающий период полужизни фрагмент слитого белка, описанный в настоящем документе, представляет собой человеческий сывороточный альбумин, альбуминсвязывающий домен (ADB) или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

В другом варианте осуществления увеличивающий период полужизни фрагмент слитого белка, описанный в настоящем документе, представляет собой человеческий сывороточный альбумин.

В другом варианте осуществления увеличивающий период полужизни фрагмент слитого белка, описанный в настоящем документе, конъюгирован с пептидным антагонистом Kv1.3 посредством линкера.

В другом варианте осуществления линкер слитого белка, описанный в настоящем документе, содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112-122.

Увеличивающий период полужизни фрагмент можно конъюгировать непосредственно с пептидным антагонистом варианта OdK2 настоящего изобретения или непрямо посредством линкера. Примеры пептидных линкеров, которые можно применять в слитых белках настоящего изобретения, как описано в настоящем документе, представляют собой линкеры, имеющие аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112-122. Непептидные увеличивающие период полужизни фрагменты можно конъюгировать непосредственно с вариантом OdK2 с использованием хорошо известных способов химического соединения. Например, варианты OdK2 можно пегиллировать с использованием известных способов и способов, описанных в патенте США № US 8043829. Фрагменты, увеличивающие период полужизни пептида или белка, можно связать с пептидом во время трансляции нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок, согласно более подробным объяснениям ниже.

Варианты OdK2 со встроенными увеличивающими период полужизни фрагментами можно сравнить по функциональности с помощью нескольких хорошо известных анализов. Например, фармакокинетические свойства вариантов OdK2, соединенных с ПЭГ или человеческим сывороточным альбумином, можно оценить в хорошо известных моделях *in vivo*.

Слитые белки с вариантом OdK2 настоящего изобретения, как описано в настоящем документе, можно сконструировать с включением С-концевого удлинения из четырех аминокислот на С-конце варианта OdK2 перед конъюгацией удлиненного пептида с увеличивающим период полужизни фрагментом. В связи с нежеланием быть связанными какой-либо теорией авторы изобретения считают, что удлинение С-конца пептида OdK2 в слитых белках позволит увеличить связывающие взаимодействия пептида с внеклеточными петлями канала Kv1.3 и увеличить силу. Примеры слитых белков OdK2 с С-концевой удлиненной пептидной частью показаны на фиг. 6, 7А и 8. Слитые белки с С-концевой удлиненной пептидной частью обычно являются более сильными ингибиторами Kv1.3 по сравнению с соответствующими слитыми белками без удлинения. Значения IC_{50} для примеров вариантов с С-концевым удлинением, описанных в настоящем документе, могут составлять приблизительно 1×10^{-8} М или менее, например приблизительно 1×10^{-9} М или менее, приблизительно 1×10^{-10} М или менее, приблизительно 1×10^{-11} М или менее или приблизительно 1×10^{-12} М или менее согласно результатам, полученным в анализе потока таллия, описанном ниже. Примеры С-концевых удлинений представляют собой таковые, показанные в SEQ ID NO: 123-268.

В другом варианте осуществления выделенный слитый белок настоящего изобретения содержит пептидный антагонист Kv1.3 SEQ ID NO: 3, 22, 34 или 42;

необязательно С-концевое удлинение SEQ ID NO: 128, 143, 155, 188, 206-210, 212, 214, 216, 219, 223, 224, 227, 230, 232, 235, 237, 239, 240, 243, 252, 261-263 или 268;

линкер SEQ ID NO: 116 или SEQ ID NO: 119 и

человеческий сывороточный альбумин в качестве увеличивающего период полужизни фрагмента.

В другом варианте осуществления выделенный слитый белок настоящего изобретения содержит пептидный антагонист Kv1.3 SEQ ID NO: 42;

линкер SEQ ID NO: 116 и

человеческий сывороточный альбумин в качестве увеличивающего период полужизни фрагмента.

В другом варианте осуществления выделенный слитый белок настоящего изобретения содержит пептидный антагонист Kv1.3 SEQ ID NO: 42;

С-концевое удлинение SEQ ID NO: 209;

линкер SEQ ID NO: 116 и

человеческий сывороточный альбумин в качестве увеличивающего период полужизни фрагмента.

В другом варианте осуществления выделенный слитый белок настоящего изобретения содержит пептидный антагонист Kv1.3 SEQ ID NO: 3;

С-концевое удлинение SEQ ID NO: 235;

линкер SEQ ID NO: 116 и

человеческий сывороточный альбумин в качестве увеличивающего период полужизни фрагмента.

В другом варианте осуществления выделенный слитый белок настоящего изобретения содержит пептидный антагонист Kv1.3 SEQ ID NO: 42;

С-концевое удлинение SEQ ID NO: 235;

линкер SEQ ID NO: 116 и

человеческий сывороточный альбумин в качестве увеличивающего период полужизни фрагмента.

В другом варианте осуществления выделенный слитый белок настоящего изобретения, как описано

в настоящем документе, является по меньшей мере в 100 раз более селективным к человеческому Kv1.3, чем к человеческому Kv1.1, когда селективность измеряют в виде соотношения значения IC₅₀ выделенного слитого белка для Kv1.1 и значения IC₅₀ выделенного слитого белка для Kv1.3 в анализе фиксации потенциала в клетках, трансфицированных Kv1.1 и Kv1.3 соответственно.

В другом варианте осуществления выделенный слитый белок настоящего изобретения, как описано в настоящем документе, ингибирует калиевые токи со значением IC₅₀ по меньшей мере приблизительно в 10 раз меньше, чем значение IC₅₀ для материнского слитого белка KV1C2 с SEQ ID NO: 425 в анализе фиксации потенциала в клетках, трансфицированных Kv1.3.

В другом варианте осуществления выделенный слитый белок настоящего изобретения, как описано в настоящем документе, ингибирует калиевые токи со значением IC₅₀ приблизительно $1,5 \times 10^{-8}$ М или менее в анализе фиксации потенциала в клетках, трансфицированных человеческим Kv1.3.

В другом варианте осуществления выделенный слитый белок настоящего изобретения, как описано в настоящем документе, ингибирует поток таллия *in vitro*, имея значение IC₅₀ приблизительно $2,2 \times 10^{-8}$ М или менее в клетках, трансфицированных человеческим Kv1.3.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой выделенный слитый белок, содержащий пептидный антагонист Kv1.3, конъюгированный с увеличивающим период полужизни фрагментом посредством линкера, причем указанный пептидный антагонист Kv1.3 имеет необязательное С-концевое удлинение из четырех аминокислот, причем

пептидный антагонист Kv1.3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3-110;

С-концевое удлинение содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 123-268;

линкер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116 или 119; и

увеличивающий период полужизни фрагмент представляет собой человеческий сывороточный альбумин.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой выделенный пептидный антагонист Kv1.3, содержащий последовательность

GVPXaa₁Xaa₂VKCXaa₃ISRQCXaa₄Xaa₅PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK (SEQ ID NO: 426);

причем

Xaa₁ представляет собой I или T, Q или E;

Xaa₂ представляет собой N или D;

Xaa₃ представляет собой K или R, E, A или Q;

Xaa₄ представляет собой I, E, L, D, Q, H, V, K или A;

Xaa₅ представляет собой E, K, L, Q, D, V или H; и

пептидный антагонист Kv1.3 имеет необязательное С-концевое удлинение из четырех аминокислот.

В другом варианте осуществления выделенный пептидный антагонист Kv1.3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 13, 21, 22, 24, 26, 29, 30, 32, 34, 38, 39, 42-46, 49, 51, 59, 63, 65, 69, 71, 73, 76, 78, 81-83, 85, 87, 89, 92, 96, 101, 103, 104 и 108.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой выделенный пептидный антагонист Kv1.3, содержащий последовательность

GVPXaa₁Xaa₂VKCXaa₃ISRQCXaa₄Xaa₅PCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK (SEQ ID NO: 427);

причем

Xaa₁ представляет собой I или T;

Xaa₂ представляет собой N или D;

Xaa₃ представляет собой K или R;

Xaa₄ представляет собой I или E; и

Xaa₅ представляет собой E или K; и

пептидный антагонист Kv1.3 имеет необязательное С-концевое удлинение из четырех аминокислот.

В другом варианте осуществления выделенный пептидный антагонист Kv1.3 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 22, 34 или 42.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой выделенный пептидный антагонист Kv1.3, содержащий последовательность SEQ ID NO: 3-110.

Полипептиды варианта OdK2 и их слитые белки настоящего изобретения могут быть получены путем химического синтеза, такого как твердофазный синтез пептидов, в автоматическом синтезаторе пептидов. В альтернативном варианте осуществления полипептиды настоящего изобретения могут быть получены из полинуклеотидов, кодирующих полипептиды, с использованием бесклеточных экспрессирующих систем, таких как экспрессирующие системы на основе лизата ретикулоцитов или системы экспрессии стандартного рекомбинанта. Специалисту в данной области также известны иные способы получения полипептидов настоящего изобретения.

Создание вариантов OdK2 обычно осуществляется на уровне нуклеиновой кислоты. Полинуклеотиды можно синтезировать с использованием химического генетического синтеза согласно способам, описанным в патентах США №№ US 6521427 и US 6670127, использующим выродненные олигонуклеотиды для создания желаемых вариантов, или путем стандартного ПЦР-клонирования и мутагенеза. Библиоте-

ки вариантов можно создавать с помощью стандартных методик клонирования с целью клонирования полинуклеотидов, кодирующих варианты OdK2, в вектор для экспрессии.

Слитые белки с вариантом OdK2 обычно получают с помощью стандартных подходов молекулярной биологии.

Варианты OdK2 и их слитые белки тестируют на способность ингибировать Kv1.3 с использованием способов, описанных в настоящем документе. Типичный анализ представляет собой анализ, измеряющий ингибирование потока таллия внутрь клеток в клетках, сверхэкспрессирующих Kv1.3, с использованием прибора FLIPR[®] Tetra (Molecular Devices). Другой типичный анализ включает электрофизиологические регистрации измерения ионного потока через клеточную мембрану с использованием хорошо известных и описанных в настоящем документе методик фиксации потенциала.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой выделенный полинуклеотид, содержащий полинуклеотид, кодирующий вариант OdK2 и слитый белок с вариантом OdK2 настоящего изобретения.

Полинуклеотиды настоящего изобретения также могут содержать по меньшей мере одну некодирующую последовательность, такую как транскрибируемые, но нетранслируемые последовательности, сигналы терминации, сайты связывания рибосомы, последовательности, стабилизирующие мРНК, интроны и сигналы полиаденилирования. Полинуклеотидные последовательности также могут включать в себя дополнительные последовательности, кодирующие дополнительные аминокислоты. Такие дополнительные полинуклеотидные последовательности могут, например, кодировать последовательности маркера или хорошо известной метки, например гемагглютининовой (НА) метки, которые облегчают очистку слитых полипептидов. Некоторые полинуклеотиды описываются в настоящем изобретении, однако другие полинуклеотиды, которые, принимая во внимание вырожденность генетического кода или предпочтительность использования кодонов в данной экспрессирующей системе, кодируют предложенные в настоящем изобретении антагонисты, также рассматриваются как часть настоящего изобретения. Примерами полинуклеотидов являются полинуклеотиды, содержащие последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 429-430.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой вектор, содержащий выделенный полинуклеотид, кодирующий варианты OdK2 и их слитые белки настоящего изобретения. Векторы настоящего изобретения используют для сохранения полинуклеотидов, удвоения полинуклеотидов или индукции экспрессии полипептидов, кодируемых вектором, составляющим предмет настоящего изобретения, в биологических системах, включая реконструированные биологические системы. Векторы могут иметь хромосомальное, эписомальное и вирусное происхождение. К ним могут относиться векторы, полученные из бактериальных плазмид, бактериофагов, транспозонов, эписом дрожжей, вставочных элементов, хромосомальных элементов дрожжей, бакуловирусов, паповавирусов, таких как SV40, вирусов коровьей оспы, аденовирусов, вирусов птичьей оспы, вирусов псевдобешенства, пикорнавирусов и ретровирусов, а также векторы, полученные из комбинаций указанных выше элементов, такие как космиды и фагемиды.

В одном варианте осуществления настоящего изобретения вектор представляет собой вектор экспрессии. Векторы экспрессии, как правило, включают в себя элементы последовательности нуклеиновых кислот, которые позволяют контролировать, регулировать, активировать или допускать экспрессию полипептидов, кодируемых данным вектором. Такие элементы могут содержать сайты связывания энхансера транскрипции, сайты инициации РНК-полимеразы, сайты связывания рибосом и другие сайты, способствующие экспрессии закодированных полипептидов в заданной экспрессирующей системе. Такие экспрессирующие системы могут представлять собой клеточные или бесклеточные системы, хорошо известные в данной области. Также хорошо известны элементы последовательности нуклеиновых кислот и последовательности материнского вектора, пригодные для использования в процессе экспрессии закодированных полипептидов. Пример полученного на основе плазмиды вектора экспрессии, который можно использовать для экспрессии полипептидов, составляющих предмет настоящего изобретения, содержит точку начала репликации *E. coli*, ген устойчивости к ампициллину (Amp), промотор CMV, сигнальную последовательность и сайт полиаденилирования SV40.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой выделенную клетку-хозяина, содержащую вектор, составляющий предмет настоящего изобретения. Примеры клеток-хозяев включают клетки архей; бактериальные клетки, такие как *Streptococci*, *Staphylococci*, *Enterococci*, *E. coli*, *Streptomyces*, цианобактерии, *B. subtilis* и *S. aureus*; клетки грибов, такие как *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Basidiomycete*, *Candida albicans* или *Aspergillus*; клетки насекомых, такие как *Drosophila S2* и *Spodoptera Sf9*; клетки животных, такие как CHO, COS, HeLa, C127, 3T3, BHK, HEK293, CV-1, клетки меланомы Боуэса и миеломы; и клетки растений, такие как клетки голосемянных или покрытосемянных растений. Клетки-хозяева для реализации способов настоящего изобретения могут быть представлены в виде отдельных клеток или популяций клеток. Популяции клеток могут представлять собой популяцию выделенных или культивированных клеток либо популяцию клеток, присутствующих в матриксе, таком как ткань.

Введение полинуклеотида, такого как вектор, в клетку-хозяина может быть произведено с помощью

способов, хорошо известных специалистам в данной области. Эти способы включают трансфекцию с использованием фосфата кальция, ДЕАЕ-декстран-опосредованную трансфекцию, микроинъекцию, катионную липид-опосредованную трансфекцию и электропорацию.

Другой вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой способ продуцирования выделенного слитого белка настоящего изобретения, включающий стадии культивирования клетки-хозяина в условиях, достаточных для экспрессии по меньшей мере одного слитого белка с вариантом OdK2, и восстановления слитого белка, экспрессированного клеткой-хозяином.

Клетки-хозяева могут культивироваться в любых условиях, подходящих для поддержания или увеличения численности данного типа клеток-хозяев и достаточных для экспрессии полипептида.

Условия культивирования, среды и соответствующие способы обработки, достаточные для экспрессии полипептидов, хорошо известны специалистам в данной области. Например, многие типы клеток млекопитающих можно культивировать в аэробных условиях при 37°C с использованием соответствующим образом буферизованной модифицированной по способу Дульбекко среды Игла (DMEM), тогда как клетки бактерий, дрожжей и другие виды клеток можно культивировать при 37°C в условиях соответствующей атмосферы в среде LB.

Экспрессия варианта OdK2 в рамках способов настоящего изобретения может быть подтверждена с использованием различных хорошо известных способов. Например, экспрессия полипептида может быть подтверждена с использованием проявляющих реагентов, таких как антитела, с использованием, например, FACS-анализа или иммунофлуоресцентных методик обнаружения, или с использованием ДСН-ПААГ-электрофореза или ВЭЖХ.

Способы лечения.

Другой аспект настоящего изобретения представляет собой способ модулирования активности Kv1.3 в биологической ткани, включающий приведение в контакт биологической ткани, экспрессирующей Kv1.3, с модулирующим Kv1.3 количеством варианта OdK2, или его слитого белка настоящего изобретения, или его фармакологически приемлемой соли.

Варианты OdK2 и слитые белки с вариантом OdK2 настоящего изобретения можно использовать в любом виде терапии, направленной на лечение, уменьшение или ослабление симптомов Kv1.3-опосредованных заболеваний, таких как воспалительные и аутоиммунные заболевания, диабет, ожирение или раковые заболевания.

Способы настоящего изобретения можно использовать для лечения пациента-животного в рамках любой классификации. Примеры таких животных включают млекопитающих, таких как люди, грызуны, собаки, кошки, животные из зоопарков и сельскохозяйственные животные.

Варианты OdK2 и/или слитые белки с вариантом OdK2 настоящего изобретения могут быть использованы для профилактики и лечения Kv1.3-опосредованных состояний, таких как воспалительные состояния, аллергии и аллергические состояния, реакции гиперчувствительности, аутоиммунные заболевания, тяжелые инфекционные состояния и отторжение трансплантата органа или ткани. Варианты OdK2 и/или слитые белки с вариантом OdK2 настоящего изобретения также подходят для получения лекарственного средства для лечения таких состояний, при этом лекарственное средство приготовлено для введения в дозах, определенных в настоящем документе.

Один вариант осуществления настоящего изобретения представляет собой способ подавления Т-клеточной активации у субъекта, имеющего состояние, связанное с нежелательной Т-клеточной активацией, включающий введение субъекту эффективного количества выделенного слитого белка настоящего изобретения для подавления Т-клеточной активации.

Т-клеточную активацию можно измерить хорошо известными способами, такими как измерение снижения продукции IL-2 Т-клетками. Термин "подавление Т-клеточной активации", используемый в настоящем документе, обозначает способность вариантов OdK2 или слитых белков OdK2 настоящего изобретения ингибировать и уменьшать Т-клеточную активацию по меньшей мере на 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100%.

