

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 677 895**

51 Int. Cl.:

**A61P 37/00** (2006.01)

**A61K 38/12** (2006.01)

**A61K 38/16** (2006.01)

**A61K 38/56** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2012 PCT/EP2012/076739**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013 WO13093045**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2012 E 12815701 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.05.2018 EP 2793923**

54 Título: **Ciclótidos como agentes inmunosupresores**

30 Prioridad:

**22.12.2011 EP 11195413**  
**13.12.2012 EP 12196918**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**07.08.2018**

73 Titular/es:

**MEDIZINISCHE UNIVERSITÄT WIEN (50.0%)**  
**Spitalgasse 23**  
**1090 Wien, AT y**  
**UNIVERSITÄTSKLINIKUM FREIBURG (50.0%)**

72 Inventor/es:

**GRUBER, CHRISTIAN WERNER y**  
**GRUENDEMANN, CARSTEN**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 677 895 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Ciclótidos como agentes inmunosupresores

- 5 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende un ciclótido de tipo kalata B no inyectado para su uso en inmunosupresión. La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende un ciclótido de tipo kalata B no inyectado para su uso en el tratamiento o en la prevención de un trastorno seleccionado del grupo que consiste en (i) un trastorno autoinmune; e (ii) una inflamación mediada por linfocitos. En el presente documento también se desvela un método de exploración y/o selección de un ciclótido
- 10 inmunosupresor o de una mutación que da lugar a un ciclótido mutado que tiene una actividad inmunosupresora inducida o potenciada. En el presente documento, también se desvela un método para producir un ciclótido inmunosupresor o una composición farmacéutica inmunosupresora. En el presente documento, también se desvela un ciclótido mutado que tiene actividad inmunosupresora y una composición farmacéutica que comprende el mismo.
- 15 Se han encontrado péptidos circulares naturales con posibles aplicaciones farmacéuticas en diversos organismos (resumido en Craik, 2006, *Science*, 311, 1563-1564), tales como bacterias (por ejemplo, bacteriocina AS-48 (Martinez-Bueno, 1994, *J Bacteriol*, 176, 6334-6339) y Microcina J25 (Rosengren, 2003, *J Am Chem Soc*, 125, 12464-12474)), plantas (por ejemplo, inhibidores de la tripsina de girasol (Luckett, 1999, *J Mol Biol*, 290, 525-533; Mylne, 2011, *Nat Chem Biol*, 7, 257-259)) y animales (por ejemplo,  $\theta$ -defensinas de mono rhesus (Tang, 1999, *Science*, 286, 498-502)). Uno de los mayores grupos de péptidos circulares naturales, pero en su mayoría inexplorados, son los ciclótidos vegetales (Gruber, 2010, *Curr Pharm Des*, 16, 3071-3088).

En general, los ciclótidos son péptidos ciclados de cabeza a cola que representan un grupo abundante y diverso de péptidos vegetales sintetizados (ribosómicamente), que contienen una estructura anudada de cistina cíclica. Además, los ciclótidos son una peptidoteca combinatoria natural de péptidos circulares de nudos de cistina con gran

25 estabilidad. Los ciclótidos se exploran para determinar su distribución en las plantas, aunque se sabe poco sobre el contenido de péptidos individuales de una sola especie.

La cadena ciclótica circular habitualmente consiste en ~30 aminoácidos, que incluyen seis cisteínas conservadas que forman tres enlaces disulfuro dispuestos en un motivo de nudo de cistina cíclica (CCK) (Craik, 1999, *J Mol Biol*, 294, 1327-1336), mientras que las secuencias entre las cisteínas pueden tolerar una amplia selección de sustituciones de restos y, por lo tanto, el armazón ciclótico puede servir como un molde peptídico combinatorio natural (Clark, 2006, *Biochem J*, 394, 85-93).

30

Las notables características estructurales hacen que los ciclótidos sean sumamente resistentes a la degradación enzimática, química y térmica (Colgrave, 2004, *Biochemistry*, 43, 5965-5975). A diferencia de los metabolitos vegetales sintetizados sin ribosomas, los ciclótidos son verdaderos productos génicos, y su biosíntesis implica la síntesis de precursores ribosómicos, el procesamiento enzimático (Gillon, 2008, *Plant J*, 53, 505-515; Saska, 2007, *J Biol Chem*, 282, 29721-29728) y plegamientos de proteínas (Gruber, 2007, *J Biol Chem*, 282, 20435-20446).

35 Además, los ciclótidos poseen una amplia selección de actividades biológicas, por ejemplo, actividades insecticida (Barbata, 2008, *Proc Natl Acad Sci*, EE.UU., 105, 1221-1225; Gruber, 2007, *Toxicon*, 49, 561-575), nematocida (Colgrave, 2008, *Biochemistry*, 47, 5581-5589; Colgrave, 2009, *Acta Trop*, 109, 163-166), contra la obstrucción (Göransson, 2004, *J Nat Prod*, 67, 1287-1290) y anti-VIH (Wang, 2008, *J Nat Prod*, 71, 47-52; Irlanda, 2008, *Biopolymers*, 90, 51-60), así como citotoxicidad hacia estirpes celulares de linfoma (Svangard, 2004, *J Nat Prod*, 67, 144-147; Lindholm, 2002, *Mol Cancer Ther*, 1, 365-369).