В другом варианте осуществления состояние, связанное с нежелательной Т-клеточной активацией, представляет собой воспалительное состояние, иммунное и пролиферативное расстройство, ревматоидный артрит (РА), анкилозирующий спондилит, псориатический артрит, остеоартрит, остеопороз, увеит, воспалительный фиброз, склеродермию, фиброз легких, цирроз, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, язвенный колит, астму, аллергическую астму, аллергии, хронические обструктивные заболевания легких (ХОЗЛ), рассеянный склероз, псориаз, контактный дерматит, системную красную волчанку (СКВ) и другие формы волчанки, диабет, диабет I типа, ожирение, рак, волчанку, рестеноз, системный склероз, склеродермию, гломерулонефрит, синдром Шегрена, воспалительную резорбцию костей, отторжение трансплантата или реакцию "трансплантат против хозяина".

Канал Kv1.3 экспрессируется на всех подгруппах Т-клеток и В-клеток, но эффекторные Т-клетки памяти и В-клетки памяти с переключенным синтезом класса являются особенно зависимыми от Kv1.3 (Wulff et al., J. Immunol. 173:776, 2004). Kv1.3 сверхэкспрессируется в Gad5/инсулин-специфичных Т-клетках пациентов с впервые выявленным сахарным диабетом I типа, в миелин-специфичных Т-клетках пациентов с рассеянным склерозом (РС) и в Т-клетках синовиальной оболочки пациентов с ревматоид-

ным артритом (Beeton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:17414-9, 2006), в образцах рака молочной железы (Abdul et al., Anticancer Res 23:3347, 2003) и клеточных линиях рака предстательной железы (Fraser et al., Pflugers Arch. 446:559, 2003). Положительные исходы в моделях на животных с использованием блокаторов Kv1.3 описаны в моделях гиперчувствительности к овальбумину и столбнячному анатоксину (Beeton et al., Mol. Pharmacol. 67:1369, 2005; Koo et al., Clin. Immunol. 197:99, 1999), моделях рассеянного склероза, таких как крысиная модель экспериментального аутоиммунного энцефаломиеелита с адоптивным переносом (АТ-ЕАЕ) (Beeton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:17414-9, 2006), модели воспалительной резорбции костей (Valverde et al., J. Bone Mineral. Res. 19:155, 2004), моделях артрита (Beeton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 103: 17414, 2006; Tarcha et al., J. Pharmacol. Exper. Therap. 342: 642, 2012) и при ожирении, диабете и метаболических заболеваниях (Xu et al., Hum. Mol. Genet. 12:551, 2003; Xu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 101: 3112, 2004).

Типичные Kv1.3-опосредованные состояния, которые можно лечить вариантами OdK2 и/или слитыми белками с вариантом OdK2 настоящего изобретения, представляют собой воспалительные состояния, иммунные и пролиферативные расстройства, включая ревматоидный артрит (РА), анкилозирующий спондилит, псориаз, псориатический артрит, остеоартрит, остеопороз, увеит, воспалительный фиброз (например, склеродермию, фиброз легких и цирроз), воспалительные расстройства кишечника (например, болезнь Крона, язвенный колит и воспалительное заболевание кишечника), астму (включая аллергическую астму), аллергии, ХОЗЛ, рассеянный склероз, псориаз, контактный дерматит, системную красную волчанку (СКВ) и другие формы волчанки, диабет, диабет I типа, ожирение и рак, волчанку, рестеноз, системный склероз, склеродермию, гломерулонефрит, синдром Шегрена, воспалительную резорбцию костей, отторжение трансплантата и реакцию "трансплантат против хозяина".

Введение вариантов OdK2 и/или слитых белков с вариантом OdK2 настоящего изобретения в моделях на животных определенного заболевания можно применять для оценки применения вариантов OdK2 и/или слитых белков с вариантом OdK2 с целью облегчения симптомов и изменения течения заболеваний. Модели на животных, которые можно применять, являются хорошо известными и включают вышеописанные модели и такие модели, как модель коллаген-индуцированного артрита (КИА), модель индуцированного режимом питания ожирения, модель индуцированного 2,4,6-тринитробенсульфоной кислотой/этанолом (TNBS) колита или оксазалоновая модель, которая индуцирует хроническое воспаление и изъязвление в ободочной кишке (Neurath et al., Intern. Rev. Immunol. 19:51-62, 2000), модель с адоптивным переносом интактных Т-клеток CD4 CD45RB^{high} мышам RAG или SCID, причем интактные Т-клетки донора атакуют кишечник реципиента, вызывая хроническое заболевание кишечника и симптомы, схожие с человеческими воспалительными заболеваниями кишечника (Read and Powrie, Curr Protoc Immunol Chapter 15 unit 15.13, 2001), модель стимуляции овальбумином и модели сенсibilизации метахолином (Hessel et al., Eur. J. Pharmacol. 293:401-12, 1995).

Фармацевтические композиции.

"Терапевтически эффективное количество" варианта OdK2 и/или слитых белков с вариантом OdK2, эффективное при лечении заболеваний, при которых желательна активность Kv1.3, может быть определено путем стандартных исследовательских способов. Например, доза агента, эффективная при лечении воспалительного состояния или аутоиммунного заболевания, такого как волчанка, рассеянный склероз или псориаз, может быть определена введением агента в соответствующие модели животных, такие как модели, описанные в настоящем документе.

Кроме того, для определения диапазона оптимальной дозы необязательно могут быть использованы анализы *in vitro*. Выбор конкретной эффективной дозы (например, с помощью клинических испытаний) может быть осуществлен специалистами в данной области на основании нескольких факторов. Такие факторы включают подлежащее лечению или профилактике заболевание, симптомы заболевания, масса тела пациента, иммунологический статус пациента и другие известные специалистам факторы. Точная доза, предназначенная для применения в составе композиции, также зависит от пути введения и тяжести заболевания и должна определяться на основании решения лечащего врача и состояния каждого пациента. Эффективная доза может быть экстраполирована из кривых "доза-ответ", полученных в животных модельных тестовых системах *in vitro*.

Для введения предназначенных для терапевтического применения пептидных вариантов OdK2 и/или слитых белков с вариантом OdK2 настоящего изобретения можно использовать любой подходящий путь введения, который обеспечивает доставку варианта хозяину. Фармацевтические композиции данных вариантов являются особенно подходящими для парентерального введения, например внутрикожного, внутримышечного, внутривенного, подкожного или интраназального введения.

Варианты OdK2 и/или слитые белки с вариантом OdK2 настоящего изобретения можно получить в виде фармацевтических композиций, содержащих эффективное количество варианта в качестве активного компонента в фармацевтически приемлемом носителе. Термин "носитель" относится к разбавителю, адьюванту, эксципиенту или носителю, с которыми вводят активное соединение. Фармацевтические носители могут быть жидкими, как, например, вода или масла, включая масла, получаемые из нефти, масла растительного, животного или синтетического происхождения, например арахисовое, соевое, минераль-

ное, кунжутное масло и т.п. Например, можно использовать 0,4% соляной раствор и 0,3% раствор глицина. Эти растворы стерильны и, по существу, не содержат твердых частиц. Их можно стерилизовать с использованием стандартных хорошо известных методик стерилизации (например, фильтрации). Композиции могут содержать фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества, необходимые для соответствующих физиологических условий, такие как регуляторы pH и буферизирующие агенты, стабилизаторы, загустители, увлажнители и красители и т.п. Концентрация вариантов OdK2 и/или слитых белков с вариантом OdK2 настоящего изобретения в таком фармацевтическом составе может значительно варьироваться, т.е. от менее чем приблизительно 0,5%, обычно по меньшей мере приблизительно 1% и до 15 или 20 вес.%, и определяется преимущественно на основе необходимой дозы, объемов текучей среды, вязкости и т.п. в соответствии с конкретным выбранным способом введения.

Таким образом, фармацевтическую композицию настоящего изобретения для внутримышечной инъекции можно получить с содержанием 1 мл стерильного водного буферного раствора и от приблизительно 1 нг до приблизительно 100 мг, например от приблизительно 50 нг до приблизительно 30 мг или более предпочтительно от приблизительно 5 мг до приблизительно 25 мг вариантов OdK2 и/или их слитых белков настоящего изобретения. Подобным образом, предложенная в настоящем изобретении фармацевтическая композиция для внутривенного введения может содержать приблизительно 250 мл стерильного раствора Рингера и приблизительно от 1 мг до приблизительно 30 мг или предпочтительно от 5 до приблизительно 25 мг предложенного в настоящем изобретении антагониста. Способы изготовления композиций для парентерального введения хорошо известны и описаны более подробно, например, в "Remington's Pharmaceutical Science", 15th ed., Mack Publishing Company, г. Истон, штат Пенсильвания.

Предложенные в настоящем изобретении варианты OdK2 и/или слитые белки с вариантом OdK2 могут быть лиофилизированы для хранения и впоследствии перед использованием восстановлены в подходящем носителе. Было показано, что данная методика эффективна для стандартно используемых белковых препаратов, при этом можно использовать известные в данной области способы лиофилизации и восстановления.

Настоящее изобретение сейчас будет описано со ссылкой на нижеприведенные специфические примеры, не имеющие ограничительного характера.

Материалы и способы.

Векторы экспрессии канала Kv и клеточные линии. κДНК, кодирующие различные каналы Kv и химерные конструкторы, клонировали при помощи обычных способов в векторы экспрессии млекопитающих. Клонированными и экспрессированными κДНК были таковые, кодирующие Kv1.3 человека (hKv1.3) (SEQ ID NO: 418), Kv1.1 человека (hKv1.1) (SEQ ID NO: 420), Kv1.2 человека (hKv1.2) (SEQ ID NO: 419), Kv1.5 человека (hKv1.5) (SEQ ID NO: 421), петлю E3 hKv1.3/химеру hKv1.5 (имеющую аминокислоты 1-455 и 496-613 Kv1.5 человека и аминокислоты 456-495 петли E3 Kv1.3) (химера петли EC3 Kv1.3), петлю E3 hKv1.1/химеру hKv1.5 с N-концевой гистидиновой меткой (имеющую аминокислоты 1-9 гистидиновой метки, аминокислоты 10-472 и 513-63 hKv1.5 и аминокислоты 473-512 петли E3 hKv1.1) (химера петли EC3 Kv1.1), Kv1.3 крысы (rKv1.3) (SEQ ID NO: 422), Kv1.1 крысы (rKv1.1) (SEQ ID NO: 423), канал супоKv1.3 яванской макаки (*Macaca fascicularis*) (SEQ ID NO: 424), хвостовую химеру hKv1.3/hKv1.5 (имеющую аминокислоты 1-250 и 497-593 Kv1.5 человека и аминокислотные последовательности 251-496 Kv1.3 (хвостовая химера Kv1.3) и хвостовую химеру hKv1.1/hKv1.5 (имеющую аминокислоты 1-250 и 492-588 Kv1.5 человека и аминокислотные последовательности 251-491 Kv1.1) (хвостовая химера Kv1.1). Для экспрессии канала в клетках НЕК гены Kv клонировали в управляемый промотором CMV вектор экспрессии, кодирующий маркер устойчивости к неомицину. Клетки НЕК 293-F (Invitrogen, г. Карлсбад, штат Калифорния) стабильно трансфицировали и культивировали в селекционной среде, содержащей DMEM, 10% фетальную бычью сыворотку (ФБС) и генетицин 600 мкг/мл с целью создания клональных клеточных линий, которые экспрессируют каналы Kv при помощи стандартных методик. Для стабильной экспрессии в клетках CHO клетки CHO-TREx (Invitrogen) стабильно трансфицировали pcDNA4/TO-Kv1.x при помощи стандартных методик с целью создания клональных клеточных линий, которые экспрессируют каждый калиевый канал тетрациклин-индуцируемым образом. Культуральная среда представляла собой среду Хэма F-12 с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 2 mM L-глутамин, 5 мкг/мл бластицидина и 200 мкг/мл зеоцина. В некоторых экспериментах применяли временную трансфекцию с использованием липофектамина 2000 в клетках CHO. Для электрофизиологических экспериментов клетки трансфицировали совместно с вектором экспрессии, экспрессирующим укороченный CD4 с целью контроля экспрессии (pMACs4.1, Milteni Biotech). Анализы выполнили через 24-48 ч после трансфекции.

Экспрессия и очистка белка.

Библиотеку химер экспрессировали в виде слияний пептид-Fc или слияния пептид-HSA. Библиотеку вначале трансфицировали и экспрессировали в клетках НЕК293-E в 48-луночном или 96-луночном формате. Для селекции клетки культивировали в среде DMEM, 10% ФБС и 250 мкг/мл генетицина. Для 48-луночной экспрессии в 48-луночные планшеты высевали 0,5 мл/лунка $3,0 \times 10^5$ клеток/мл. Библиотеку трансфицировали с применением липофектамина 2000 при помощи обычных способов, с использовани-

ем 300 нг плазмидной ДНК, 25 мкл среды OptiPRO™ SFM и 2,4 мкл липофектамина 2000 (Invitrogen, г. Карлсбад, штат Калифорния). На следующий день среду для трансфекции отсасывали, и в каждую лунку добавляли 0,5 мл среды 293 FreeStyle™ (Invitrogen, г. Карлсбад, штат Калифорния). Затем клетки инкубировали в течение дополнительных 96 ч, после чего супернатант собирали и фильтровали через фильтр 0,2 мкм (Varian).

Для 96-луночной трансфекции клетки осаждали центрифугированием при 500×g в течение 5 мин, супернатант удаляли, а клетки повторно суспендировали в среде 293 FreeStyle™ и высевали в 96-луночный планшет в концентрации $0,6 \times 10^6$ клеток/мл и в объеме 0,2 мл/лунка. Библиотеку трансфицировали с помощью того же способа, который использовали для 48-луночной трансфекции.

Клетки HEK293-F применяли для всех небольших и лабораторных масштабов трансфекции.

Экспрессии слияний пептид-Fc в небольшом масштабе серийно очищали с использованием смолы белка А-сефароза 4FF при помощи обычных способов. Кратко, 20 мл очищенного супернатанта экспрессии смешивали с приблизительно 0,5 мл смолы, уравновешенной в фосфатно-солевом буфере Дульбекко (DPBS), pH 7,2 и смешивали при комнатной температуре в течение не менее 1 ч. Смолы белка А промывали 1 мл DPBS, pH 7,2, и связанный белок элюировали с использованием 450 мкл 0,1M ацетата натрия, pH 3,0, нейтрализовали с использованием 50 мкл 2M буфера трис, pH 7,0, и диализировали против $1 \times$ DPBS, pH 7,2 в течение ночи при 4°C.

Экспрессии в лабораторном масштабе очищали с помощью аффинной хроматографии на хроматографической системе АКТА Xpress™ (GE Healthcare). Экспрессию супернатантов транзитно трансфицированных клеток HEK293-F отобрали через 4 дня после трансфекции, осветлили путем центрифугирования при 6000 об/мин и профильтровали (0,2 мкм, мембрана PES, Corning, г. Актон, Массачусетс). Относительное количество слияния пептид-Fc определяли при помощи прибора Octet (ForteBio) с использованием контрольного слитого белка токсин-Fc, помещенного в отработанную среду для построения стандартной кривой. Затем образцы разводили $10 \times$ фосфатно-солевым буфером (ФСБ), pH 7,0, до конечной концентрации $1 \times$ ФСБ, pH 7,0 и снова фильтровали (мембрана PES, 0,2 мкм). Разведенные супернатанты помещали в колонку с белком А HiTrap MabSelect Sure (GE Healthcare), предварительно уравновешенную ФСБ, pH 7,0, в относительной концентрации ~10 мг белка на 1 мл смолы. После загрузки колонку промывали в ФСБ с pH 7,0 и белок элюировали с использованием 10 объемов колонки 0,1M Na-ацетата, pH 3. Фракции белка немедленно нейтрализовали путем элюирования в пробирки, содержащие 2,0M трис, pH 7, при объеме фракции 20%. Пиковые фракции объединяли и концентрировали при помощи центрифужных устройств ультрафильтрации (Millipore) с мембранами с порогом отсекающей молекулярной массы 10 кДа (10k MWCO).

Концентрированные образцы прогоняли через колонку Superdex 200 (16/60) (GE Healthcare), уравновешенную и заполненную ФСБ, pH 7,0, с использованием хроматографа АКТА FPLC. Пиковые фракции анализировали посредством невосстанавливающего ДСН-ПААГ-электрофореза, а фракции, содержащие мономерный белок, объединяли. Концентрации белка определяли по поглощению на 280 нм и 310 нм на спектрофотометре BioTek SynergyHT™. При необходимости очищенные белки концентрировали на центрифужном концентраторе (Millipore) с 10K MWCO. Качество очищенных белков оценивали методом ДСН-ПААГ-электрофореза и аналитической эксклюзионной ВЭЖХ (ВЭЖХ-система Dionex), измеряли уровни эндотоксина (анализ LAL). Очищенные белки хранили при 4°C.

Для слияний пептид-HSA супернатанты собирали, очищали и фильтровали через 0,2 мкм фильтр. Перед помещением в предварительно уравновешенную 1 мл колонку HisTrap добавляли $10 \times$ DPBS до достижения конечной концентрации $1 \times$. Белок элюировали с использованием ступенчатого градиента имидазола. Фракции, содержащие слияния, собирали и анализировали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза. Фракции, содержащие интересующий белок, объединяли, концентрировали и прогоняли на колонке Superdex 200 26/60. Снова собирали фракции и анализировали с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза. Фракции, содержащие мономер и димер слияний пептид-HSA, объединяли отдельно для получения конечного продукта. Очищенный белок анализировали, как описано выше, и хранили при 4°C.

Прямой анализ связывания слитого белка с пептидом ("анализ связывания").

Слитые белки пептид-Fc. Все реагенты для культивирования клеток получены от Invitrogen. Адгезивные клетки HEK293F, стабильно трансфицированные плазмидами, экспрессирующими различные каналы Kv, культивировали в среде DMEM с добавлением 10% ФБС и 600 мг/мл генетицина. Одиночные клеточные суспензии клеток HEK с каналом Kv получали путем промывания адгезивных культур $1 \times$ ФСБ с последующим промыванием культур 0,25% трипсином-ЭДТА и повторным суспендированием клеток в холодном $1 \times$ ФСБ с добавлением 2% ФБС (буфер для FACS) до конечной концентрации 2×10^6 клеток/мл и распределением 100 мкл/лунка в 96-луночные полипропиленовые планшеты с V-образным дном (Costar). С этого момента процедуру выполняли на льду или при 4°C. Клетки центрифугировали при 450×g в течение 2 мин, а супернатанты декантировали. 100 мкл образцов пептид-Fc в отработанной среде FreeStyle 293 или в буфере для FACS, нормализованном до 16 нМ, добавляли к клеточным осадкам в определенные лунки и смешивали. Для дифференцирования специфического связывания и неспецифи-

ческого фона 10-кратный молярный избыток синтетического пептида ShK (Bachem) добавляли к реакциям отрицательного контроля для создания конкуренции связыванию слитого белка пептид-Fc. Реакционные смеси инкубировали в течение 60-90 мин при 4°C. Клетки промывали в 200 мкл буфера для FACS, а затем инкубировали в течение 1 ч при 4°C вместе с 100 мкл конъюгированного с Cy5 антитела Fab₂ козы к человеческому антителу Fc (Jackson ImmunoResearch Inc.), разведенного 1:200 в буфере для FACS. Клетки промывали в 200 мкл буфера для FACS, а затем повторно суспендировали вместе с 100 мкл фиксирующего буфера BD Cytotfix™ (BD Biosciences) и хранили в течение ночи при 4°C. Взаимодействия считывали на проточном цитометре с автоматическим пробоотборником на 96 лунок FACSArray (BD Biosciences). Данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo (Treestar) для получения геометрического среднего интенсивностей флуоресценции (Geo. MFI) для каждой реакции. С целью первичного скрининга Geo. MFI анализы связывания для каждого варианта сравнивали непосредственно с временно трансфицированным контрольным слиянием Odk2-Fc дикого типа (KV1C2) и регистрировали в виде % от материнского.

Слитые белки пептид-HSA. Анализы выполняли аналогично прямому анализу связывания слияний пептид-Fc за исключением следующего: клетки суспендировали до конечной концентрации 1×10^6 клеток/мл перед распределением по 100 мкл/лунка в 96-луночные полипропиленовые планшеты с V-образным дном (Costar), и к клетке добавляли 50 мкл слияния пептид-HSA. Слияние HSA обнаруживали с использованием 50 мкл конъюгата козьего антитела к HSA человека с биотином (AbCam, номер по каталогу ab40378), разведенного до 2 мкг/мл и предварительно смешанного с конъюгатом стрептавидин-фикоэритрин (PE) 1:200 в буфере для FACS. Клетки промывали в 150 мкл буфера для FACS, повторно суспендировали в 50 мкл фиксирующего буфера BD Cytotfix™ (BD Biosciences) и инкубировали при 4°C в течение 30 мин. Результаты реакций считывали и данные анализировали, как описано выше. С целью первичного скрининга Geo. MFI анализы связывания для каждого варианта сравнивали непосредственно с контрольным слитым белком KV1D261_26 (пептид 261, конъюгированный с HSA посредством линкера GS(G₄S)₈ (SEQ ID NO: 120) и регистрировали в виде % связывания.

Конкурентный анализ связывания ("конкурентное связывание"). Все реагенты для культивирования клеток получены от Invitrogen. Адгезивные клетки НЕК293F, стабильно трансфицированные векторами экспрессии канала Kv, культивировали в среде DMEM с добавлением 10% ФБС и 600 мг/мл генетина. Одиночные клеточные суспензии клеток НЕК с каналом Kv получали путем промывания адгезивных культур $1 \times$ ФБС с последующим промыванием культур 0,25% трипсином-ЭДТА и повторным суспендированием клеток в холодном $1 \times$ ФБС с добавлением 2% ФБС (буфер для FACS) с целью получения конечной концентрации 1×10^6 клеток/мл и распределением по 100 мкл/лунка в 96-луночные полипропиленовые планшеты с V-образным дном (Costar). С этого момента процедуру выполняли на льду или при 4°C. Клетки центрифугировали при $450 \times g$ в течение 2 мин, а супернатанты декантировали. 45 мкл образцов пептидов или слитого белка с пептидом в отработанной среде FreeStyle 293 или в буфере для FACS добавляли к клеточным осадкам в определенные лунки и смешивали. Реакционные смеси инкубировали в течение 30 мин при 4°C. 5 мкл 100 нМ реагента Agitoxin-2-Cys-TAMRA (Alomone labs) в клеточной культуральной среде или в буфере для FACS добавляли в каждую лунку с последующим смешиванием, и реакционные смеси инкубировали в течение 60 мин при 4°C. На стадии промывания в каждую лунку добавляли 200 мкл буфера для FACS, и клетки центрифугировали при $450 \times g$ в течение 2 мин, и супернатанты декантировали. Клетки повторно суспендировали с 50 мкл буфера для FACS, и результаты реакций считывали на проточном цитометре с автоматическим пробоотборником на 96 лунок FACSArray (BD Biosciences). Данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo (Treestar) для получения геометрического среднего интенсивностей флуоресценции (Geo. MFI или GMFI) для каждой реакции. В отношении кривых "концентрация-ответ" график изменения значений Geo. MFI в пределах диапазона концентраций для каждой композиции строили в Graphpad Prism, а значения IC₅₀ и K_i получали при помощи нелинейной регрессии с сигмоидальной кривой "доза-ответ" (изменяемый наклон). Для расчета K_i было присвоено значение Agitoxin-2-Cys-TAMRA Kv1.3 KD 0,20 нМ (David Triggler (eds). Voltage-Gated Ion Channels as Drug Targets, Volume 29, Page 216, Tab. 7.2.2).

Анализ потока таллия. Конструкты Kv стабильно экспрессировали в НЕК293F в рамках селекции G418. Культуральная среда представляла собой NuQ DME с высоким содержанием глюкозы с добавлением 10% ФБС и 600 мкг/мл G418. Клетки высевали в количестве 10000 клеток на лунку в 384-луночные титрационные микропланшеты с полилизинным покрытием, затем инкубировали в течение 12-36 ч при 37°C. Планшеты с клетками промывали буфером для анализа с использованием Biotek EL405 (4 цикла, отсасывание до 25 мкл/лунка, затем добавление 100 мкл/лунка). Буфер для анализа содержал (в мМ): 130 мМ NaCl, 4 мМ KCl, 2 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 10 мМ ГЕПЕС, 5 мМ глюкозы. Краситель FluxOR (Invitrogen) растворяли в соответствии с инструкциями производителя в буфере для анализа с добавлением 2 мМ пробенецида, а затем добавляли к клеткам. Клетки окрашивали в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте. Затем краситель смывали с помощью буфера для анализа. Исследуемые композиции получали в исследуемой концентрации $2 \times$ в аналитическом буфере с добавлением 0,2% бычьего сывороточного альбумина (БСА) и 2 мМ пробенецида. После добавления 25 мкл/лунка раствора исследу-

дуемой композиции клетки инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре в темноте. Флуоресценцию таллиевого красителя отслеживали в системе Tetra (Molecular Devices) по мере того как клетки стимулировали путем добавления 20 мкл/луночка стимулирующего буфера. Стимулирующий буфер содержал 180 мМ ГЕПЕС, 90 мМ КОН, 2 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 5 мМ глюкозы, 1 мМ Tl₂SO₄. Изменение флуоресценции измеряли через 20 с после добавления агониста. Данные нормализовали по средним откликам контрольных лунок (N = 16, каждый из 10 нМ ShK для контролей с полным ингибированием и только буфер для контролей с нулевым ингибированием).

Анализ ингибирования Т-клеток ("анализ ингибирования Т-клеток"). Ингибирование секреции IL-2 применяли в качестве индикатора ингибирования Т-клеток. Криоконсервированные очищенные первичные нормальные человеческие Т-клетки CD4⁺ и CD8⁺ (AllCells LLC) размораживали и суспендировали в среде RPMI 1640 (Invitrogen) с добавлением 1% нормальной человеческой сыворотки A/B (Valley Biomedical Prod & Srv Inc.) в конечной концентрации 2×10⁶ клеток/мл, и 100 мкл клеток распределяли в 96-луночные планшеты для тканевой культуры с плоским дном (NUNC). Для слитых белков пептид-HSA очищенный нормальный человеческий сывороточный альбумин (SIGMA) добавляли к клеточной культуральной среде в конечной концентрации 3% для поддержания постоянной концентрации HSA в течение экспериментов по оценке зависимости ответа от концентрации. Слитые белки с пептидом и контроли разводили в клеточной культуральной среде, добавляли к Т-клеточным культурам 50 мкл/луночка и инкубировали в течение 30 мин при 37°C/5% CO₂. Т-клетки активировали при помощи микрочастиц для активации с антителами к человеческим Т-клеткам CD3/CD28 (Miltenyi Biotec), разведенных в клеточной культуральной среде в соотношении микрочастиц к клеткам 1:1. Культуры инкубировали в течение ~16 ч при 37°C/5% CO₂, и супернатанты собирали в 96-луночные полипропиленовые планшеты с V-образным дном (Costar) и очищали путем центрифугирования. В очищенных супернатантах анализировали уровни IL-2 посредством хемилуминесцентного иммунологического анализа с использованием набора для определения человеческого IL-2 Quantikine (RnD Systems). График конечных уровней IL-2 строили в Graphpad Prism, а значения IC₅₀ получали при помощи нелинейной регрессии с сигмоидальной кривой "доза-ответ" (изменяемый наклон). Некоторые эксперименты выполняли с одной концентрацией слитого белка с пептидом 5 нМ, 100 нМ или 250 нМ.

Анализ Т-клеток после стимуляции столбнячным анатоксином (ГТХ). Человеческие МКПК очищали из крови здорового донора, вакцинированного столбнячным анатоксином, посредством ступенчатого градиентного центрифугирования с использованием среды Ficoll Pague (GE Healthcare Life Science). МКПК в количестве 10⁶ клеток/луночка стимулировали в течение 3 дней в 96-луночном культуральном планшете с плоским дном с помощью 3 мкг/мл столбнячного анатоксина (университет г. Массачусетс, отделение биологии) в среде RPMI с добавлением 2% человеческой сыворотки, 2 мМ глутамин, 1 мМ пирувата натрия, 10 мМ ГЕПЕС, 1 мМ раствора заменимых аминокислот в минимально обогащенной среде (MEM) и по 100 Ед/мл каждого из пенициллина G и стрептомицина (Life Technologies). Супернатанты культуры собирали на 2-й день культивирования и клеточную пролиферацию определяли посредством измерения в течение ночи импульсов ³H-тимидина, добавленного в концентрации 1 мКи/луночка (Perkin Elmer). Пролитерирующие клетки с включенным радиоактивным тимидином собирали на стекловолоконные фильтровальные планшеты (Perkin Elmer) и вымачивали в цинтилляционной жидкости (Perkin Elmer) для подсчета радиоактивных импульсов с использованием счетчика Topcount (Packard). Цитокины в супернатантах измеряли с помощью технологии обнаружения MSD (Meso Scale Discovery).

Электрофизиологическое исследование. В электрофизиологическом исследовании использовали трансфицированные клетки CHO или НЕК, Т-клетки CD4⁺ или CD8⁺. Клетки наносили в низкой концентрации на покровные стекла. В день эксперимента покровные стекла помещали в баню на столик инверсионного микроскопа и перфузировали (приблизительно 1 мл/мин) внеклеточным раствором следующего состава: 137 мМ NaCl, 2 мМ CaCl₂, 5,4 мМ KCl, 1 мМ MgCl₂, 5 мМ глюкозы и 10 мМ ГЕПЕС, 0,1% бычий сывороточный альбумин, pH 7,4. Пипетки заполняли внутриклеточным раствором следующего состава: 40 мМ KCl, 100 мМ KF, 2 мМ MgCl₂, 10 мМ этиленгликольтетрауксусной кислоты (ЭГТА), 10 мМ ГЕПЕС, pH 7,3-7,4; сопротивление раствора составляло 2-4 МОм. Все регистрации выполняли при комнатной температуре (22-24°C) с использованием усилителя Multiclamp 700A и программного обеспечения pClamp 9 (Axon Instruments). Временно трансфицированные клетки CHO идентифицировали с использованием микрочастиц, покрытых антителами к CD4 (Dynabeads, Invitrogen). Внешние калиевые токи измеряли с использованием методики цельноклеточной конфигурации фиксации потенциала с тестовым потенциалом 20-40 мВ в сравнении с потенциалом удерживания -80 мВ. Расчетная разность потенциалов на границе жидкости составила 7,1 мВ при 20°C, а команды напряжения не корректировали. Регистрации тока выполняли при 2-5 кГц и фильтровали при 1-2 кГц. Токи вызывали каждые 20 с и позволяли им стабилизироваться в течение 5-10 мин перед регистрацией. Композиции вносили с использованием скоростного перфузионного устройства SF-77B (Warner Instruments). Для одной клетки тестировали 1-4 концентрации композиции.

Анализ данных.

Данные зависимости ответа от концентрации или дозы обрабатывали при помощи нелинейной регрессии (Graph Pad Prism, версия 4.0) с использованием следующего общего логистического уравнения с

четырьмя параметрами:

$$\text{Ответ} = \text{Основной} + (\text{Макс} - \text{Основной}) / [1 + 10^{(\log EC_{50} - \text{Log Агонист})}$$

Наклон]

Силу выражали в виде $\log 10$ концентрации, производящей 50% максимального эффекта (IC_{50} или EC_{50}).

Синтез пептида. Смолу Fmoc-Lys(Boc)-Wang (замещение 0,47 ммоль/г) получали от компании Peptide International, а псевдопролиновый дипептид, Fmoc-Ile-Ser(Ψ^{MeMe} pro)-OH, получали от Novabiochem. Все остальные аминокислоты получали от Applied Biosystems (ABI) или Anaspec. Реагенты для автоматического твердофазного пептидного синтеза (SPPS) получали из ABI. Другие реагенты, необходимые для химического синтеза, приобретали в Sigma/Aldrich. Пептидный синтез выполняли на смоле Fmoc-Lys(Boc)-Wang (222 мг, 0,104 ммоль) посредством SPPS с использованием автоматического синтезатора пептидов ABI модель 433A. Стандартные протоколы FastMoc MonPrevPeak в масштабе 0,1 ммоль для активации гексафторфосфат О-бензотриазолил-N,N,N',N'-тетраметилурином (HBTU)/гидроксibenзотриазолом (HOBT)/диизопропилэтиламином (DIEA) использовали в соответствии с протоколом производителя. Псевдопролиновый дипептид, Fmoc-Ile-Ser(Ψ^{MeMe} pro)-OH, включали в положение, показанное жирным шрифтом и подчеркнутое в последовательности

GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK-смола (SEQ ID NO: 42).

Функциональные группы боковой цепи аминокислоты защищали следующим образом: Arg(Pmc), Asn(Trt), Asp(OtBu), Cys(Trt), Glu(OtBu), Gln(Trt), Lys(Boc), Ser(tBu) и Thr(tBu).

Пептид отсоединяли от смолы в растворе (трифторуксусной кислоты (ТФК) (20 мл), фенола (1,5 г), 1,2 этандитиола (4,0 мл) тиоанизола (1,0 мл), воды (1,0 мл) и триизопропилсилана (1,0 мл)) в течение шести часов при температуре окружающей среды. Смолу удаляли посредством фильтрования и промывали дополнительным количеством ТФК (2 мл). Фильтраты объединяли и пептид осаждали предварительно охлажденным простым этиловым эфиром (400 мл). Пептид, выделенный путем фильтрования, промывали простым диэтиловым эфиром и высушивали в вакууме с получением 370,0 мг сырого линейного продукта (GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPK; SEQ ID NO: 42). Сырой линейный пептид окисляли при концентрации пептида 100 мкг/мл в 0,1M трис-HCL, 1,0M гуанидин-HCl, 1,0 mM ЭДТА, 3,0 mM восстановленного глутатиона и 0,3 mM окисленного глутатиона при температуре окружающей среды. Реакцию прекращали через 25 ч путем капельного добавления ледяной уксусной кислоты для снижения pH до 3,9, а пептид замораживали и лиофилизировали. Сырой пептид очищали с помощью ОФ-ВЭЖХ, колонка Vydac C-18. Аналитическая ОФ-ВЭЖХ, капиллярный электрофорез и ЖХ/МС подтвердили чистоту и молекулярную массу.

Пример 1. Определение характеристик пептидов OdK2 и OsK1 дикого типа и их слитых белков.

OdK2 дикого типа (SEQ ID NO: 1) и OsK1 (SEQ ID NO: 2) пептиды клонировали и экспрессировали в виде слитых белков IgG4-Fc с использованием линкера $GS(G_4S)_4$ (SEQ ID NO: 119) при помощи обычных способов и как описано выше. Полученные слитые белки назывались KV1C2 (слияние OdK2-Fc) и KV1N2 (слияние OsK1-Fc) соответственно. Нативный пептид OdK2, выделенный и очищенный из яда иранского скорпиона *Odonthobuthus*, получили от профессора Яна Титгата из университета г. Левена, а рекомбинантный пептид OsK1 от Alomone labs. Характеристики нативных пептидов и их слитых белков оценили по связыванию с Kv1.3, силе и селективности к Kv1.3 с помощью электрофизиологических исследований, по способности ингибировать Т-клеточную активацию и в фармакокинетических исследованиях.

Связывание с клетками, экспрессирующими Kv1.3.

Анализы связывания выполнили, как описано выше в стабильных клетках, экспрессирующих химерную петлю EC3 hKv1.3. KV1C2 (слияние OdK2-Fc) продуцировал сигнал в анализе FACS, который в 12,8 раз превышал фоновый, а KV1N2 (слияние OsK1-Fc) продуцировал сигнал, в 133,0 раза превышающий фоновый (фиг. 2), что указывает на высокий уровень связывания с экспрессированным каналом Kv1.3. Связывание, по всей видимости, являлось специфичным, так как в присутствии 10-кратного избытка ShK не наблюдалось связывания с клетками, экспрессирующими химерную петлю EC3 человеческого Kv1.3. Связывание было также селективным, так как KV1C2 (слияние OdK2-Fc) и KV1N2 (слияние OsK1-Fc) не связывались с клетками, экспрессирующими человеческий Kv1.5.