40

45

El descubrimiento del primer ciclótido, kalata B1, se basó en su presencia en el té/extracto de la especie de *Rubiaceae Oldenlandia affinis* (R & S) DC, usado en la medicina indígena africana para acelerar el parto (Gran, 1970, *Medd Nor Farm Selsk*, 12, 173-180; 1973, *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)*, 33, 400-408; Gruber, 2011, *Planta Med*, 77, 207-220). La planta *O. affinis* (*Rubiaceae*) es comúnmente conocida por los científicos en el campo de la etnofarmacología y la química de péptidos como una fuente prototípica de ciclótidos.

50

Desde su descubrimiento en la familia del café (*Rubiaceae*), los ciclótidos se han estudiado ampliamente en las violetas (*Violaceae*), y se han encontrado recientemente en las leguminosas (*Fabaceae*) (Poth, 2011, *Proc Natl Acad Sci*, EE.UU., 108, 10127-10132; Poth, 2011, *ACS Chem Biol*, 6, 345-355; Nguyen, 2011, *J Biol Chem*, 286, 24275-24287). Se está haciendo esfuerzo creciente en la exploración de plantas de diferentes familias en busca de la aparición y distribución de ciclótidos. Hoy en día, es evidente que existen otros muchos ciclótidos. Recientemente, se ha estimado que quedan al menos 50.000 nuevos ciclótidos por descubrir en *Rubiaceae* (Gruber, 2008, *Plant Cell*, 20, 2471-2483) y otros ~9.000 en *Violaceae* (Simonsen, 2005, *Plant Cell*, 17, 3176-3189; Trabi, 2004, *J Nat Prod*, 67, 806-810), pero los investigadores apenas están comenzando a comprender su variedad y distribución en las plantas (Gruber, 2010, *Biopolymers*, 94, 565-572). Biológicamente, los ciclótidos se exploran principalmente para aplicaciones en la agricultura y en el diseño de fármacos debido a su enorme estabilidad (Craik, 2001, *Toxicon*, 39, 1809-1813; Craik, 2007, *Curr Opin Drug Discov Devel*, 10, 176-184; Craik, 2006, *Biopolymers*, 84, 250-266; Craik, 2001, *Toxicon*, 39, 43-60). Recientemente, se ha informado que el ciclótido kalata B1 causa hemólisis y la alteración de la membrana a concentraciones superiores a ~50  $\mu$ M (Barry, 2003, *Biochemistry*, 42, 6688-6695; Henriques,

55

60

65

2011, *J Biol Chem*, 286, 24231-24241).

Con respecto a las aplicaciones terapéuticas de los ciclótidos, la bibliografía científica y de patentes se refiere principalmente al uso de armazones de nudos de cistina para la producción de fármacos a base de péptidos. Por ejemplo, el documento US 7.960.340 B2 se basa en el concepto de que el armazón molecular de los ciclótidos es ultraestable y que es posible modificar bucles del armazón reemplazándolos por secuencias bioactivas farmacéuticamente relevantes, estabilizando así estas secuencias bioactivas. Varios artículos recientes han informado sobre ejemplos de esta estrategia de injerto de ciclótidos. Posteriormente, diversos estudios aplicaron ciclótidos como armazones para péptidos terapéuticamente activos (véase, por ejemplo, Smith, 2011, *Expert Opin. Ther. Patents* 21, 1657-1672; Gunasekera, 2008, *J Med Chem*, 51, 7697-704; Thonbyoo, 2008, *Org Biomol Chem*, 6, 1462-70; y Cemazar (20th American-Peptide-Society Symposium; Montreal, CANADÁ, 26-30 de junio, 2007), *Biopolymers* 88, 4, SI, 2007, 523). Los ejemplos incluyen el desarrollo de un inhibidor de la angiogénesis con aplicaciones en el tratamiento del cáncer mediante el injerto de una secuencia antiangiogénica en el ciclótido kalata B1 (Gunasekera; 2008; *J Med Chem*; 51; 7697-704) y el desarrollo de un inhibidor de una proteasa del virus de la fiebre aftosa en el armazón del ciclótido MCoTI-II (Thonbyoo; 2008; *Org Biomol Chem*; 6; 1462-70). El documento US 2010/0298528 A1 desvela proteínas cíclicas tales como kalata B1 para su uso como armazones moleculares en los que se han injertado secuencias de aminoácidos heterólogas con actividades biológicas. Se propone el uso de dichas proteínas cíclicas injertadas en el tratamiento o la profilaxis de enfermedades o afecciones asociadas. Un ejemplo de dicha proteína cíclica injertada es kalata B1, en la que se ha injertado la secuencia de un inhibidor del receptor alfa C5, y se menciona el posible uso en tratamientos de afecciones inflamatorias asociadas al receptor alfa C5, incluyendo la artritis reumatoide. También se ha demostrado que los ciclótidos tienen la actividad de inhibir la tripsina, la principal proteasa secretora de los mastocitos humanos (documento WO 06032436). Además, se ha demostrado que los ciclótidos presentan actividades citotóxicas, y su toxicidad selectiva hacia las estirpes celulares cancerosas ha abierto la posibilidad de aplicaciones contra el cáncer (Hermann; 2008; *Phytochemistry*; 69; 939-52, Lindholm; 2002; *Mol Cancer Ther*; 1; 365-9, Svargard; 2004; *J Nat Prod*; 67; 144-7; Burman; 2010; *Biopolymers Pept Sci*; 94; 626-34; Gerlach; 2010; *Biopolymers*; 94; 617-25). Sin embargo, se sabe que los efectos citotóxicos causan efectos secundarios.