Электрофизиологическое исследование.

Исследования с фиксацией потенциала всей клетки выполнили на клетках СНО, трансфицированных ионными каналами Kv1.3, Kv1.1, Kv1.2 и Kv1.5 человека. Как Osk1, так и Odk2 сильно ингибировали токи Kv1.3. Пептид Osk1 оказался значительно более сильным, чем Odk2 по отношению к Kv1.3, но кратность селективности по сравнению с Kv1.1 была схожей у обоих пептидов. KV1C2 (слияние OdK2-Fc) и KV1N2 (слияние OsK1-Fc) оказались приблизительно в 30-100 раз менее сильными по отношению к Kv1.3 при сравнении с нативными пептидами. Однако селективность KV1C2 (рассчитанная в виде IC_{50} Kv1.1, деленной на IC_{50} Kv1.3) улучшилась приблизительно в 3-4 раза по сравнению с нативным пептидом. Значения IC_{50} и соотношения селективности, определенные с помощью электрофизиологического исследования, показаны в табл. 1.

Таблица 1

Селективность	Электрофизиологическое исследование		Кратность белка**	Т-клетки CD4 ⁺ , Ингибирование IC ₅₀ (нМ)	Т-клетки CD8 ⁺ , Ингибирование IC ₅₀ (нМ)
	Kv1.3, IC ₅₀ (нМ)	Kv1.1, IC ₅₀ (нМ)			
OdK2	0,10	1,90	19	НВ	НВ
Osk1	0,01	0,21	15	0,03	0,03
OdK2-линкер-Fc*	13,00	865,00	67	69,92	69,54
Osk1-линкер-Fc*	0,30	2,00	7	2,79	НВ

* Линкер = GS(G4S)₄, SEQ ID NO: 119.

** IC₅₀ (Kv1.1)/IC₅₀(Kv1.3).

НВ = не выполняли.

Ингибирование Т-клеточной активации.

KV1C2 (слияние OdK2-Fc) блокировал клеточные токи Kv1.3 в линии Т-клеток Jurkat, первичных человеческих Т-клетках CD4⁺ (выделены у нормальных людей-доноров) и клетках НЕК и СНО, трансфицированных Kv1.3. KV1C2 (слияние OdK2-Fc), также блокировал продукцию цитокина первичными человеческими Т-клетками CD4⁺ и CD8⁺, активированными антителами к CD3/CD28. KV1N2 (слияние Osk1-Fc) блокировал клеточные токи Kv1.3 в линии Т-клеток Jurkat, конкурировал с agitoxin2-cys-TAMRA за связывание с клетками, экспрессирующими химерную петлю EC3 hKv1.3, ингибировал поток таллия из клеток, экспрессирующих химерную петлю EC3 hKv1.3, и был протестирован на способность ингибировать активацию Т-клеток CD4⁺. В табл. 1 показаны значения IC₅₀, полученные в неавтоматизированном электрофизиологическом исследовании фиксации потенциала. KV1C2 (слияние OdK2-Fc) также ингибировал Т-клеточную пролиферацию после активации обработанными миомицином С аутогенными антигенпрезентирующими клетками с антигеном столбнячного анатоксина в вышеописанном анализе (фиг. 3).

Период полужизни слитого белка OdK2-Fc.

Крысам Спрег-Доули вводили KV1C2 (слияние OdK2-Fc) путем внутривенного болюсного введения исходного раствора 2 мг/мл 1× ФСБ pH7,0 в объеме 5 мл/кг для достижения конечной дозы 10 мг/кг. Концентрации в плазме определяли с помощью ИФА с антителами к Fc или с помощью FACS, как описано выше. Период полужизни (T_{1/2}) KV1C2 у крыс составил 60 ч.

Пример 2. Получение слияний химерного пептида OdK2 с Fc ("библиотека химер OdK2/Osk1" или "KV1C2L1").

Последовательности нативного пептидного токсина OdK2 и Osk1 имеют высокую степень схожести, расхождение присутствует в 9 аминокислотных остатках (фиг. 1). Для создания вариантов пептида, имеющих большие силы по отношению к Kv1.3 и селективность к подтипу Kv1.x, создали комбинаторную библиотеку вариантов пептид-линкер-Fc с использованием линкера GS(G₄S)₄ (SEQ ID NO: 119), в которой аминокислотную последовательность пептида OdK2 изменили в 8 из 9 положений, в которых последовательность OdK2 отличалась от Osk1 (положения 3, 4, 5, 9, 10, 12, 16 и 20) в OdK2, SEQ ID NO:1). Положение 15 не включали в процесс внесения разнообразия в библиотеку в связи со схожестью между изолейцином и лейцином в данном положении. Разнообразие в данные положения вносили с использованием аминокислотных остатков OdK2 и Osk1, присутствующих в каждом положении. Таким образом, разнообразие в положение 3 вносили с помощью PI, а в положения 4, 5, 9, 10, 12, 16 и 20 с помощью TI, DN, RK, GI, RP, EQ, и KD соответственно. Конфигурация библиотеки также включала шесть вариантов с замещением лизина в положении 16 на основании предшествующих сообщений о том, что данная мутация увеличивала силу пептида Osk1 (Mouhat et al., Biochem J. 385:95-104, 2005), и замещением глутамина в положении 38 в результате начального различия в правильной аминокислотной последовательности OdK2. Таким образом, библиотека химер OdK2/Osk1 состояла в общем из 264 членов, включая варианты с замещением лизина, вариант OdK2 K38Q и обе материнские молекулы KV1C2 (слияние OdK2) и (слияние Osk1). Нумерация положений осуществляется в соответствии с последовательностью нативного пептида OdK2 с SEQ ID NO: 1.

Библиотеку создавали и экспрессировали с использованием обычных способов молекулярной биологии и как описано выше.

Скрининг библиотеки осуществляли с использованием сырых супернатантов в отношении связывания с hKv1.3 при помощи линии клеток НЕК, трансфицированных химерной петлей EC3 hKv1.3, и в от-

ношении селективности путем связывания с линией клеток НЕК, трансфицированных химерной петлей ЕС3 канала hKv1.1, как описано выше. При первичном скрининге связывание измеряли в виде % связывания контрольного KV1C2 (% связывания), а селективность в виде соотношения % связывания с Kv1.3 и % связывания с Kv1.1. На фиг. 4 показаны аминокислотные последовательности, % связывания, селективность и значения IC_{50} из анализов потока таллия для выбора вариантов, полученных из библиотеки химер OdK2/Osk1 (библиотека KV1C2L1), а также из библиотеки аминокислотного сканирования (библиотека KV126L1), описанной в примере 4.

Дополнительно определили характеристики выбранных слитых белков, демонстрирующих связывание с Kv1.3 >80% и >1,3-кратную селективность к Kv1.1 по сравнению с материнским KV1C2 (слияние OdK2-Fc).

Пример 3. Определение характеристик слияний химерного пептида OdK2 с Fc.

Избранные слитые белки химерного пептида OdK2 с Fc, выявленные в примере 2, очищали, как описано выше, и определяли их характеристики в дополнительных анализах связывания, электрофизиологических исследованиях и анализах Т-клеточного ингибирования.

Электрофизиологическое исследование.

Избранные варианты оценили на их силу и селективность в исследованиях с фиксацией потенциала всей клетки с использованием стабильно трансфицированных клеток СНО, как описано выше. Ингибирование человеческого Kv1.3 или человеческого Kv1.1 оценили с одной концентрацией (1 нМ для Kv1.3 или 100 нМ для Kv1.1) очищенного варианта (табл. 2). Избранные варианты имели значительно большую активность по отношению к Kv1.3, но схожую активность по отношению к Kv1.1 по сравнению с материнским KV1C2.

Значения IC_{50} получили из неавтоматизированных электрофизиологических исследований с фиксацией потенциала для избранных слияний химерного пептида OdK2 с Fc с использованием клеток СНО, стабильно трансфицированных человеческим Kv1.3 или Kv1.1, как описано в разделе "Материалы и способы". Кратность селективности рассчитывали в виде соотношения IC_{50} (Kv1.1) и IC_{50} (Kv1.3). В табл. 3 показаны значения IC_{50} для избранных вариантов и материнских слияний KV1C2 и KV1N2 с OdK2 и Osk1 соответственно.

Таблица 2

Слитый белок	Kv1.3, %	Kv1.1, %
	ингибирования при 1 нМ	ингибирования при 100 нМ
KV1D197	83	37
KV1D37	67	40
KV1D267	64	49
KV1D229	85	54
KV1D261	85	61
KV1D161	76	63
KV1D69	86	64
KV1C2*	36	40
KV1D280	-	97**

* Материнская молекула (слияние OdK2-Fc).

** Слитый белок (10 нМ).

Таблица 3

Слитый белок	Kv1.3, IC_{50} (нМ) *	Kv1.1, IC_{50} (нМ) *	Селективность **
KV1D261	0,15	85	582
KV1D197	0,3	145	483
KV1D229	0,25	70	280
KV1D267	0,47	103	219
KV1C2	13	865	67
KV1N2	0,3	2	7

* Значения IC_{50} из электрофизиологического исследования с фиксацией потенциала.

** Селективность = $IC_{50}(Kv1.1)/IC_{50}(Kv1.3)$.

На основании исследований с фиксацией потенциала слитые белки химерного пептида OdK2 с Fc имели от приблизительно 28-кратно до приблизительно 87-кратно увеличенную силу по отношению к Kv1.3 и приблизительно 3-9-кратно увеличенную селективность по сравнению с материнским KV1C2 (слияние OdK2-Fc), и увеличенную приблизительно в ~85 раз селективность по сравнению с материнским KV1N2 (слияние OsK1-Fc).

Ингибирование Т-клеточной активации.

Избранные слияния химерного пептида OdK2 с Fc оценивали на их способность ингибировать Т-клеточную активацию, измеренную в виде ингибирования секреции IL-2 индуцированными антителами к CD3/C28 Т-клетками, как описано в разделе "Материалы и способы". Ингибирование измеряли с одной концентрацией (100 нМ) слияний химерного пептида OdK2 с Fc, а результаты представляли в виде % ингибирования от максимальной продукции IL-2 на фиг. 5А. KV1B03 идентичен материнскому KV1C2 (слияние OdK2), и его случайно воссоздали в ходе построения библиотеки. На фиг. 5В показано зависимое от концентрации ингибирование продукции IL-2 активированными Т-клетками посредством KV1D261. Значение IC₅₀ для ингибирования Т-клеток CD4⁺ для слитого белка KV1D261 составило 1,66 нМ.

Корреляцию ингибирования Т-клеточной активации и связывания с Kv1.3 с использованием сырых супернатантов, выполненных во время первичного скрининга библиотеки, оценили с целью определения способности идентифицировать функциональные блокаторы Kv1.3 с помощью анализа связывания (фиг. 5С). Между двумя анализами выявили значительную корреляцию (коэффициент корреляции Пирсона: r 0,9339, p < 0,0001).

Антагонистические эффекты слитых белков обусловлены пептидной частью.

Для определения того, сохраняет ли пептидная часть ингибирующие характеристики и селективность слияний химерного пептида OdK2 с Fc, характеристики избранных слияний химерного OdK2 сравнили с характеристиками соответствующих синтетических пептидов.

KV1D261 и соответствующий синтетический пептид p261 (SEQ ID NO: 42) оценили на силу и селективность к Kv1.3, перекрестную реактивность к крысиным каналам Kv1.3 и ингибирование Т-клеточной активации. hERG проанализировали с использованием обычных способов, таких как указанные в Dubin et al., J. Biomol. Screen. 10:168-81, 2005. Все используемые линии клеток стабильно экспрессировали интересующий канал, за исключением крысиного Kv1.3 и hKCa3.1. Результаты экспериментов с участием KV1D261 и соответствующего синтетического пептида p261 показаны в табл. 4. Синтетический пептид оказался в ~10 раз более сильным, чем слияние Fc, как в электрофизиологическом исследовании, так и при Т-клеточном ингибировании, и сохранил селективность при сравнении с соответствующим слитым белком, показывая, что искусственно измененная область пептида ответственна за придание таких свойств, как сила и селективность. Предполагали потерю силы при слиянии с Fc в связи с увеличением энтропии при увеличении молекулярной массы.

Таблица 4

Канал/клеточная линия	Анализ	KV1D261		Синтетический p261	
		IC ₅₀ (нМ)	Кратность селективности*	IC ₅₀ (нМ)	Кратность селективности*
Т-клетка человека CD4 ⁺	Ингибирование IL-2	~2	-	0,02	-
hKv1.3 человека/CHO	Эл.-физ.	0,15	-	0,02	-
Kv1.3 крысы/CHO	Эл.-физ.	< 0,3	-	-	-
Kv1.3/Т-клетка CD4 ⁺ человека	Эл.-физ.	< 1	-	0,016	-
Kv1.3/Т-клетка CD4 ⁺ крысы	Эл.-физ.	0,29	-	-	-
hKv1.1/CHO	Эл.-физ.	85	567 x	3,3	165
hKv1.2/CHO	Эл.-физ.	> 300	> 2000	68	3400
hKv1.5/CHO	Эл.-физ.	> 1000	> 6000	-	-
hERG/CHO	Эл.-физ.	> 1000	> 6000	-	-

КСаЗ.1/Т-клетка CD4 ⁺ человека	Эл.-физ.	> 100	> 600	-	-
КСаЗ.1/СНО	Эл.-физ.	-	-	> 100	> 5000

Эл.-физ.: электрофизиологическое неавтоматизированное исследование с фиксацией потенциала.

* Соотношение $IC_{50(hKv1.x)}/IC_{50(hxv1.3)}$ в клетках СНО.

Фармакокинетические свойства KV1D261.

Крысам Спрег-Доули вводили KV1D261 (слияние 261-Fc) путем внутривенного болюсного введения исходного раствора 8,3 мг/мл 1× ФСБ pH 7,0 в объеме 1,2 мл/кг для достижения конечной дозы 10 мг/кг. Белок измеряли с использованием как ИФА, так и анализа FACS. Период полужизни составил приблизительно 72 ч.

Пример 4. Создание библиотеки аминокислотного сканирования (библиотека KV1D26L1).

С целью дополнительного улучшения селективности блокирующих Kv1.3 пептидов создали библиотеку сканирования путем одиночных замещений 9 аминокислот (A, R, Q, E, H, L, K, V, D) в каждом нецистеиновом остатке пептидной области KV1D26 (соответствующий пептид p26, SEQ ID NO: 111) сильного, но не селективного варианта, выявленного в библиотеке химеры OdK2/Osk1, описанной в примере 2. Данная библиотека аминокислотного сканирования состояла из 270 вариантов.

Библиотеку создавали и экспрессировали с использованием обычных способов молекулярной биологии и как описано выше. Кратко, гены, кодирующие варианты пептидов, синтезировали при помощи синтетической генетической сборки (патент США № US 6521427 и патент США № US 6670127) и клонировали в рамке с линкером GS (G₄S)₄ (SEQ ID NO: 119) сливающуюся последовательность IgG4 Fc в вектор экспрессии млекопитающих.

Библиотеку экспрессировали, как описано выше, и ее скрининг осуществляли в виде сырых супернатантов в отношении связывания с линией клеток НЕК, трансфицированных каналом Kv1.3 человека с химерной петлей ЕС3, и в отношении селективности путем связывания с линией клеток НЕК, трансфицированных каналом Kv1.1 человека с химерной петлей ЕС3, как описано выше. Активность нормализовали после количественного определения каждого варианта. % связывания для Kv1.3 и Kv1.1 выражали в виде процента от материнского KV1C2 (слияние OdK2-Fc), как описано в разделе "Материалы и способы". Скрининг библиотеки также выполнили в анализе потока таллия с использованием двух клеточных линий, как описано в разделе "Материалы и способы".

На фиг. 4А показаны последовательности избранных вариантов. Данные анализов связывания и потока таллия суммированы на фиг. 4В.

Множество вариантов из библиотеки аминокислотного сканирования продемонстрировали увеличенные связывание и селективность к Kv1.3 по сравнению с Kv1.1. При скрининге в анализе связывания замещения лизина на глутамин устойчиво приводили к увеличенной селективности к Kv1.3 по сравнению с Kv1.1. Избранные варианты, демонстрирующие связывание с Kv1.3 >80% и >1,3-кратную селективность к Kv1.1 очистили и дополнительно определили характеристики.

Пример 5. Определение характеристик вариантов, полученных из библиотек аминокислотного сканирования (библиотека KV1D26L1).

Конкурирование с токсинами-ингибиторами Kv.

Избранные варианты очистили и оценили на их способность к конкурированию с известным ингибитором Kv1.3, agitoxin-2-CysTAMRA, в одноточечном анализе и анализе зависимости ответа от концентрации, как описано выше. Ингибирование оценили в стабильных клетках НЕК293, экспрессирующих химерную петлю ЕС3 человеческого Kv1.3, с использованием 10 нМ Agitoxin-2-CysTAMRA и каждого из вариантов в концентрации 40 нМ для одноточечных анализов или от 0,015 нМ до 4 мкМ для исследования зависимости ответа от концентрации.

% ингибирования связывания agitoxin-2-CysTAMRA и значения IC_{50} для избранных вариантов показаны в табл. 5. Избранные варианты ингибировали связывание agitoxin-2-CysTAMRA с Kv1.3 при уровнях, схожих с KV1D261, а значения IC_{50} варьировали от 5 нМ до 1,3 мкМ, при этом также несколько вариантов находились в низком наномолярном диапазоне KV1D261.

Таблица 5

ID белка	Конкурентное связывание. % ингибирования. Одна концентрация (40 нМ)	IC ₅₀ конкурентного связывания (нМ)	% ингибирования Т-клеток. Одна концентрация (5 нМ)	% ингибирования Т-клеток. Одна концентрация (250 нМ)	IC ₅₀ Т-клеточного ингибирования (нМ)
KV1D664	65,1	5,7	0	71,1	нВ
KV1D625	21,3	нВ	0	70,1	нВ
KV1D581	61,2	нВ	13,4	78	нВ
KV1D603	64,2	нВ	33,7	77,5	7,5
KV1D342	47,6	нВ	7,5	78,2	нВ
KV1D576	76,2	нВ	16,3	76,2	нВ
KV1D291	49,6	нВ	0	нВ	нВ
KV1D579	31,1	94,4	0	нВ	26,8
KV1D294	46,8	нВ	0	нВ	нВ
KV1 D662	45,4	нВ	0	нВ	нВ
KV1D665	5,6	1394	0	нВ	нВ
KV1D656	30,4	91,1	0	нВ	нВ
KV1D414	32,2	нВ	0	нВ	нВ
KV1D356	69,7	нВ	22,2	нВ	нВ
KV1D437	69,8	5	16,8	нВ	нВ
KV1D604	26,5	нВ	22,4	нВ	26,9
KV1D261	69,7	7,5	67,9	нВ	2,3
Ингибирование отсутствует	0	0	нВ	нВ	0
Контроль Fc	нВ	нВ	0	нВ	0

нВ: не выполняли.

0: отсутствует поддающееся измерению ингибирование.

Ингибирование Т-клеточной активации.

Способность избранных вариантов ингибировать Т-клеточную активацию оценили, как описано выше с использованием секреции IL-2 в качестве маркера активации.

Анализы выполнили с одной концентрацией варианта, 5 нМ или 250 нМ, или с использованием диапазона от 0,015 до 250 нМ, для анализа зависимости ответа от концентрации. % ингибирования по сравнению с максимальным сигналом для избранных вариантов показаны в табл. 5.

KV1D579 представляет собой сильный и селективный ингибитор Kv1.3.

KV1D579 изучили в исследованиях с фиксацией потенциала всей клетки и анализах потока таллия с использованием клеток, трансфицированных человеческим Kv1.3, Kv1.1 или Kv1.6, как описано выше. Значения IC₅₀ для KV1D579 перечислены в табл. 6 вместе с материнским KV1D26, вариантом слияния химерный OdK-Fc, выделенным в примере 2. Значения в скобках получены из анализов потока таллия, а значения без скобок получены из исследований с фиксацией потенциала.

Таблица 6

Белок	hKv1.3 IC ₅₀ (нМ)	hKv1.1 IC ₅₀ (нМ)	Селектив- ность	hKv1.6	
				IC ₅₀ (нМ)	Селектив- ность*
KV1D26	~ 0,21/ (0,32)	~ 2/(5,8)	~ 10/(18)	0,6	3
KV1D579	0,14/ (0,14)	> 1000/ (> 380)	> 7143/ (> 2714)	93,7	669

Значения в скобках получены из анализов ингибирования потока таллия.

* Соотношение IC_{50(Kv1.3)}/IC_{50(Kv1.6)}.

Пример 6. Создание библиотеки С-концевого удлинения (библиотека KV1D819L1).

Было обнаружено, что несколько слитых белков пептид-Fc, конъюгированных с использованием линкера GS(G₄S)₄ (SEQ ID NO: 119), индуцировало нежелательное высвобождение воспалительного цитокина из культур покоящихся мононуклеарных клеток периферической крови человека *in vitro*, тогда как соответствующие синтетические пептиды сами по себе не оказывали такого действия. Таким образом, нежелательное высвобождение цитокина было обусловлено типом двухвалентного слияния пептид-Fc или самим Fc.

Для предотвращения нежелательного высвобождения цитокина пептид 261 (p261) (SEQ ID NO: 42) синтезировали в виде слитого белка с человеческим сывороточным альбумином с использованием линкера GS(G₄S)₄ (SEQ ID NO: 119).

Силу полученного слитого белка (KV1D261_23) дополнительно оптимизировали путем создания библиотеки слитого белка на основании KV1D261_23, где пептид p261 удлиненили на С-конце четырьмя аминокислотами. Предположили, что удлинение С-конца пептидной области слитого белка KV1D261_23 позволит увеличить связывающие взаимодействия пептида с внеклеточными петлями канала Kv1.3 и, таким образом, увеличит силу.

Слитый белок KV1D261_23 модифицировали путем вставки 4 дополнительных аминокислот между С-концом пептида и промежуточным линкером GS(G₄S)₄ (SEQ ID NO: 119), при этом следующие 12 остатков на каждое положение с полной комбинацией (Q, R, P, H, K, T, N, S, E, G, A и D) были вставлены в новые положения 39, 40, 41 и 42 пептида 261. Соотношение для каждого остатка составило 1, за исключением R (1,5) и S (0,5), а полученное теоретическое число возможных вариантов данной библиотеки составило 12⁴ (20 736). Гены, кодирующие пептиды с различными С-концевыми удлинениями, синтезировали, как описано ранее, и клонировали в рамке с линкером GS(G₄S)₄ (SEQ ID NO: 119) и последовательностью, сливающейся с человеческим сывороточным альбумином, в вектор экспрессии млекопитающих с использованием обычных способов молекулярной биологии.

Библиотеку экспрессировали рекомбинантно во временно трансфицированные клетки НЕК293. Выполнили скрининг сырых супернатантов с использованием прямого анализа связывания и функциональных анализов потока таллия с использованием линии клеток НЕК, трансфицированных хвостовым химерным каналом Kv1.3 человека в отношении силы Kv1.3, и линии клеток НЕК, трансфицированных хвостовым химерным каналом Kv1.1 человека. Уровень попаданий из данной библиотеки был высоким в основных (R, H и K), кислотных (T, N и G) и неполярных (A и P) остатках. На фиг. 6 показаны результаты анализов связывания и потока таллия для избранных слитых белков.

Пример 7. Определение характеристик библиотеки С-концевого удлинения (библиотека KV1D819L1).

Избранных кандидатов, выявленных из библиотеки С-концевого удлинения, очистили и подтвердили связывание с Kv1.3. Кривые зависимости ответа от концентрации построили для анализов потока таллия. В табл. 7 показаны значения IC₅₀, определенные в анализе потока таллия, и аминокислотная последовательность С-концевого удлинения для каждого варианта. KV1D261_26 (слияние p261-HSA с использованием линкера GS(G₄S)₈ (SEQ ID NO: 120)) использовали в качестве контроля в данном анализе. Большинство слияний с пептидом p261 с С-концевым удлинением продемонстрировало схожую или большую силу в анализе потока таллия по сравнению с контролем с неудлиненными пептидными фрагментами. Слияние KV1D261_26, имеющее более длинный линкер, чем KV1D261_23, устойчиво оказывалось в ~5 раз более сильным, чем KV1D261_23 (слитый белок p261-HSA с использованием линкера GS(G₄S)₄ (SEQ ID NO: 119)).

Таблица 7

ID белка	Фрагмент, увеличивающий период полужизни	Линкер	Пептидная часть	С-концевое удлинение		% связывания (KV1D261_26)	IC ₅₀ потока таллия (нМ)
				Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:		
KV1D826	HSA*	GS (G4S) 4**	Удлинённый p261	TRRP	156	109,8%	3,4
KV1D829	HSA	GS (G4S) 4	Удлинённый p261	AHRH	209	96,6%	3,3
KV1D830	HSA	GS (G4S) 4	Удлинённый p261	AQRP	210	76,2%	7,6
KV1D831	HSA	GS (G4S) 4	Удлинённый p261	ARRN	234	117,2%	2,7
KV1D832	HSA	GS (G4S) 4	Удлинённый p261	ASDN	236	15,1%	37,2
KV1D834	HSA	GS (G4S) 4	Удлинённый p261	ATRP	206	95,2%	5,9
KV1D841	HSA	GS (G4S) 4	Удлинённый p261	NHRT	222	88,4%	5,9
KV1D848	HSA	GS (G4S) 4	Удлинённый p261	PNRT	223	66,2%	6,7

KV1D853	HSA	GS (G ₄ S) ₄	Удлинённый p261	PTTR	241	55,0%	9,1
KV1D856	HSA	GS (G ₄ S) ₄	Удлинённый p261	RHNT	226	34,5%	6,7
KV1D858	HSA	GS (G ₄ S) ₄	Удлинённый p261	RKKP	173	73,7%	6,0
KV1D860	HSA	GS (G ₄ S) ₄	Удлинённый p261	RQTR	253	52,6%	6,7
KV1D863	HSA	GS (G ₄ S) ₄	Удлинённый p261	RRRP	208	100,0%	2,8
KV1D864	HSA	GS (G ₄ S) ₄	Удлинённый p261	RTRQ	248	57,9%	5,3
KV1D865	HSA	GS (G ₄ S) ₄	Удлинённый p261	SHRP	139	127,6%	2,8
KV1D869	HSA	GS (G ₄ S) ₄	Удлинённый p261	TTRT	233	77,4%	5,9
KV1D261_26	HSA	GS (G ₄ S) ₄	Удлинённый p261	Отсутствует		99,8%	1,0

* Человеческий сывороточный альбумин.

** SEQ ID NO: 119.

Пример 8. Конструирование слитого белка пептид-HSA.

Пептид 261 конструировали с образованием слитого белка с человеческим сывороточным альбумином (HSA) при помощи различных линкеров, а полученные слитые белки протестировали в отношении их силы и селективности к Kv1.3 и ингибирования Т-клеточной активации. Результаты Т-клеточного ингибирования, измеренного в виде ингибирования секреции IL-2, а также ингибирования потока таллия пептидом 261, конъюгированным с HSA посредством различных линкеров, показаны в табл. 8.

Таблица 8

Белок	Название линкера	SEQ ID NO: линкера	Т-клеточное ингибирование IC ₅₀ (нМ)	IC ₅₀ потока таллия Kv1.3 (нМ)
KV1D261_23	GS (G ₄ S) ₄	119	80,1	20,0
KV1D261_32	(EAAAK) ₄	117	129,1	10,2
KV1D261_33	AS (AP) ₁₀ GS	115	10,8	1,1
KV1D261_34	AS (AP) ₂₀ GS	116	4,5	0,4
KV1D261_35	1DC1 (13AA) ₂	113	20,3	3,6
KV1D261_36	1DC1 (13AA) ₃	114	10,4	1,8
KV1D261_37	1FU1	112	151,1	9,2
KV1D261_38	(EAAAK) ₈	118	10,3	0,7

Конструирование с использованием линкера показало, что вставка более структурированного линкера из повторов аланин-пролин (AP) в слитый белок вместо более гибкого линкера глицин-серин (GS) существенно увеличивала силу, и что увеличение длины линкера дополнительно прибавляло силу. Линкеры 1DC1(13AA)₂ (SEQ ID NO: 113), и 1DC1(13AA)₃ (SEQ ID NO: 114), и (EAAAK)₈ (SEQ ID NO: 118) также улучшали силу, но оказались менее стабильными в ходе продукции протеина с использованием фрагментов слитого белка, присутствующих после очистки. Слитый белок KV1D261_34 с пептидом 261, конъюгированный с HSA посредством линкера AS(AP)₂₀GS (SEQ ID NO: 116) имел IC₅₀ в отношении Kv1.3 приблизительно 4 нМ в анализе Т-клеточного ингибирования и IC₅₀ приблизительно 0,4 нМ в анализе потока таллия.

Определение характеристик слияний p261 и p579 с HSA.

Слитый белок KV1D261_34 и соответствующий синтетический пептид p261, а также пептид p579, конъюгированный с человеческим HSA посредством линкера AS(AP)₂₀GS (SEQ ID NO: 116) с образованием слитого белка KV1G49.KV1W720, дополнительно протестировали в различных функциональных анализах и на их селективность к каналам Kv человека, как показано в табл. 9.

Таблица 9

Канал/клеточная линия	Анализ	KV1D261_34		Синтетический пептид p261		KV1G49.KV1W720	
		IC ₅₀ (нМ)	Кратность селективности [#]	IC ₅₀ (нМ)	Кратность селективности [#]	IC ₅₀ (нМ)	Кратность селективности [#]
hKv1.3/HEK	Конкурентное связывание	54	-	1,53	-	342,0	
hKv1.3/CHO	Поток таллия	0,3	-	0,03-0,04	-	9,0	
hKv1.3/CHO	Эл.-физ.	1,2	-	0,02*	-	3,0	
Первичная Т-клетка CD4 ⁺ человека	Эл.-физ.	НВ	-	0,016	-		
Первичная Т-клетка CD4 ⁺ человека	Т-клеточное ингибирование	2,1	-	0,02	-	15,8	
hKv1.1/CHO	Поток таллия	79	247	2,0-8,0	5-266	> 251**	
hKv1.1/CHO	Эл.-физ.	> 1000	> 1000	3,3	165		
hKv1.2/CHO	Эл.-физ.	> 100	> 100	68	3400		
hKv1.4/CHO	Эл.-физ.	> 100	> 100	> 300	> 15 000		
hKv1.5/CHO	Эл.-физ.	> 100	> 100	-	-		
hKv1.6/CHO	Эл.-физ.	10	8	0,32	12		
hKv1.7/CHO	Эл.-физ.	> 100	> 100	> 100	> 5000		
hKCa3.1/CHO	Эл.-физ.	-	-	> 100	> 5000		

Эл.-физ.: электрофизиологическое исследование с фиксацией потенциала.

* IC₅₀ 20 пМ в 1% БСА и 13 пМ в 5% фетальной телячьей сыворотке (FCS).

** Неполный ответ на концентрацию в связи с низкой силой. Сообщено, что IC₅₀ больше, чем наивысшая протестированная концентрация.

Соотношение IC₅₀(KV1.1)/IC₅₀(Kv1.3) в клетках CHO.

KV1D261_34 также протестировали на его способность ингибировать тапсигаргин-индуцированную продукцию IL-17A из цельной крови человека и свиньи (карликовая свинья Юкатан). Значение IC₅₀ для ингибирования как у людей, так и у карликовой свиньи составило 0,5 нМ. KV1D261_34 также ингибировал активацию Т-клеток CD4⁺ (секреция IL-2) у карликовой свиньи, при этом значение IC₅₀ составило 1,6 нМ.

Пример 9. Создание и определение характеристик дополнительных слияний с пептидом с С-концевым удлинением.

Пептиды p261 (SEQ ID NO: 42) и p579 (SEQ ID NO: 3) удлинители с использованием нескольких С-концевых удлинений и конъюгировали с HSA посредством линкера AS(AP)₂₀GS (SEQ ID NO: 116) или GS(AP)₂₀AS (SEQ ID NO: 428). Избранные слитые белки экспрессировали, очищали и оценивали в анализах, включая конкурентное связывание, поток таллия, ингибирование *in vitro* активации Т-клеток CD4⁺ человека и электрофизиологические анализы.

На фиг. 7А показаны характеристики слитых белков, имеющих различные С-концевые удлинения на пептиде p261. Для оценки Т-клеточного ингибирования избранные варианты тестировали на % ингибирования продукции IL-2 Т-клетками CD4⁺ человека, стимулированными антителами к CD3/CD28, в одной концентрации 1 нМ (% ингибирования Т-клеток при 1 нМ), или же значения IC₅₀ получали из кривых зависимости ответа от концентрации с использованием того же самого анализа (IC₅₀ Т-клеточного ингибирования нМ). Кратность селективности измеряли в виде соотношения IC₅₀(Kv1.1)/IC₅₀(Kv1.3) с использованием значений из анализа потока таллия.

Значения K_i конкурентного связывания для слитых белков с удлиненным на С-конце пептидом варьировали от приблизительно 0,15 нМ до приблизительно 18,0 нМ по сравнению с K_i приблизительно 1 нМ для материнского слияния с неудлиненным пептидом KV1D261_34. Несколько вариантов имели улучшенную силу и селективность по сравнению с материнским KV1D261_34, при этом значение IC₅₀ потока таллия варьировало от приблизительно 10 пМ до приблизительно 1 нМ, а превышение кратности селективности по отношению к Kv1.1 от приблизительно 30 до приблизительно 800.

Неавтоматизированные исследования с фиксацией потенциала выполнили для избранных слитых белков с пептидом в линиях клеток CHO, трансфицированных Kv1.3, как описано выше. Значения IC₅₀ для KV1G15.KV1W686 (С-концевое удлинение пептида p261 с использованием ANRH (SEQ ID NO: 209), слитого с HSA посредством линкера AS(AP)₂₀GS (SEQ ID NO: 116), составило 199 пМ. Некоторые С-концевые вставки приводили к ~5-10-кратному увеличению силы по сравнению с материнским KV1D261_34.

Слитые белки p579 с избранным С-концевым удлинением или без него, конъюгированные с HSA с помощью промежуточного GS(AP)₂₀AS (SEQ ID NO: 116), оценили в анализах конкурентного связывания (конкуренция с 10 нМ agitoxin-cys-TAMRA, связывающимся с клетками НЕК) и Т-клеточного ингибирования (секреция IL-2), результаты показаны на фиг. 7В. Некоторые С-концевые вставки приводили к ~3-5-кратному увеличению силы по сравнению с материнским KV1G4 9.KV1W720.

Несколько слитых белков с HSA, конъюгированных с вариантами пептида при помощи линкера AS(AP)₂₀GS (SEQ ID NO: 116), протестировали на их способность индуцировать секрецию цитокинов и хемокинов (IFN γ , IL-1 β , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5, IL12p70 и IL-13) из МКПК. Для этих слияний с HSA индукции не наблюдали.

Пример 10. Фармакокинетика и фармакодинамика KV1D261_34 у карликовых свиней.

KV1D261_34 (слитый белок пептида 261 с HSA посредством промежуточного линкера AS(AP)₂₀GS (SEQ ID NO: 116)) вводили карликовым свиньям в виде одной внутривенной инъекции (30 нмоль/кг). Образцы гепаринизированной плазмы собирали в различные временные точки после введения, и уровни в плазме определяли с использованием ИФА с иммобилизованными антителами к 261/антитела к пента-His-HRP. На фиг. 9 показаны результаты в виде среднего \pm СО для 4 животных до 36 дня и для 2 животных в конечной временной точке на 54 день. Период полужизни (T_{1/2}) слитого белка составлял 5-7 дней, клиренс (CL) составлял 0,008-0,01 мл/мин/кг и объем распределения (V_{ss}) = 90-120 мл/кг.