El sistema inmune del organismo es un arma muy poderosa contra los patógenos, pero el mal funcionamiento puede causar una sobrereactividad de esta maquinaria de defensa y, en algunos casos, conducir a enfermedades autoinmunes, tales como la artritis reumatoide (AR) o la enfermedad de Crohn. La inmunosupresión, la reducción dirigida de la activación o eficacia del sistema inmune, es un posible enfoque para el tratamiento de estas afecciones. Dado que los linfocitos T tienen el impacto más potente durante la respuesta de defensa del sistema inmune, la mayoría de los medicamentos inmunosupresores están dirigidos a actuar sobre estas células. Uno de los fármacos inmunosupresores escogidos para su uso clínico para tratar o suprimir una "sobreactividad" de los linfocitos, por ejemplo, tras una cirugía de trasplante o en casos de AR grave, es el péptido cíclico no ribosómico, fúngico, ciclosporina A (de Mattos, 2000, *Am J Kidney Dis*, 35, 333-346; Matsuda, 2000, *Immunopharmacology*, 47, 119-125; Schreiber, 1991, *Science*, 251, 283-287). Sin embargo, la ciclosporina A tiene muchos efectos secundarios, a veces graves (de Mattos, 2000, *Am J Kidney Dis*, 35, 333-346). Además, los extractos foliares de *Betula pendula* se han usado tradicionalmente para tratar la AR o la artrosis. Además de esto, se debe hacer frente a más problemas cuando se trata de suprimir el sistema inmune. Por ejemplo, la prueba de los efectos antiproliferativos al mantener las células en un estado "inactivo" en el que todavía son viables, pero no son capaces de crecer y proliferar, sin causar muerte celular, es una condición previa crucial para clasificar una sustancia como inmunosupresora, porque la citotoxicidad causaría efectos secundarios. Además, los péptidos terapéuticos suelen carecer de biodisponibilidad oral debido a su rápida degradación tras la ingestión, y tienen una escasa penetración farmacológica debido a su naturaleza hidrófila.

Por lo tanto, el problema técnico que subyace a la presente invención es la provisión de medios y métodos mejorados para suprimir el sistema inmune/para la inmunosupresión y para tratar/prevenir las enfermedades/los trastornos correspondientes.

El problema técnico se resuelve proporcionando las realizaciones caracterizadas en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas.

En el contexto de la presente invención, se realizó la prueba de principio de que se pueden usar ciclótidos y péptidos de nudos de cistina relacionados o mutantes/variantes de ciclótidos para suprimir el sistema inmune/inmunosupresión, como agentes inmunosupresores o para la supresión/reducción de la eficacia del sistema inmune. Esto da la posibilidad de hacer uso de las características superiores y ventajosas (farmacológicas) de los ciclótidos también en el campo de la supresión del sistema inmune/inmunosupresión.

En particular, se encontró que, sorprendentemente, el contexto de la presente invención, existen ciclótidos que son capaces de reducir o detener la proliferación de células inmunes /células del sistema inmune (activadas) (por ejemplo, células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o linfocitos (T)). Además, se demostró que el efecto antiproliferativo inducido por los ciclótidos no causa la muerte celular por apoptosis ni por necrosis, sino que inhibe el crecimiento de las células inmunes de forma citostática. Además, la vacunación con un ciclótido (por ejemplo, kalata B1) dio lugar a una reducción de la incidencia y gravedad de la Encefalomielititis Autoinmune Experimental (EAE) en

un modelo de ratón de EAE para la esclerosis múltiple (EM). Además, se demostró que la vacunación con un ciclótido (por ejemplo kalata B1) conduce a la producción de una respuesta de linfocitos T antiinflamatoria.

5 Por consiguiente, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende (como principio activo) un ciclótido de tipo kalata B no injertado, en particular, un ciclótido de tipo kalata B no injertado y proliferativo de células antiinmunes, siendo dicho ciclótido un péptido ciclado de cabeza a cola cuya cadena ciclotídica incluye seis restos de cisteína conservados capaces de formar tres enlaces disulfuro dispuestos en un motivo de nudo de cistina cíclica (CCK), para su uso en el tratamiento o en la prevención de un trastorno autoinmune o una inflamación mediada por linfocitos mediante inmunosupresión.

10 En el contexto de la presente invención, se caracterizaron por primera vez las propiedades inmunosupresoras de los ciclótidos (vegetales). En combinación con las características estructurales únicas y la enorme estabilidad de los ciclótidos, estos resultados abren nuevos caminos para la aplicación de los ciclótidos nativos y optimizados sintéticamente (plantas) en los trastornos relacionados con el sistema inmune, en particular, en la inmunosupresión.

15 En particular, se demostró, en el contexto de la presente invención, que existen efectos antiproliferativos de un extracto de planta de la familia del café *O. affinis* hacia las células del sistema inmune humano (por ejemplo, linfocitos). Además, Kalata B1 se identificó específicamente como un componente activo responsable de los efectos citostáticos observados. Es más, se demostró que, en un intervalo de concentraciones definido, no se produjo muerte celular por apoptosis ni necrosis. Es más, se demostró que los ratones con EAE tratados con un ciclótido (por ejemplo, kalata B1) mostraron signos clínicos significativamente más leves y una mejoría en la gravedad de la enfermedad (véanse, por ejemplo, las Figuras 10A y B). Además, la vacunación con un ciclótido (por ejemplo kalata B1) conduce a la producción de una respuesta de linfocitos T antiinflamatoria.