Целевое взаимодействие оценили путем измерения секреции IL-17А лимфоцитами в цельной крови *ex vivo*. Образцы цельной крови собирали у каждого опытного животного во временные точки -48, -24, -1 ч до введения и временные точки 0,017-1296 ч (54 дня) после введения KV1D261_34 (30 нмоль/кг). Образцы цельной крови обрабатывали тапсигаргином при отсутствии или в присутствии 1 мкМ экзогенного пептида 261, при этом для каждого условия проводили три параллельных исследования на образец. Уровни цитокина IL-17 измеряли с помощью ИФА с антителами к IL-17А свиньи, и % ингибирования экзогенным пептидом 261 рассчитывали следующим образом:

100 - (средние концентрации (пг/мл) IL-17 в реакциях, включающих тапсигаргин и 1 мкМ экзогенного 261/средние концентрации (пг/мл) IL-17 в реакциях, включающих тапсигаргин) \times 100.

Результаты эксперимента, выраженные в виде % ингибирования индуцированной тапсигаргином секреции IL-17 экзогенным пептидом 261 (среднее \pm СО для 4 животных за исключением 54 дня, когда проанализировали 2 животных), показаны на фиг. 10. Средний % ингибирования индуцированной тапсигаргином секреции IL-17 экзогенным 261 для всех отобранных до введения дозы образцов и контрольного животного, которому не вводили дозу (все временные точки), составил 75,3 \pm 14,1%. Средний % ингибирования индуцированной тапсигаргином секреции IL-17 экзогенным 261 в цельной крови *ex vivo* составлял <25% в течение примерно 14 дней после в/в введения KV1D261-34, что указывает на высокий уровень целевого взаимодействия, обеспечиваемого циркулирующим KV1D261_34. Концентрации в плазме в эти временные точки составляли >10 нМ. В более поздние временные точки % ингибирования индуцированной тапсигаргином секреции IL-17 экзогенным 261 увеличивался до >65% на 36 день и достигал исходных уровней >80% к 54 дню, что указывает на постепенное уменьшение целевого взаимодействия при снижении уровней в плазме. Результаты данного исследования показывают, что KV1D261_34 является стабильным в плазме *in vivo* и имеет длительный период полужизни в плазме у карликовых свиней. После внутривенного введения циркулирующий KV1D261_34 является биодоступным и ингибирует индуцированную тапсигаргином секрецию IL-17 на лимфоцитах. Ингибирование индуцированной тапсигаргином секреции IL-17, по всей видимости, хорошо коррелировало с концентрацией в плазме, а эффективные концентрации в плазме соответствовали предполагаемому механизму действия (блокирование Kv1.3) KV1D261_34.

Пример 11. Модель индуцированной гемоцианином лимфы улитки (KLH) гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) у карликовых свиней.

Модель гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) у карликовых свиней применяли в качестве *in vivo* модели для оценки способности KV1D261_34 ингибировать функцию Т-клеток. Карликовым свиньям вводили в/в носитель (ФСБ, n=6) или KV1D261_34 (30 нмоль/кг, n=6). В качестве положительного контроля циклоспорин А вводили подкожно два раза в день в дозе 1 мг/кг в концентрации 10 мг/мл со дня -1 до вскрытия (n=6). Введение дозы начинали за один день (день -1) до иммунизации антигеном KLH. Карликовых свиней иммунизировали KLH на 0 день путем подкожных инъекций 1 мл либо 5 мг/мл KLH в неполном адьюванте Фрейнда (IFA), либо ФСБ в IFA для контрольной группы. Инъекции выполняли в ~5 местах на задней части задних ног. Затем животным выполнили стимуляцию на 7 день посредством внутривенных инъекций 0,1 мл/участок KLH в дозе 10, 5, 2,5, 1,25 мг/мл или ФСБ, при этом один участок на одну дозу стимуляции находился на левом боку, и идентичный участок стимуляции находился на правом боку. Уровень уплотнения измеряли на 9 и 10 дни, через один и два дня после стимуляции, а на 10 день образцы ткани и крови собирали для дополнительных измерений насыщенности клетками дренирующего лимфатического узла, титров антител к антигену и гистологии места стимуляции.

Дренирующие лимфатические узлы собирали на 10 день, через два дня после стимуляции, для определения насыщенности клетками лимфатического узла. Результаты показаны на фиг. 11. Пролеченные

KV1D261_34 животные имели значительно сниженную насыщенность клетками по сравнению с пролеченными носителем животными, подвергнутыми стимуляции. Насыщенность клетками уменьшилась до уровня, сравнимого с таковым, наблюдаемым у неиммунизированных контрольных животных.

Не обнаружили выраженного уменьшения титров антител к KLH или уплотнения у получавших KV1D261_34 животных на 9 и 10 дни (1 и 2 дня после провокации).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный пептидный антагонист потенциал-зависимого калиевого канала Kv1.3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42.

2. Слитый белок для подавления Т-клеточной активации, содержащий антагонист по п.1, конъюгированный с увеличивающим период полужизни фрагментом.

3. Слитый белок по п.2, в котором увеличивающий период полужизни фрагмент представляет собой человеческий сывороточный альбумин, альбуминсвязывающий домен (ADB), домен Fc или полиэтиленгликоль (ПЭГ).

4. Слитый белок по п.3, в котором увеличивающий период полужизни фрагмент представляет собой человеческий сывороточный альбумин или домен Fc.

5. Слитый белок по п.4, в котором антагонист по п.1 конъюгирован с увеличивающим период полужизни фрагментом посредством линкера.

6. Слитый белок по п.5, в котором линкер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122 или 428.

7. Слитый белок по п.6, в котором увеличивающий период полужизни фрагмент представляет собой человеческий сывороточный альбумин, а линкер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116.

8. Слитый белок по п.6, в котором увеличивающий период полужизни фрагмент представляет собой домен Fc, а линкер содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 116.

9. Выделенный полинуклеотид, кодирующий антагонист по п.1.

10. Экспрессионный вектор для подавления Т-клеточной активации, содержащий выделенный полинуклеотид по п.9.

11. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.10.

12. Способ получения выделенного антагониста по п.1, включающий культивирование клетки-хозяина по п.11 и выделение антагониста, экспрессируемого клеткой-хозяином.

13. Фармацевтическая композиция, содержащая антагонист по п.1 и фармацевтически приемлемый носитель.

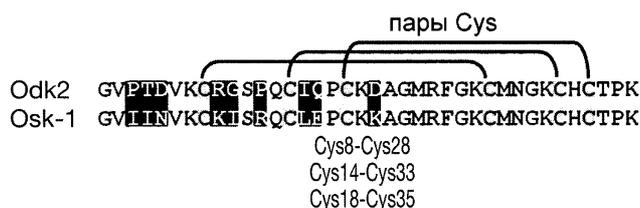
14. Способ подавления Т-клеточной активации у субъекта, имеющего состояние, связанное с нежелательной Т-клеточной активацией, включающий введение субъекту эффективного количества выделенного антагониста по п.1.

15. Способ по п.14, в котором состояние, связанное с нежелательной Т-клеточной активацией, представляет собой воспалительное состояние, иммунное и пролиферативное расстройство, ревматоидный артрит (РА), анкилозирующий спондилит, псориатический артрит, остеоартрит, остеопороз, увеит, воспалительный фиброз, склеродермию, фиброз легких, цирроз, воспалительное заболевание кишечника, болезнь Крона, язвенный колит, астму, аллергическую астму, аллергию, хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ), рассеянный склероз, псориаз, контактный дерматит, системную красную волчанку (СКВ) и другие формы волчанки, диабет, ожирение, рак, волчанку, рестеноз, системный склероз, склеродермию, гломерулонефрит, синдром Шегрена, воспалительную резорбцию костей, отторжение трансплантата или реакцию "трансплантат против хозяина".

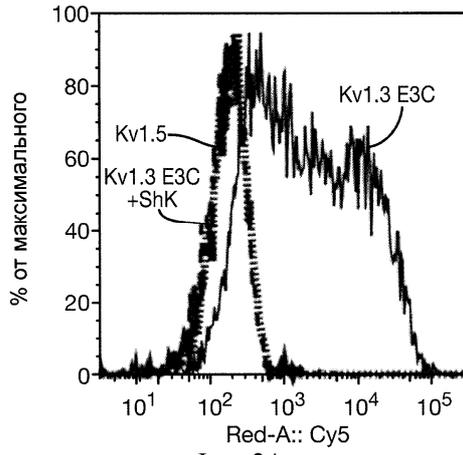
16. Способ по п.15, где волчанка представляет собой системную красную волчанку (СКВ).

17. Способ по п.15, где диабет представляет собой диабет I типа.

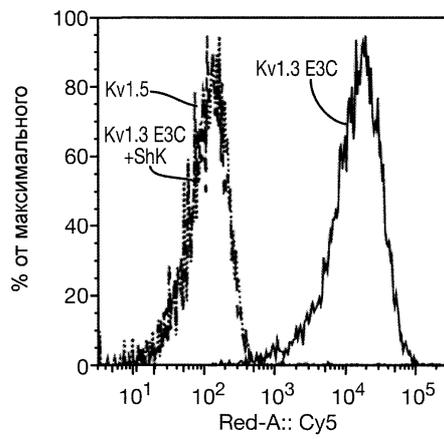
18. Применение антагониста по п.1 для подавления Т-клеточной активации у субъекта, имеющего состояние, связанное с нежелательной Т-клеточной активацией.



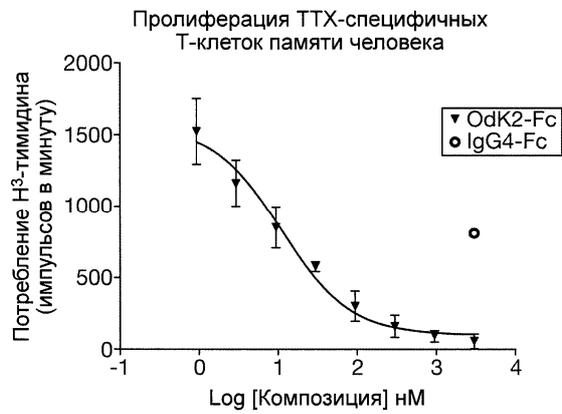
Фиг. 1



Фиг. 2А



Фиг. 2В



Фиг. 3

ID пептида/ ID клона	Последовательность в аминокислотных остатках																																					SEQ ID NO.	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37		38
Odk2	G	V	P	T	D	V	K	C	R	G	S	P	Q	C	I	Q	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	1
Osk-1	G	V	I	N	V	K	C	K	I	S	R	Q	C	L	E	P	C	K	K	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	2	
KV1D579	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	3
KV1D665	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	D	C	T	P	K	4
KV1D402	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	V	G	K	C	H	C	T	P	K	5
KV1D560	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	A	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	6
KV1D437	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	E	7
KV1D392	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	L	N	G	K	C	H	C	T	P	K	8
KV1D356	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	A	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	9
KV1D623	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	H	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	10
KV1D583	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	D	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	11
KV1D604	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	E	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	12
KV1D344	G	V	P	T	D	V	K	C	E	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	13
KV1D294	L	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	14
KV1D575	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	D	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	15
KV1D608	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	D	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	16
KV1D570	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	E	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	17
KV1D647	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	R	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	18
KV1D625	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	K	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	19
KV1D564	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	L	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	20
KV1D342	G	V	P	T	D	V	K	C	A	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	21
KV1D197	G	V	P	I	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	I	E	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	22
KV1D414	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	E	C	H	C	T	P	K	23
KV1D163	G	V	P	T	D	V	K	C	K	I	S	P	Q	C	I	E	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	24
KV1D664	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	V	C	T	P	K	25

KV1D67	G	V	P	I	D	V	K	C	R	I	S	P	Q	C	I	E	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	26	
KV1D387	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	A	N	G	K	C	H	C	T	P	K	27	
KV1D293	H	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	28	
KV1D578	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	Q	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	29	
KV1D562	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	E	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	30	
KV1D607	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	V	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	31	
KV1D37	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	I	E	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	32	
KV1D338	G	V	P	T	D	V	E	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	33	
KV1D229	G	V	P	T	N	V	K	C	K	I	S	R	Q	C	I	E	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	34	
KV1D203	G	V	P	I	D	V	K	C	K	I	S	P	Q	C	I	E	P	C	K	K	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	35	
KV1D179	G	V	I	T	D	V	K	C	K	I	S	P	Q	C	I	E	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	36	
KV1D439	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	L	37	
KV1D580	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	H	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	38	
KV1D589	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	L	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	39	
KV1D660	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	Q	C	T	P	K	40	
KV1D296	V	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	41	
KV1D261	G	V	P	I	N	V	K	C	K	I	S	R	Q	C	I	E	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	42	
KV1D159	G	V	P	T	D	V	K	C	K	I	S	P	Q	C	I	Q	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	43	
KV1D133	G	V	P	I	N	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	I	E	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	44	
KV1D161	G	V	P	T	D	V	K	C	K	I	S	R	Q	C	I	Q	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	45	
KV1D69	G	V	P	I	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	I	E	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	46	
KV1D603	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	Q	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	47	
KV1D556	G	V	P	T	D	V	D	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	48	
KV1D591	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	D	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	49	
KV1D597	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	L	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	50
KV1D590	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	V	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	51	
KV1D551	D	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	52	
KV1D619	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	D	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	53	
KV1D291	Q	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	54	
KV1D258	G	V	P	I	N	V	K	C	K	G	S	P	Q	C	I	E	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	55	

KV1D618	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	D	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	56	
KV1D337	G	V	P	T	D	V	Q	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	57	
KV1D430	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	H	K	58	
KV1D343	G	V	P	T	D	V	K	C	Q	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	59	
KV1D656	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	D	K	C	H	C	T	P	K	60	
KV1D355	G	V	P	T	D	V	A	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	61	
KV1D438	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	H	62	
KV1D225	G	V	P	T	N	V	K	C	K	I	S	R	Q	C	I	Q	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	63	
KV1D657	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	D	C	H	C	T	P	K	64	
KV1D582	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	V	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	65	
KV1D413	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	Q	C	H	C	T	P	K	66	
KV1D415	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	H	C	H	C	T	P	K	67	
KV1D328	G	V	P	T	D	V	A	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	68
KV1D193	G	V	P	I	D	V	K	C	K	I	S	R	Q	C	I	Q	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	69	
KV1LA1_1E02	G	V	P	T	D	V	K	C	K	I	S	R	Q	C	I	E	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	70	
KV1D255	G	V	P	I	N	V	K	C	K	I	S	P	Q	C	I	Q	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	71	
KV1D51	G	V	I	T	D	V	K	C	R	I	S	P	Q	C	I	E	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	72	
KV1D259	G	V	P	I	N	V	K	C	K	I	S	P	Q	C	I	E	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	73	
KV1D340	G	V	P	T	D	V	L	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	74	
KV1D433	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	V	K	75	
KV1D581	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	K	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	76	
KV1D372	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	R	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	77	
KV1D314	G	V	P	Q	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	78	
KV1D374	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	E	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	79	
KV1D375	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	H	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	80	
KV1D576	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	A	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	81	
KV1D587	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	E	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	82	
KV1D33	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	H	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	83	
KV1D269	G	V	P	I	N	V	K	C	K	I	S	R	Q	C	I	E	P	C	K	K	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	84	
KV1D101	G	V	P	T	N	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	I	E	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	85	
KV1LA1_2C09	G	V	I	I	D	V	K	C	R	G	S	R	Q	C	I	E	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	N	C	T	P	K	86	

KV1D99	G	V	P	T	N	V	K	C	R	I	S	P	Q	C	I	E	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	87
KV1LA1_1G01	G	V	P	T	N	V	K	C	K	I	S	P	Q	C	I	E	P	C	K	K	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	88
KV1D31	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	P	Q	C	I	Q	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	89
KV1LA1_3F10	G	V	P	I	N	V	K	C	R	I	S	P	Q	C	I	E	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	90
KV1D289	A	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	91
KV1D586	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	Q	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	92
KV1D311	G	V	V	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	93
KV1D436	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	Q	94
KV1D406	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	E	K	C	H	C	T	P	K	95
KV1D315	G	V	P	E	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	96
KV1D265	G	V	P	I	N	V	K	C	K	I	S	R	Q	C	I	Q	P	C	K	K	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	97
KV1D233	G	V	P	T	N	V	K	C	K	I	S	R	Q	C	I	Q	P	C	K	K	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	98
KV1D237	G	V	P	T	N	V	K	C	K	I	S	R	Q	C	I	E	P	C	K	K	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	99
KV1D141	G	V	P	I	N	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	I	E	P	C	K	K	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	100
KV1D129	G	V	P	I	N	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	I	Q	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	101
KV1D77	G	V	P	I	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	I	E	P	C	K	K	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	102
KV1D97	G	V	P	T	N	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	I	Q	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	103
KV1D257	G	V	P	I	N	V	K	C	K	I	S	R	Q	C	I	Q	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	104
KV1D245	G	V	I	T	N	V	K	C	K	I	S	R	Q	C	I	E	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	105
KV1D173	G	V	P	T	D	V	K	C	K	I	S	R	Q	C	I	E	P	C	K	K	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	106
KV1D63	G	V	P	I	D	V	K	C	R	I	S	P	Q	C	I	Q	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	107
KV1D588	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	H	P	C	K	D	A	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	108
KV1D365	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	Q	G	M	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	109
KV1D384	G	V	P	T	D	V	K	C	R	I	S	R	Q	C	L	K	P	C	K	D	A	G	L	R	F	G	K	C	M	N	G	K	C	H	C	T	P	K	110

Фиг. 4А

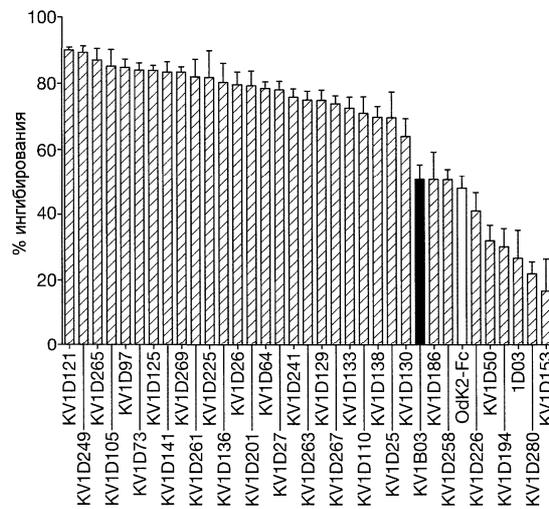
037308

ID пептида/ ID клона	SEQ ID NO:	Источник библиотеки	% связывания с Kv1.3(KV1C2)	% связывания с Kv1.1(KV1C2)	Селективность связывания*	IC ₅₀ потока таллия (нМ)
Odk2	1					
Osk-1	2					
KV1D579	3	KV1D26L1	319,5	4,1	77,6	0,458
KV1D665	4	KV1D26L1	151,8	8,2	18,5	0,227
KV1D402	5	KV1D26L1	226,1	29,0	7,8	2,178
KV1D560	6	KV1D26L1	379,0	55,9	6,8	0,995
KV1D437	7	KV1D26L1	232,3	36,5	6,4	1,054
KV1D392	8	KV1D26L1	359,2	59,4	6,1	1,067
KV1D356	9	KV1D26L1	418,0	77,9	5,4	0,332
KV1D623	10	KV1D26L1	88,7	17,2	5,2	2,404
KV1D583	11	KV1D26L1	245,1	51,7	4,7	1,014
KV1D604	12	KV1D26L1	213,6	48,9	4,4	1,384
KV1D344	13	KV1D26L1	199,5	47,3	4,2	1,837
KV1D294	14	KV1D26L1	358,5	86,6	4,1	0,116
KV1D575	15	KV1D26L1	364,2	93,3	3,9	0,385
KV1D608	16	KV1D26L1	200,0	54,3	3,7	0,404
KV1D570	17	KV1D26L1	321,9	95,3	3,4	0,533
KV1D647	18	KV1D26L1	83,2	27,0	3,1	0,948
KV1D625	19	KV1D26L1	190,8	62,8	3,0	0,197
KV1D564	20	KV1D26L1	235,2	77,8	3,0	1,374
KV1D342	21	KV1D26L1	263,1	87,7	3,0	0,634
KV1D197	22	KV1C2L1	162,7	55,7	2,9	#H/B
KV1D414	23	KV1D26L1	362,8	129,5	2,8	0,791
KV1D163	24	KV1C2L1	81,7	28,7	2,8	#H/B
KV1D664	25	KV1D26L1	386,5	140,3	2,8	0,110
KV1D67	26	KV1C2L1	118,0	47,0	2,5	#H/B
KV1D387	27	KV1D26L1	245,5	98,6	2,5	1,042
KV1D293	28	KV1D26L1	332,6	136,0	2,4	0,238
KV1D578	29	KV1D26L1	300,5	126,7	2,4	0,181
KV1D562	30	KV1D26L1	180,6	78,1	2,3	0,927
KV1D607	31	KV1D26L1	404,9	182,2	2,2	0,802
KV1D37	32	KV1C2L1	174,5	80,7	2,2	#H/B
KV1D338	33	KV1D26L1	274,5	125,4	2,2	0,618
KV1D229	34	KV1C2L1	171,3	82,7	2,1	#H/B
KV1D203	35	KV1C2L1	131,5	63,6	2,1	#H/B
KV1D179	36	KV1C2L1	113,0	53,2	2,1	#H/B
KV1D439	37	KV1D26L1	393,5	187,7	2,1	0,271
KV1D580	38	KV1D26L1	411,1	202,3	2,0	0,450
KV1D589	39	KV1D26L1	443,9	222,0	2,0	0,214
KV1D660	40	KV1D26L1	375,6	194,7	1,9	0,113
KV1D296	41	KV1D26	322,2	168,5	1,9	0,106
KV1D261	42	KV1C2L1	150,9	78,5	1,9	#H/B
KV1D159	43	KV1C2L1	121,5	65,1	1,9	#H/B
KV1D133	44	KV1C2L1	194,9	108,4	1,8	#H/B
KV1D161	45	KV1C2L1	179,9	98,3	1,8	#H/B
KV1D69	46	KV1C2L1	161,2	88,2	1,8	#H/B
KV1D603	47	KV1D26L1	260,2	157,7	1,8	0,224
KV1D556	48	KV1D26L1	253,0	144,6	1,7	1,102
KV1D591	49	KV1D26L1	258,2	148,0	1,7	0,982
KV1D597	50	KV1D26L1	293,5	170,0	1,7	0,141
KV1D590	51	KV1D26L1	428,9	249,3	1,7	0,139
KV1D551	52	KV1D26L1	228,1	132,7	1,7	0,202
KV1D619	53	KV1D26L1	219,6	128,7	1,7	0,568
KV1D291	54	KV1D26L1	271,2	159,1	1,7	0,091
KV1D258	55	KV1C2L1	98,2	57,7	1,7	#H/B
KV1D618	56	KV1D26L1	431,9	258,6	1,7	0,622
KV1D337	57	KV1D26L1	373,0	225,5	1,7	0,334
KV1D430	58	KV1D26L1	396,6	241,2	1,6	0,698
KV1D343	59	KV1D26L1	209,0	128,3	1,6	0,332
KV1D656	60	KV1D26L1	258,1	158,5	1,6	0,314
KV1D335	61	KV1D26L1	338,3	207,9	1,6	0,325
KV1D438	62	KV1D26L1	358,1	223,0	1,6	0,650
KV1D225	63	KV1C2L1	191,7	121,3	1,6	#H/B
KV1D657	64	KV1D26L1	122,6	78,1	1,6	0,469
KV1D582	65	KV1D26L1	261,0	166,2	1,6	0,632
KV1D413	66	KV1D26L1	371,4	240,1	1,5	0,693
KV1D415	67	KV1D26L1	444,9	293,1	1,5	0,873
KV1D328	68	KV1D26L1	351,1	231,8	1,5	0,151
KV1D193	69	KV1C2L1	168,1	111,8	1,5	#H/B
KV1LA1_1E02	70	KV1C2L1	153,9	100,6	1,5	#H/B
KV1D255	71	KV1C2L1	151,6	103,8	1,5	#H/B
KV1D51	72	KV1C2L1	109,8	74,9	1,5	#H/B
KV1D259	73	KV1C2L1	108,3	73,1	1,5	#H/B
KV1D340	74	KV1D26L1	406,8	274,3	1,5	0,536
KV1D433	75	KV1D26L1	384,9	260,5	1,5	0,516
KV1D581	76	KV1D26L1	208,4	141,8	1,5	0,116
KV1D372	77	KV1D26L1	328,1	224,2	1,5	0,213
KV1D314	78	KV1D26L1	377,0	260,3	1,4	0,108
KV1D374	79	KV1D26L1	357,4	247,3	1,4	0,240
KV1D375	80	KV1D26L1	383,8	267,8	1,4	0,139
KV1D576	81	KV1D26L1	179,9	125,8	1,4	0,159
KV1D587	82	KV1D26L1	275,3	193,7	1,4	0,662
KV1D33	83	KV1C2L1	194,3	140,5	1,4	#H/B
KV1D269	84	KV1C2L1	192,5	133,3	1,4	#H/B
KV1D101	85	KV1C2L1	167,4	116,4	1,4	#H/B
KV1LA1_2C09	86	KV1C2L1	150,4	111,0	1,4	#H/B
KV1D99	87	KV1C2L1	142,6	99,0	1,4	#H/B
KV1LA1_1G01	88	KV1C2L1	134,8	95,7	1,4	#H/B
KV1D31	89	KV1C2L1	128,2	94,4	1,4	#H/B
KV1LA1_3F10	90	KV1C2L1	110,6	77,2	1,4	#H/B

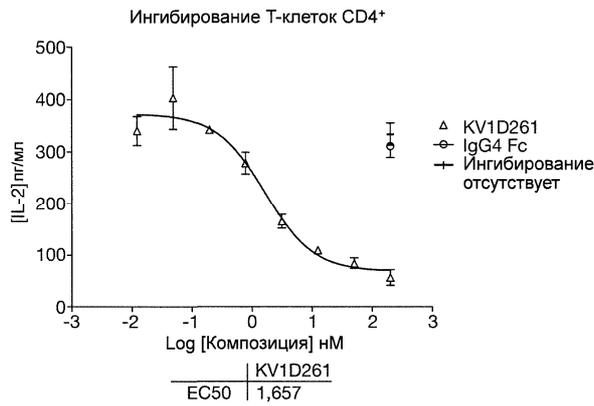
KV1D289	91	KV1D26L1	338,1	243,7	1,4	0,103
KV1D586	92	KV1D26L1	291,6	210,6	1,4	0,251
KV1D311	93	KV1D26L1	393,2	287,8	1,4	0,130
KV1D436	94	KV1D26L1	343,0	252,9	1,4	0,512
KV1D406	95	KV1D26L1	426,9	319,0	1,3	0,671
KV1D315	96	KV1D26L1	339,2	255,4	1,3	0,094
KV1D265	97	KV1C2L1	246,1	195,1	1,3	#Н/В
KV1D233	98	KV1C2L1	246,0	194,4	1,3	#Н/В
KV1D237	99	KV1C2L1	208,2	158,7	1,3	#Н/В
KV1D141	100	KV1C2L1	204,4	161,1	1,3	#Н/В
KV1D129	101	KV1C2L1	197,6	150,6	1,3	#Н/В
KV1D77	102	KV1C2L1	195,5	150,0	1,3	#Н/В
KV1D97	103	KV1C2L1	193,5	154,4	1,3	#Н/В
KV1D257	104	KV1C2L1	189,0	141,5	1,3	#Н/В
KV1D245	105	KV1C2L1	175,2	131,5	1,3	#Н/В
KV1D173	106	KV1C2L1	164,5	131,1	1,3	#Н/В
KV1D63	107	KV1C2L1	113,1	90,4	1,3	#Н/В
KV1D388	108	KV1D26L1	438,7	337,8	1,3	0,536
KV1D365	109	KV1D26L1	456,8	352,0	1,3	0,326
KV1D384	110	KV1D26L1	449,1	356,9	1,3	0,536

*соотношение % связывания с Kv1.3/% связывания с Kv1.1
#Н/В: не выполняли

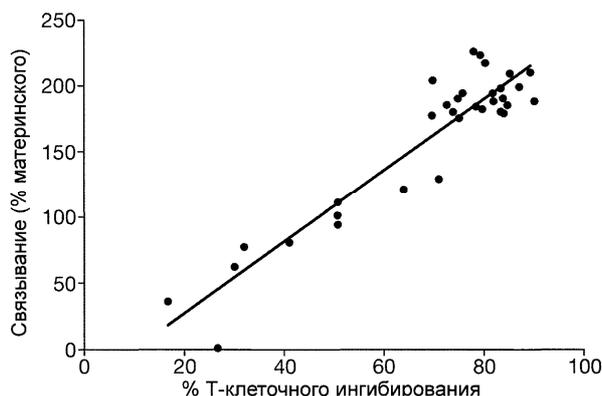
Фиг. 4В



Фиг. 5А



Фиг. 5В



Число пар XY	33
Кoeffициент корреляции Пирсона r	0,9339
Доверительный интервал 95%	0,8693 до 0,9671
P-значение (двустороннее)	< 0,0001
P-значение суммарное	***
Является ли корреляция достоверной? (альфа = 0,05)	Да
R-квадрат	0,8722

Фиг. 5С

Белок	% связывания	IC ₅₀ потока таплиа (нМ)	С-концевое удлинение		Удлиненный пептид	
			Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
KV1D819L1_55F01	367,0%	0,776	HAAG	123	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKHAAG	269
KV1D819L1_94C07	153,6%	3,273	RRPT	124	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKRRPT	270
KV1D819L1_94D07	132,8%	5,559	ASKP	125	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKASKP	271
KV1D819L1_74F03	128,5%	4,677	PKPQ	126	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKPKPQ	272
KV1D819L1_67B04	124,5%	11,614	ODQT	127	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKQDQT	273
KV1D819L1_92E05	122,1%	3,508	AHRP	128	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKAHRP	274
KV1D819L1_62A05	121,5%	7,079	QPTH	129	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKQPTH	275
KV1D819L1_62A06	121,1%	8,511	REQT	130	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKREQT	276
KV1D819L1_53C04	120,8%	2,851	PPKP	131	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKPPKP	277
KV1D819L1_67D09	120,7%	8,710	KQGA	132	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKKQGA	278
KV1D819L1_68D08	119,4%	3,467	TRPA	133	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKTRPA	279
KV1D819L1_63A05	119,4%	3,273	APHK	134	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKAPHK	280
KV1D819L1_62A07	119,2%	7,674	RTEH	135	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKRTEH	281
KV1D819L1_67C09	118,4%	6,383	PTHT	136	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKPTHT	282
KV1D819L1_61A03	115,4%	4,416	RAEK	137	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKRAEK	283
KV1D819L1_67C04	113,4%	5,754	PAPA	138	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKPAPA	284
KV1D819L1_4B09	112,8%		SHRP	139	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKSHRP	285
KV1D819L1_4B09	112,8%		SHRP	140	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKSHRP	286
KV1D819L1_70A08	110,9%	5,821	PPTR	141	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKPPTR	287
KV1D819L1_70B02	110,7%	1,603	HHTT	142	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKHHTT	288
KV1D819L1_70B11	110,6%	4,677	HRPA	143	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKHRPA	289
KV1D819L1_74F06	109,9%	6,457	KAHP	144	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKKAHP	290
KV1D819L1_74D02	108,8%	7,161	QTTQ	145	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKQTTQ	291
KV1D819L1_51C08	108,8%	4,217	PTPT	146	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKPTPT	292
KV1D819L1_70C06	108,0%	4,786	TQAP	147	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKTQAP	293
KV1D819L1_13E06	106,4%	1,660	RKPH	148	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKRPH	294
KV1D819L1_53C07	106,4%	0,473	HTPP	149	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKHTPP	295
KV1D819L1_69B03	105,9%	8,222	TKPP	150	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKTKPP	296
KV1D819L1_71F11	105,4%	1,549	PRPT	151	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKPRPT	297
KV1D819L1_74G05	105,3%	6,607	KQTA	152	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKQTA	298
KV1D819L1_51C06	105,2%	5,012	PHTP	153	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKPHTP	299
KV1D819L1_62A09	105,1%	6,683	HPPP	154	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKHPPP	300
KV1D819L1_94D05	105,0%	0,380	HAKP	155	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKHAKP	301
KV1D819L1_38H08	104,9%		TRRP	156	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKTRRP	302
KV1D819L1_45B11	103,7%	6,237	PTTP	157	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKPTTP	303
KV1D819L1_63C05	103,3%	3,802	RQHA	158	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKRQHA	304
KV1D819L1_61D11	102,6%	1,660	PTRP	159	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKPTRP	305
KV1D819L1_61C05	102,3%	5,309	PAPH	160	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKPAPH	306
KV1D819L1_74B07	102,2%	6,457	ADKP	161	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKADKP	307
KV1D819L1_61B08	102,2%	2,483	PHHQ	162	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKPHHQ	308
KV1D819L1_35E07	102,1%	5,495	GRRT	163	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKGRRT	309
KV1D819L1_62B05	101,8%	5,495	RPDA	164	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKRPDA	310
KV1D819L1_74E02	101,7%	2,065	NHRP	165	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKNHRP	311
KV1D819L1_70B04	101,1%	4,732	NHQG	166	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKNHQG	312
KV1D819L1_51C04	100,9%	6,095	TAPP	167	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKTAPP	313
KV1D819L1_51A08	100,8%	6,457	RHPH	168	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKRHPH	314
KV1D819L1_51B11	100,3%	3,162	PSRP	169	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKPSRP	315
KV1D819L1_68A08	99,5%	4,786	PQHQ	170	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKPQHQ	316
KV1D819L1_70D07	99,1%	2,512	PTQH	171	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKPTQH	317
KV1D819L1_74F07	99,0%	4,624	HTKP	172	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKHTKP	318
KV1D819L1_7F10	98,8%		RKKP	173	GVPINVKCKISRQCIEPCKDAGMRFGKCMNGKCHCTPKRKKP	319