25 Los resultados presentados tienen un impacto adicional en el campo general de los péptidos de nudos de cistina, y mejoran en gran medida las posibilidades para sus posibles aplicaciones terapéuticas. La biodisponibilidad oral de ciclótidos y péptidos de nudos de cistina, la disponibilidad de técnicas de producción recombinantes y sintéticas, así como la plasticidad del almacén de nudos de cistina, que es susceptible a una amplia selección de sustituciones de aminoácidos, proporciona una base prometedora para futuros estudios mecanicistas de su actividad sobre las células inmunes (por ejemplo, linfocitos) y aplicaciones *in vivo* (por ejemplo, en sistemas modelo relacionados con el mal funcionamiento de las células inmunes en general y, en particular, la sobrereactividad de los linfocitos).

30 Como se documenta a continuación en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, los efectos antiproliferativos de los ciclótidos, en particular, de los ciclótidos vegetales, en células primarias del sistema inmune humano (PBMC humanas primarias o linfocitos T) se demostraron usando criterios de valoración biológicos e inmunológicos en sistemas de prueba basados en células. Se demostró además que los efectos tienen un intervalo de concentraciones definido y que no se deben a efectos citotóxicos. Más particularmente, la cuantificación por LC-MS del extracto vegetal de *O. affinis* activo desencadenó la caracterización de la actividad antiproliferativa de kalata B1, uno de los ciclótidos más abundantes en este extracto, sobre los linfocitos humanos activados primarios. Para este fin, se analizó un extracto en bruto de ciclótido de *O. affinis* usando un flujo de trabajo peptidómico alternativo y una técnica rápida para la caracterización de ciclótidos en la planta.

35 Se mostró en los ejemplos adjuntos que un ciclótido (por ejemplo, el ciclótido mutante Kalata B1 T20K, un ciclótido que comprende la SEQ ID NO: 7; 4  $\mu$ M) es capaz de reducir el nivel de expresión del receptor de IL-2 y la producción de IL-2. La magnitud del efecto fue similar al tratamiento con ciclosporina A (5  $\mu$ g/ml), y este efecto antiproliferativo del ciclótido se pudo revertir mediante la adición de IL-2 exógena. Además, se demostró que el ciclótido redujo la liberación de moléculas efectoras IFN-gamma y TNF-alfa en PBMC, sin embargo, esta reducción fue solo de naturaleza transitoria. Esto se opone al tratamiento con CsA, que condujo a una reducción sostenida de TNF-alfa e IFN-gamma a lo largo del tiempo. También se mostró *in vivo* una reducción de la liberación de IL-2 tras el tratamiento con ciclótidos (por ejemplo, con el ciclótido mutante Kalata B1 T20K, un ciclótido que comprende la SEQ ID NO: 7; 200  $\mu$ g/100  $\mu$ l/ratón) (por ejemplo, en un modelo de ratón de EAE (C57BU6J)).

40 Sin quedar ligados a teoría alguna, el efecto antiproliferativo mediado por ciclótidos está mediado a través de un mecanismo dependiente de la IL-2. Las funciones efectoras de las PBMC (activadas) (por ejemplo, linfocitos) también se redujeron mediante el tratamiento con ciclótido (por ejemplo, mediante el tratamiento con T20K).

45 Es más, el efecto sobre la síntesis de IL-2 y la expresión del receptor de IL-2 puede estar directamente influido por los ciclótidos o mediado independientemente. Los ciclótidos definidos en el presente documento pueden tener un modo de acción similar al de CsA. Se sabe que CsA influye directamente en la producción de IL-2. Además, CsA puede formar un complejo con la ciclofilina, y el complejo de CsA-ciclofilina puede unirse a la calcineurina e inhibir su función en la señalización de Ca. Esto conduce a una transcripción de NFATc reducida y, por tanto, a la síntesis de IL-2. Por lo tanto, la acción inmunosupresora de CsA requiere que CsA entre en las células y forme un contacto directo con la ciclofilina y calcineurina. Como se muestra en los ejemplos adjuntos, T20K puede entrar en los linfocitos T, es decir, puede atravesar (activa o pasivamente) la membrana (véase la Figura 24). Por consiguiente y sin quedar ligados a teoría alguna, T20K puede interactuar con una diana o un transportador extracelular, o puede entrar en el linfocito T de forma pasiva e interactuar con una diana intracelular. También es posible una combinación de actividad extracelular e intracelular de T20K. Sin quedar ligados a teoría alguna, los ciclótidos definidos en el presente documento, en particular, kalata B1 o T20K, pueden entrar en las células y afectar a la síntesis de IL-2 de

la manera de CsA o pueden permanecer en el exterior de sus células diana y conducir a un cambio en el potencial de membrana mediante la interacción con moléculas superficiales, receptores o canales iónicos. Lo más importante, los ciclótidos definidos en el presente documento, en particular, kalata B1 o T20K, pueden interactuar con un receptor de linfocitos T.

5 Sin quedar ligados a teoría alguna, el mecanismo antiproliferativo puede deberse a la interacción directa de los ciclótidos definidos en el presente documento con el receptor de IL-2 (por ejemplo, T20K puede regular a la baja la expresión del receptor CD25 de cadena alfa de IL-2 en la superficie de las PBMC como se muestra en los ejemplos adjuntos). Por ejemplo, y también sin quedar ligados a teoría alguna, la unión de los ciclótidos inmunosupresores definidos en el presente documento a la cadena alfa de IL-2 puede ocupar el sitio de interacción para la unión de la  
10 cadena beta y gamma y, por tanto, inhibir la formación del complejo. Sin embargo, esta formación del complejo de receptor de IL es importante para la activación del linfocito T para recibir señales de la IL-2 liberada. Solo después de la unión de IL-2 a su receptor, los linfocitos T iniciarán una proliferación normal. Si se inhibe la unión, por ejemplo, mediante el mecanismo descrito anteriormente, los linfocitos T permanecen en un estado no proliferativo. Un fármaco del mercado farmacéutico, es decir, Simulect®, se usa como agente antiproliferativo basado en la  
15 interacción del receptor CD25. El principio activo es un anticuerpo monoclonal quimérico, Basiliximab, que se une a la cadena alfa del receptor de IL-2 y, por tanto, inhibe la unión de la IL-2 endógena.

En el contexto de la presente invención, se caracterizaron los efectos antiproliferativos y citotóxicos de un extracto vegetal que contenía ciclótido de *O. affinis* en bruto hacia los linfocitos humanos primarios activados. Para identificar  
20 los componentes peptídicos moleculares individuales de esta mezcla de ciclótido inmunosupresor, se combinó el análisis biológico *in vitro* con la caracterización química del contenido de péptidos individuales (ciclótidos) en el extracto en bruto de esta planta usando un flujo de trabajo peptidómico rápido optimizado.

En particular, se usó un protocolo optimizado para el análisis de extractos vegetales que contienen ciclótidos combinando LC-MS/MS de nanoflujo y análisis automático de bases de datos para determinar el contenido de los  
25 distintos péptidos (por peso molecular y secuencia peptídica) en la planta que contiene ciclótido *O. affinis*.

La combinación de reconstrucción de nano LC-MS/MS y LC-MS, así como la búsqueda automática en bases de datos (por ejemplo, usando la herramienta ERA (Colgrave, 2010, *Biopolymers*. 94, 592-601)) es una técnica rápida y útil para la identificación de ciclótidos en extractos en bruto.

30 En comparación con un estudio anterior de Plan (2007, *ChemBioChem*, 8, 1001-1011), que describió el primer identificador genético ciclótido de *O. affinis* usando la purificación clásica de péptidos mediante HPLC analítica y secuenciación de MS/MS fuera de línea, se identificaron 8 ciclótidos conocidos adicionales y se demostró su capacidad para proporcionar una lista de ~50 masas peptídicas correspondientes a ciclótidos de las que algunas pueden identificarse mediante identificación genética de péptidos en CyBase (base de datos de ciclótidos (Wang, 2008, *Nucleic Acids Res*, 36, D206-210)). Esto sugiere que el número de ciclótidos que se pueden encontrar en una  
35 sola especie puede ser >70 y es, por lo tanto, al menos el doble del número anticipado previamente de (en promedio) 34 ciclótidos por especie (Gruber, 2008, *Plant Cell*, 20, 2471-2483). Esto, por supuesto, tiene un gran impacto en la determinación del número total de ciclótidos del reino vegetal y, por consiguiente, daría lugar a la necesidad de revisar el número de nuevos ciclótidos que se descubrieron en las plantas.

40 Usando el flujo de trabajo peptidómico mejorado descrito anteriormente, casi todos los ciclótidos actualmente conocidos y un número todavía mayor de nuevas masas peptídicas correspondientes a otros ciclótidos conocidos o nuevos (por peso molecular) se podrían identificar en extracto de ciclótido en bruto de la planta *O. affinis*. Se descubrió que los ciclótidos kalata B1 y kalata B2 eran los principales componentes peptídicos, representando aprox.  
45 el 34 % del contenido total de ciclótidos de *O. affinis*.

Usando análisis de dispersión lateral directa basado en citometría de flujo, se demostró además que el extracto que contiene ciclótidos muestra una reducción dependiente de la dosis (50-100 µg/ml) de PBMC proliferantes activadas en comparación con el control estimulado sin tratar (Figuras 2A y B). Simultáneamente, se observó un contenido  
50 constante de PBMC en reposo, viables, sin acumulación de células muertas, lo que demuestra que las concentraciones aplicadas del extracto de ciclótido no son perjudiciales para las células.

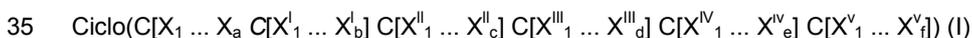
Varias características adicionales con respecto al suministro de fármacos conducen al potencial inmunosupresor descrito anteriormente de los ciclótidos: (i) actividad sostenida tras la administración oral como té/extracto (en seres  
55 humanos) (Gran, 1970, *Medd Nor Farm Selsk*, 12, 173-180), (ii) gran estabilidad en plasma y contra proteasas gastrointestinales (Colgrave, 2004, *Biochemistry*, 43, 5965-5975; Colgrave, 2005, *J Chromatogr A*, 1091, 187-193) e (iii) presencia de parches hidrófobos expuestos en la superficie (Clark, 2006, *Biochem J*, 394, 85-93).

En general, los péptidos terapéuticos suelen carecer de biodisponibilidad oral debido a su rápida degradación tras la ingestión, y tienen una escasa penetración farmacológica debido a su naturaleza hidrófila (Vlieghe, 2010, *Drug  
60 Discov Today*, 15, 40-56; Werle, 2007, *Int J Pharm*, 332, 72-79). Es probable que los ciclótidos y los péptidos de nudo de cistina relacionados resuelvan estos problemas (Kolmar, 2009, *Curr Opin Pharmacol*, 9, 608-614). Como pruebas de hipótesis correspondientes, hay dos ejemplos en la literatura: (i) se ha confirmado recientemente una conotoxina cíclica modificada sintéticamente como un fármaco péptido circular activo oral para el tratamiento del dolor neuropático *in vivo* (Clark, 2010, *Angew Chem Int Ed Engl*, 49, 6545-6548), e (ii) se ha diseñado un ciclótido  
65 sintético que contiene el motivo de secuencia de un antagonista de bradiquinina B1 basándose en el molde de