KV1D819L1_15B03	92,8%		NRPP	203	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKNRRP	349
KV1D819L1_61C07	92,5%	3,936	QAAP	204	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKQAAP	350
KV1D819L1_67E03	92,4%	3,199	QPQD	205	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKQPQD	351
KV1D819L1_3B08	81,4%		ATRP	206	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKATRP	352
KV1D819L1_72E02	80,7%	0,092	NRPP	207	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKNRRP	353
KV1D819L1_2A05	64,3%		RRRP	208	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKRRRP	354
KV1D819L1_5D10	57,3%		AHRH	209	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKAHRH	355
KV1D819L1_5H06	53,6%		AQRP	210	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKAQRP	356
KV1D819L1_74G01	53,0%	4,955	TSDT	211	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKTSDT	357
KV1D819L1_116E0	49,3%	2,163	RRPG	212	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKRRPG	358
KV1D819L1_55B03	43,9%	0,036	QSKA	213	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKQSKA	359
KV1D819L1_55E04	43,6%	0,033	AGPR	214	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKAGPR	360
KV1D819L1_55E03	40,1%	0,028	RSRT	215	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKRSRT	361
KV1D819L1_95H07	38,7%	0,019	RHKR	216	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKRHKR	362
KV1D819L1_62F01	35,5%	0,275	NAAK	217	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKNAAK	363
KV1D819L1_7F01	32,8%	10,715	APHT	218	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKAPHT	364
KV1D819L1_94H02	30,8%	0,030	GGKR	219	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKGGKR	365
KV1D819L1_103H0	29,2%	4,624	RREP	220	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKRREP	366
KV1D819L1_119F0	28,2%		HTRT	221	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKHTRT	367
KV1D819L1_2A08	28,1%		NHRT	222	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKNHRT	368
KV1D819L1_3H01	24,2%		PNRT	223	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKPNRT	369
KV1D819L1_113G0	24,1%	0,025	PKTA	224	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKPKTA	370
KV1D819L1_99F08	22,3%		TRRP	225	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKTRRP	371
KV1D819L1_3A01	22,2%		RHNT	226	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKRHNT	372
KV1D819L1_93A04	20,4%	0,036	TDAR	227	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKTDAR	373
KV1D819L1_102D1	19,6%	0,022	HRQQ	228	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKHRQQ	374
KV1D819L1_116E0	19,3%		NQRT	229	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKNQRT	375
KV1D819L1_91E03	19,3%	0,039	RPRH	230	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKRPRH	376
KV1D819L1_61G03	18,6%	0,106	HNET	231	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKHNET	377
KV1D819L1_93A08	18,5%	0,040	ARNA	232	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKARNA	378
KV1D819L1_3E09	18,4%		TTRT	233	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKTTRT	379
KV1D819L1_4E01	18,2%		ARRN	234	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKARRN	380
KV1D819L1_60H04	18,1%	0,022	TGRK	235	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKTGRK	381
KV1D819L1_2E07	17,9%		ASDN	236	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKASDN	382
KV1D819L1_91H11	17,0%	0,009	HERT	237	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKHERT	383
KV1D819L1_99F01	16,5%		TPHR	238	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKTPHR	384
KV1D819L1_95H11	16,0%	0,005	RRTA	239	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKRRTA	385
KV1D819L1_117E0	16,0%	0,038	NTRT	240	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKNTRT	386
KV1D819L1_3A05	15,4%		PTTR	241	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKPTTR	387
KV1D819L1_97G04	15,2%	0,013	QRNG	242	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKQRNG	388
KV1D819L1_115H0	14,1%	0,039	AHRN	243	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKAHRN	389
KV1D819L1_93H05	13,5%	0,041	PRSA	244	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKPRSA	390
KV1D819L1_111G0	13,3%	0,019	QRQS	245	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKQRQS	391
KV1D819L1_112F0	13,3%	0,016	QRRK	246	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKQRRK	392
KV1D819L1_115H0	13,2%	0,012	ARAK	247	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKARAK	393
KV1D819L1_3A03	13,2%		RTRQ	248	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKRTRQ	394
KV1D819L1_96E04	12,6%	0,019	AKRD	249	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKAKRD	395
KV1D819L1_60B02	12,2%	0,248	DDGA	250	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKDDGA	396
KV1D819L1_96G04	12,0%	0,013	RDKT	251	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKRDKT	397
KV1D819L1_87G02	11,4%	0,004	HRRK	252	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKHRRK	398
KV1D819L1_4B01	11,0%		RQTR	253	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKRQTR	399
KV1D819L1_61H04	8,7%	0,141	PNRD	254	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKPNRD	400
KV1D819L1_54D11	8,3%	0,028	HRHK	255	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKHRHK	401
KV1D819L1_12C08	7,9%	0,331	HRNR	256	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKHRNR	402
KV1D819L1_87C11	7,8%	0,022	RAKR	257	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKRAKR	403
KV1D819L1_57F05	7,2%	0,021	QRTR	258	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKQRTR	404
KV1D819L1_54G07	5,5%	0,030	ATRH	259	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKATRH	405
KV1D819L1_13F03	5,5%	0,004	ARRS	260	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKARRS	406
KV1D819L1_71B03	5,2%	0,022	AKTR	261	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKAKTR	407
KV1D819L1_53G01	4,8%	0,065	NARQ	262	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKNARQ	408
KV1D819L1_71G05	4,4%	0,031	NRQR	263	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKNRQR	409
KV1D819L1_6H05	4,2%		PTNA	264	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKPTNA	410
KV1D819L1_45E01	4,1%	0,195	TRTD	265	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKTRTD	411
KV1D819L1_41D01	3,6%	0,750	ADTR	266	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKADTR	412
KV1D819L1_40A01	3,3%	0,120	TSRQ	267	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKTSRQ	413
KV1D819L1_50D06	3,3%	0,015	PRNT	268	GVPIVVKCKISRQCIEPCKDAGMRFKCMNGKCHCTPKPRNT	414

% связывания измеренный как % связывания по сравнению с KV1D261_26

Фиг. 6

Блок	Линкер SEQ ID NO	K _i конкурентного связывания (нМ)	IC ₅₀ потока таплиа KV1.3 (нМ)	IC ₅₀ потока таплиа KV1.1 (нМ)	Кратность селективности*	С-концевое удлинение		Т-клеточное ингибирование	
						Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:	% ингибирования при 1 нМ	IC ₅₀ (нМ)
KV1G28.KV1W699	428	3,60	1,122	63,096	56	PKTA	224	34,5%	НИ
KV1G47.KV1W718	428	2,90	0,891	89,125	100	TDAR	227	21,9%	НИ
KV1G48.KV1W719	428	18,00	0,891	28,184	32	AHRN	243	32,0%	НИ
KV1G11.KV1W682	116	1,94	0,794	158,489	200	HERT	237	17,5%	НИ
KV1G27.KV1W698	428	2,00	0,708	50,119	71	PRNT	268	47,4%	НИ
KV1G42.KV1W713	428	1,30	0,562	63,096	112	RNRE	431	21,3%	НИ
KV1G29.KV1W700	428	1,30	0,562	63,096	112	ARNA	232	35,0%	НИ
KV1G38.KV1W709	428	2,30	0,501	63,096	126	HRPA	143	31,0%	НИ
KV1G26.KV1W697	428	0,79	0,501	31,623	63	RRTA	239	37,9%	НИ
KV1G37.KV1W708	428	1,20	0,447	35,481	79	AGPR	214	36,3%	НИ
KV1G43.KV1W714	428	0,75	0,447	28,184	63	NTRT	240	39,8%	НИ
KV1G40.KV1W711	428	0,90	0,398	44,668	112	RRPG	212	29,2%	НИ
KV1G10.KV1W681	428	0,78	0,398	39,811	100	NRPP	207	30,1%	НИ
KV1G35.KV1W706	428	0,49	0,398	39,811	100	HHRQ	432	31,6%	НИ
KV1G30.KV1W701	428	1,40	0,398	28,184	71	AKTR	261	29,8%	НИ
KV1G31.KV1W702	428	1,10	0,355	25,119	71	RPRH	230	32,9%	НИ
KV1G39.KV1W710	428	0,49	0,355	17,783	50	GGKR	219	49,5%	НИ
KV1G44.KV1W715	428	1,00	0,316	19,953	63	TRAK	433	37,1%	НИ
KV1G36.KV1W707	428	0,32	0,282	17,783	63	NRQR	263	45,1%	НИ
KV1G33.KV1W704	428	0,26	0,282	12,589	45	RHKR	216	15,1%	НИ
KV1G34.KV1W705	428	0,15	0,282	10,000	35	HRRK	252	29,2%	НИ
KV1G12.KV1W683	116	1,93	0,251	50,119	200	NAKP	155	23,6%	НИ
KV1G13.KV1W684	116	0,61	0,251	31,623	126	NARQ	262	30,6%	НИ
KV1G41.KV1W712	428	0,85	0,251	31,623	126	RTRP	188	34,8%	НИ
KV1G18.KV1W689	116	0,85	0,126	39,811	316	PNRT	223	36,5%	НИ
KV1G14.KV1W685	116	0,89	0,126	25,119	200	AQRP	210	38,5%	НИ
KV1G19.KV1W690	116	0,59	0,063	25,119	398	TTRT	233	42,3%	НИ
KV1G20.KV1W691	116	0,71	0,063	19,953	316	ATRP	206	44,4%	НИ
KV1G9.KV1W680	116	0,29	0,032	15,849	501	AHRP	128	50,8%	0,61
KV1G6.KV1W677	116	0,08	0,025	7,943	316	TGRK	235	56,9%	0,21
KV1G16.KV1W687	116	0,20	0,025	7,943	316	ARRN	234	54,8%	0,26
KV1G15.KV1W686	116	0,31	0,016	10,000	631	AHRH	209	57,5%	0,37
KV1G7.KV1W678	116	0,24	0,013	10,000	794	RRRP	208	35,7%	1,43

НИ = не испытывали

SEQ ID NO: 116: AS(AP)₂₀GS

SEQ ID NO: 428: GS(AP)₂₀AS

*соотношение IC_{50(KV1,1)}/IC_{50(KV1,3)}

Фиг. 7А

ID композиции	K _i конкурентного связывания (нМ)	IC ₅₀ Т-клеточного ингибирования (нМ)	С-концевое удлинение		Пептид	
			Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:	Аминокислотная последовательность	SEQ ID NO:
KV1G65.KV1W736	12,3	7,3	AHRH	209	GVPTDVKCRISRQCEKPKDAGMRFKCMNGKCHCTPKAHRH	415
KV1G64.KV1W735	5,95	4,4	TGRK	235	GVPTDVKCRISRQCEKPKDAGMRFKCMNGKCHCTPKTGRK	416
KV1G63.KV1W734	3,74	3,4	ARRN	234	GVPTDVKCRISRQCEKPKDAGMRFKCMNGKCHCTPKARRN	417
KV1G49.KV1W720	28,6	15,8	нет пе		GVPTDVKCRISRQCEKPKDAGMRFKCMNGKCHCTPK	3

Фиг. 7В

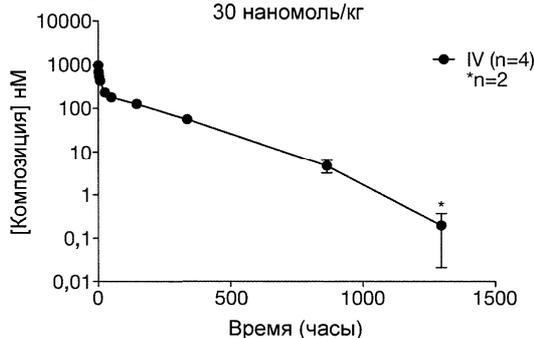
ID белка	Связывается ли последовательность	Линкер SEQ ID NO	Пептидная часть	SEQ ID NO пептида	IC ₅₀ фиксации потенциала (нМ)			IC ₅₀ потока таллия (нМ)			IC ₅₀ Т-дегичного взаимодействия (нМ)	ЕС конкурентного связывания (нМ)	KI конкурентного связывания (нМ)	С-концевое удлинение	
					Kv1.3	Kv1.1	Селективность**	Kv1.3	Kv1.1	Селективность**				Аддитивность	SEQ ID NO:
KV1C2	Fc	119	OdK2	1	13	865	67	21,40	>1000	>46,7	69,9				
KV1N2	Fc	119	OsK1	2	0,3	2	7	0,03	0,10	3,2	2,8				
KV1D261	Fc	119	p261	42	0,15	85	582	0,09	17,80	198,00	1,66	7,47	0,15		
KV1D197	Fc	119	p197	22	0,3	145	483	0,10							
KV1D229	Fc	119	p229	34	0,25	70	280								
KV1D579	Fc	119	p579	3	0,14	>1000	>7143	0,14	>380	>2714	26,83	94,35	1,85		
KV1D261_34	HSA	116	p261	42	1,2	>1000	>1000	0,30	79,00	247,00	2,1	54,04	1,06		
KV1D261_23	HSA	119	p261	42	15			22,10			53,39				
KV1G49.KV1W720	HSA	116	p579	3	3			1,00	252,00	252,00	15,9	342,0	6,71		
KV1D261_26	HSA	120	p261	42				1,00	100,00	100,00	11,7	280,7	5,7		
KV1G6.KV1W677	HSA	116	удлинённый p261					0,025	7,943	316	0,21	4,0	0,08	TGRK	235
KV1G15.KV1W686	HSA	116	удлинённый p261		0,2			0,016	10,000	631	0,37	15,8	0,31	AHRH	209
KV1G16.KV1W687	HSA	116	удлинённый p261					0,025	7,943	316	0,26	10,0	0,20	ARRN	234
KV1G7.KV1W678	HSA	116	удлинённый p261					0,013	10,000	794	1,43	12,4	0,24	RRRP	208
KV1G9.KV1W680	HSA	116	удлинённый p261					0,032	15,849	501	0,61	14,9	0,29	AHRP	128
KV1G19.KV1W690	HSA	116	удлинённый p261					0,063	25,119	398	НИИ	30,3	0,59	TTRT	233
KV1G13.KV1W684	HSA	116	удлинённый p261					0,251	31,623	126	НИИ	31,2	0,61	NARQ	262
KV1G20.KV1W691	HSA	116	удлинённый p261					0,063	19,953	316	НИИ	36,3	0,71	ATRP	206
KV1G10.KV1W681	HSA	116	удлинённый p261					0,398	39,811	100	НИИ	39,7	0,78	NRPP	207
KV1G18.KV1W689	HSA	116	удлинённый p261					0,126	39,811	316	НИИ	43,4	0,85	PNRT	223
KV1G14.KV1W685	HSA	116	удлинённый p261					0,126	25,119	200	НИИ	45,2	0,89	AQRP	210
KV1G12.KV1W683	HSA	116	удлинённый p261					0,251	50,119	200	НИИ	98,6	1,93	HAKP	155
KV1G11.KV1W682	HSA	116	удлинённый p261					0,794	158,489	200	НИИ	98,9	1,94	HERT	237
KV1G26.KV1W697	HSA	116	удлинённый p261					0,501	31,623	63	НИИ	40,3	0,79	RRTA	239
KV1G27.KV1W698	HSA	116	удлинённый p261					0,708	50,119	71	НИИ	102,0	2,00	PRNT	268
KV1G28.KV1W699	HSA	116	удлинённый p261					1,122	63,096	56	НИИ	183,6	3,60	PKTA	224
KV1G29.KV1W700	HSA	116	удлинённый p261					0,562	63,096	112	НИИ	66,3	1,30	ARNA	232
KV1G30.KV1W701	HSA	116	удлинённый p261					0,398	28,184	71	НИИ	71,4	1,40	AKTR	261
KV1G31.KV1W702	HSA	116	удлинённый p261					0,355	25,119	71	НИИ	56,1	1,10	RPRH	230
KV1G33.KV1W704	HSA	116	удлинённый p261					0,282	12,589	45	НИИ	13,3	0,26	RHHR	216
KV1G34.KV1W705	HSA	116	удлинённый p261					0,282	10,000	35	НИИ	7,7	0,15	HRRK	252
KV1G35.KV1W706	HSA	116	удлинённый p261					0,398	39,811	100	НИИ	25,0	0,49	HHRQ	432
KV1G36.KV1W707	HSA	116	удлинённый p261					0,282	17,783	63	НИИ	16,3	0,32	NRQR	263
KV1G37.KV1W708	HSA	116	удлинённый p261					0,447	35,481	79	НИИ	61,2	1,20	AGPR	214
KV1G38.KV1W709	HSA	116	удлинённый p261					0,501	63,096	126	НИИ	117,3	2,30	HRPA	143
KV1G39.KV1W710	HSA	116	удлинённый p261					0,355	17,783	50	НИИ	25,0	0,49	GGKR	219
KV1G40.KV1W711	HSA	116	удлинённый p261					0,398	44,668	112	НИИ	45,9	0,90	RRPG	212
KV1G41.KV1W712	HSA	116	удлинённый p261					0,251	31,623	126	НИИ	43,4	0,85	RTRP	188
KV1G42.KV1W713	HSA	116	удлинённый p261					0,562	63,096	112	НИИ	66,3	1,30	RNRE	431
KV1G43.KV1W714	HSA	116	удлинённый p261					0,447	28,184	63	НИИ	38,3	0,75	NTRT	240
KV1G44.KV1W715	HSA	116	удлинённый p261					0,316	19,953	63	НИИ	51,0	1,00	TRAK	433
KV1G47.KV1W718	HSA	116	удлинённый p261					0,891	89,125	100	НИИ	147,9	2,90	TDAR	227
KV1G48.KV1W719	HSA	116	удлинённый p261					0,891	28,184	32	НИИ	918,0	18,00	AHRN	243
KV1G65.KV1W736	HSA	116	удлинённый p261					9,1	6,6	2,6	7,3	629	12,3	AHRH	209
KV1G64.KV1W735	HSA	116	удлинённый p261					9,2	6,7	2,4	4,4	304	5,95	TGRK	235
KV1G63.KV1W734	HSA	116	удлинённый p261					9,1	7,1	2,0	3,4	191	3,74	ARRN	234
KV1G49.KV1W720	HSA	116	удлинённый p261					1,00	252,00	252,00	15,8	1460	28,6	отсутствует	

НИИ = не испытывали

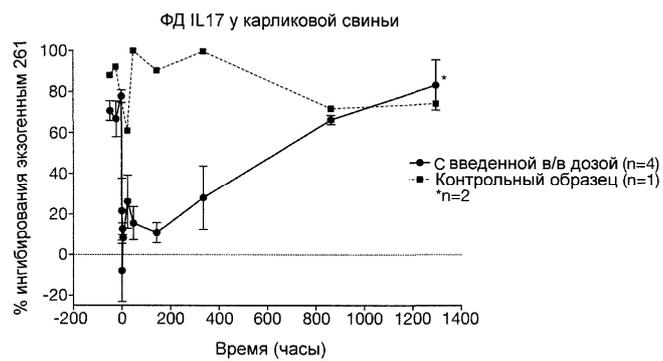
*в клетках CHO

** соотношение: $EC_{50}(Kv1.1)/EC_{50}(Kv1.3)$ SEQ ID NO: 116: AS(AP)₂₀GSSEQ ID NO: 120: GS(G4S)₆SEQ ID NO: 119: GS(G,S)₄

Фиг. 8

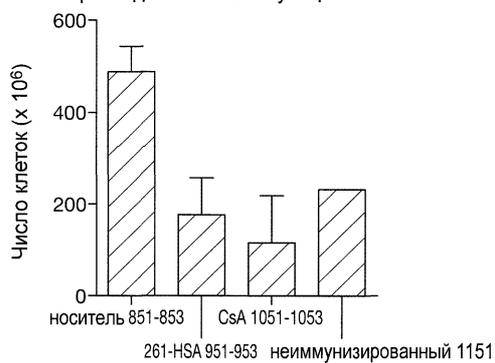
KV1D261_34 в/в болюсное введение карликовым свиньям
30 наномоль/кг

Фиг. 9



Фиг. 10

ГЗТ, индуцированная LKH, у карликовой свиньи.
 Насыщенность клетками дренирующего ЛУ.
 Через 2 дня после стимуляции



Фиг. 11