- péptido kalata B1 nativo y se ha confirmado que es oralmente activo y biodisponible en un modelo murino de dolor inflamatorio (Wong, 2012, *Angew Chem Int Ed Engl*, 51(23), 5620-4). Otra característica de los ciclótidos con respecto a las aplicaciones como fármacos peptídicos es que son productos genéticos sintetizados (Jennings, 2001, *Proc Natl Acad Sci*, EE.UU., 98, 10614-10619) y, por tanto, pueden producirse en gran cantidad mediante técnicas recombinantes (Kimura, 2006, *Angew Chem Int Ed Engl*, 45, 973-976) o en cultivos de suspensión de plantas (Seydel, 2007, *Appl. Microb. Biotechnol.*, 77, 275-284). Estas técnicas de producción de ciclótidos y la disponibilidad de estrategias de síntesis de péptidos en fase sólida (Clark, 2010, *Biopolymers*, 94, 414-422) ofrecen oportunidades para la optimización del armazón ciclótico, que es susceptible de una amplia selección de sustituciones de aminoácidos (véase también la Figura 1).
- Al menos, la prueba de los efectos antiproliferativos al mantener las células en un estado "inactivo" en el que todavía son viables, pero no son capaces de proliferar, sin causar muerte celular, en un cierto intervalo de dosis, es una condición previa crucial para clasificar una sustancia como inmunosupresora, porque la citotoxicidad causaría efectos secundarios.
- Se demostró además en el contexto de la presente invención que, tras el tratamiento (por ejemplo, de un modelo de ratón con EAE (C57BL/6J)) con ciclótidos (por ejemplo, con el ciclótido mutante kalata B1 T20K, un ciclótido que comprende la SEQ ID NO: 7; 200 µg/100 µl/ratón), la puntuación clínica (por ejemplo, la puntuación de EAE) disminuye significativamente (por ejemplo, el peso de los ratones con EAE). Es importante destacar que, el tratamiento con ciclótido no causa un efecto citotóxico, ya que el tratamiento con ciclótido conduce a una reducción del peso corporal.

En general, el significado del término "ciclótido" es conocido en la técnica, y el término "ciclótido" se usa correspondientemente en el presente documento. En particular, los "ciclótidos", como se usan en el presente documento, son péptidos ciclados de cabeza a cola cuya cadena ciclótica incluye seis restos de cisteína conservados capaces de formar tres enlaces disulfuro dispuestos en un motivo de nudo de cistina cíclica (CCK). Las secuencias entre cisteínas de un ciclótido pueden tolerar una amplia selección de sustituciones de restos (véase, por ejemplo, Clark, citado anteriormente y Figura 1). En un aspecto, el término "ciclótido" usado en el presente documento se refiere a ciclótidos como los descritos en Craik (1999, citado anteriormente), Clark (2006, citado anteriormente) y, en particular, en el documento [US 7.592.533 B1](#).

En particular, un ciclótido para su uso en el contexto de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos capaz de formar una estructura principal cíclica, en el que dicha estructura principal cíclica comprende la estructura de fórmula I:

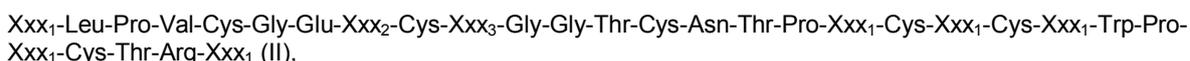


en la que

- (i) C es cisteína;
- (ii) cada  $[X_1 \dots X_a]$ ,  $[X^I_1 \dots X^I_b]$ ,  $[X^{II}_1 \dots X^{II}_c]$ ,  $[X^{III}_1 \dots X^{III}_d]$ ,  $[X^{IV}_1 \dots X^{IV}_e]$ , y  $[X^V_1 \dots X^V_f]$  representa uno o más restos de aminoácido, en la que cada uno o más restos de aminoácido de dentro o de entre los restos de la secuencia pueden ser iguales o diferentes; y
- (iii) a, b, c, d, e y f representan el número de restos de aminoácido de cada secuencia respectiva y cada uno de a a f puede ser igual o diferente, y varía de 1 a aproximadamente 20.

Preferentemente, a es de 3 a 6, b es de 4 a 8, c es de 3 a 10, d es 1, e es de 4 a 8, y/o f es de 5 a 13.

Preferentemente, el ciclótido que se va a usar en la presente invención comprende el tramo de aminoácidos de fórmula II (SEQ ID NO. 17)



en la que  $\text{Xxx}_1$ ,  $\text{Xxx}_2$  y  $\text{Xxx}_3$  es cualquier aminoácido, aminoácido no natural o peptidomimético, preferentemente, un aminoácido alifático. En particular,  $\text{Xxx}_2$  puede ser cualquier aminoácido, aminoácido no natural o peptidomimético, a excepción de Lys ni/o  $\text{Xxx}_3$  puede ser cualquier aminoácido, aminoácido no natural o peptidomimético, a excepción de Ala o Lys. Preferentemente,  $\text{Xxx}_2$  y/o  $\text{Xxx}_3$  de fórmula II no están mutados en absoluto. Más concretamente,  $\text{Xxx}_1$  puede ser Gly, Thr, Ser, Val, Ile, Asn, Asp o preferentemente, Lys,  $\text{Xxx}_2$  puede ser Thr, y/o  $\text{Xxx}_3$  puede ser Val o Phe. Aún más concretamente,  $\text{Xxx}_1$  de la posición 1 de la fórmula II puede ser Gly,  $\text{Xxx}_1$  de la posición 18 de la fórmula II puede ser Lys o, preferentemente, Gly,  $\text{Xxx}_1$  de la posición 20 de la fórmula II puede ser Thr, Ser o preferentemente, Lys,  $\text{Xxx}_1$  de la posición 22 de la fórmula II puede ser Ser o Thr,  $\text{Xxx}_1$  de la posición 25 de la fórmula II puede ser Val o Ile,  $\text{Xxx}_1$  de la posición 29 de la fórmula II puede ser Asn, Asp o preferentemente, Lys,  $\text{Xxx}_2$  de la fórmula II puede ser Thr y/o  $\text{Xxx}_3$  de la fórmula II puede ser Val o Phe.

Los restos de aminoácidos específicamente definidos de fórmula II también pueden variar dependiendo del (tipo de)

ciclótido en particular. De este modo, lo que se ha dicho con respecto a  $X_{xx_1}$ ,  $X_{xx_2}$  y/o  $X_{xx_3}$ , no solo se aplica a la fórmula II, sino también a los restos de aminoácidos correspondientes de otros ciclótidos que no comprenden el tramo de aminoácidos particular de fórmula II. En este contexto, "correspondiente/s" significa en particular restos de aminoácidos de la/s misma/s posición/es o similar/es.

5 Los ejemplos específicos no limitantes de un ciclótido que se va a usar de acuerdo con la presente invención es un ciclótido que comprende:

- 10 (i) una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, 5, 1, 4, 6, 2 y 3;  
 (ii) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, 5, 1, 4, 6, 2 y 3; o  
 (iii) una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 %, preferentemente, al menos un 95 %, más preferentemente al menos un 98 % e incluso más preferentemente al menos un 99 % idéntica a cualquier secuencia de aminoácidos de (i) a (ii).

15 Además, los ejemplos no limitantes de ciclótidos que se van a usar son ciclótidos que consisten en una forma ciclada de cabeza a cola de una secuencia de aminoácidos como se define en cualquiera de (i) a (iii), *supra*.

20 En una realización preferida, el ciclótido que se va a usar es kalata B o un ciclótido de tipo kalata B. En aún otra realización preferida más, el ciclótido es kalata B2 o, lo más preferentemente, kalata B1. Los ciclótidos kalata B1 y B2 solo difieren en cinco posiciones de aminoácidos (véase la Figura 6), concretamente en Val a Phe (bucle 2) y sustituciones conservativas de Thr a Ser (bucle 4), Ser a Thr (bucle 5), Val a Ile (en el bucle 5) y Asn a Asp (en el bucle 6) en kalata B2. Estas sustituciones no tienen consecuencias estructurales significativas ( $RMSD_{\text{estructura principal } k_{B1}/k_{B2}} = 0,599 \text{ \AA}$ , véase la Figura 6) y los dos péptidos tienen un perfil de bioactividad similar (Gruber, 2007, *Toxicon*, 49, 561-575).

30 Se entenderá que para los diversos ciclótidos que se usarán en el contexto de la presente invención, es posible una cierta flexibilidad y variabilidad en la secuencia primaria, es decir, la cadena principal de la secuencia de aminoácidos, siempre que se garantice la estructura secundaria y terciaria global de los respectivos péptidos, que se define por al menos algunos restos de aminoácidos fijos y por su disposición espacial, (véanse, por ejemplo, las fórmulas I y II, *supra*).

35 Basándose en las enseñanzas proporcionadas en el presente documento, el experto está, por un lado, fácilmente en la posición de descubrir/identificar mutantes/variantes correspondientes de los ciclótidos que actúan de acuerdo con la invención. Por otro lado, el experto puede analizar si un mutante/variante de ciclótido dado todavía tiene la función deseada, por ejemplo, al menos una de las funciones descritas en otra parte del presente documento. La guía experimental correspondiente para dichas pruebas, es decir, los respectivos ensayos, se proporciona y se describe de forma ilustrativa en el presente documento, en particular, en los ejemplos adjuntos.

40 De este modo, en un aspecto, en el contexto de la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la presente invención también se pueden usar formas mutantes o variantes de los ciclótidos de tipo kalata B (nativos) no injertados definidos en el presente documento, en particular, formas mutantes o variantes de los ciclótidos de tipo kalata B no injertados como los representados en la Tabla 1, más concretamente, formas mutantes o variantes de kalata B2 o, preferentemente, kalata B1. Las formas mutantes o variantes pueden optimizarse (sintéticamente), es decir, pueden ser más adecuadas para la inmunosupresión en comparación con su forma no mutante/no variante.

45 Los ejemplos no limitantes de formas mutantes/variantes de ciclótidos son los ciclótidos representados en la Tabla 1, en los que se han realizado las mismas mutaciones que en una cualquiera de SEQ ID NO: 3 a 7, o mutaciones correspondientes en posiciones de aminoácidos que corresponden a las posiciones de aminoácidos que se han mutado en una cualquiera de SEQ ID NO: 3 a 7.

50 Si no se menciona de otro modo, se considera que el término "ciclótido/s" cuando se usa en el presente documento también abarca "mutante/s/variante/s de ciclótido". En el apartado (iii), se dan ejemplos no limitantes de mutantes/variantes/ciclótidos modificados de acuerdo con la presente invención, *supra*, o son ciclótidos que consisten en una forma ciclada de cabeza a cola de una secuencia de aminoácidos como se define en el apartado (iii), *supra*. Otros ejemplos de mutantes/variantes de ciclótidos son ciclótidos que comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3 a 7, o ciclótidos que consisten en una forma ciclada cabeza a cola de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3 a 7.

60 En cuanto a los mutantes/las variantes de los ciclótidos, por ejemplo, se prevé que uno o más aminoácidos de dichos péptidos se reemplacen por uno o más aminoácidos naturales o sintéticos. En este contexto, se prefiere que este/estos intercambio/s de aminoácidos sea/n uno o varios intercambios de aminoácidos conservativos, es decir, que el aminoácido de reemplazo pertenezca a la misma categoría de aminoácidos que el aminoácido que se va a reemplazar. Por ejemplo, un aminoácido ácido puede ser reemplazado por otro aminoácido ácido, un aminoácido básico puede ser reemplazado por otro aminoácido básico, un aminoácido alifático puede ser reemplazado por otro aminoácido alifático y/o un aminoácido polar puede ser reemplazado por otro aminoácido polar.

65

En particular, se contempla que los intercambios de aminoácidos que conducen a mutantes/variantes de los ciclótidos desvelados sean tales que el patrón de polaridad y carga de dentro de la estructura terciaria del mutante/de la variante resultante siga imitando/corresponde (sustancialmente) a la estructura tridimensional del respectivo ciclótido.

5 Otros ejemplos de mutantes o variantes de ciclótidos son kalata B1 o kalata B2 (o los mutantes/las variantes de los mismos desvelados) o un ciclótido que consiste en una forma ciclada de cabeza a cola de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2 que tiene

- 10 (i) al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de sus restos de aminoácidos ácidos reemplazados por uno o varios restos de aminoácidos diferentes seleccionados del grupo que consiste en restos de aminoácidos ácidos;  
 (ii) al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de sus restos de aminoácidos básicos reemplazados por uno o varios restos de aminoácidos diferentes seleccionados del grupo que consiste en restos de aminoácidos básicos; y/o  
 15 (iii) al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de sus restos de aminoácidos alifáticos reemplazados por uno o varios restos de aminoácidos diferentes seleccionados del grupo que consiste en restos de aminoácidos alifáticos.

Otros mutantes/variantes de ciclótidos comprenden el tramo de aminoácidos de fórmula II, pero que tienen

- 20 (i) al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de los restos de aminoácidos ácidos (específicos restantes) reemplazados por uno o varios restos de aminoácidos diferentes seleccionados del grupo que consiste en restos de aminoácidos ácidos;  
 (ii) al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de los restos de aminoácidos básicos (específicos restantes) reemplazados por uno o varios restos de aminoácidos diferentes seleccionados del grupo que consiste en restos de aminoácidos básicos; y/o  
 25 (i) al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de los restos de aminoácidos alifáticos (específicos restantes) reemplazados por uno o varios restos de aminoácidos diferentes seleccionados del grupo que consiste en restos de aminoácidos alifáticos.

30 En general, el significado del término "aminoácido" o de la expresión "resto de aminoácido" es conocido en la técnica, y se usa en el presente documento correspondientemente. De este modo, cabe señalar que cuando un "aminoácido" es un componente de un péptido/una proteína, el término "aminoácido" se usa en el presente documento en el mismo sentido que "resto de aminoácido".

En particular, se considera que un "aminoácido" o "resto de aminoácido", como se menciona en el presente documento, es un aminoácido de origen natural, más preferentemente, un L-aminoácido de origen natural. Sin embargo, aunque menos preferido, un "aminoácido" o "resto de aminoácido", en el contexto de la presente invención, también puede ser un D-aminoácido o un aminoácido no natural (es decir, un aminoácido sintético), como, por ejemplo, norleucina,  $\beta$ -alanina o selenocisteína.

40 También se conoce en la técnica el significado de las expresiones "aminoácido/s ácido/s", "aminoácido/s básico/s", "aminoácido/s alifático/s" y "aminoácido/s polar/es" (véase, por ejemplo, Stryer, *Biochemie, Spectrum Akad. Verlag*, 1991, Artículo I. 2). Estos términos se usan de forma correspondiente a lo largo de la presente invención. De este modo, también se aplican las condiciones particulares dadas en el presente documento con respecto a los ciclótidos de la invención.

45 En particular, la expresión "aminoácido/s ácido/s", como se usa en el presente documento, pretende significar un aminoácido seleccionado del grupo que comprende Asp, Asn, Glu y Gln, la expresión "aminoácido/s básico/s", como se usa en el presente documento, pretende significar un aminoácido seleccionado del grupo que comprende Arg, Lys y His, la expresión "aminoácido/s alifático/s", como se usa en el presente documento, pretende significar cualquier aminoácido seleccionado del grupo que comprende Gly, Ala, Ser, Thr, Val, Leu, Ile, Asp, Asn, Glu, Gln, Arg, Lys, Cys y Met, y la expresión "aminoácido/s polar/es", como se usa en el presente documento, pretende significar cualquier aminoácido seleccionado del grupo que comprende Cys, Met, Ser, Tyr, Gln, Asn y Trp.

50 En una realización preferida, los ciclótidos y mutantes/variantes de ciclótidos que se van a usar de acuerdo con la presente invención son ciclótidos que tienen al menos uno de sus restos de aminoácidos correspondientes a  $Xxx_1$  de fórmula II, preferentemente correspondiente a  $Xxx_1$  de la posición 20 y/o 29 de la fórmula II, reemplazado por uno o  
 55 varios restos de aminoácidos diferentes. Asimismo, los ciclótidos y los mutantes/variantes de ciclótidos que se van a usar de acuerdo con la presente invención también pueden ser ciclótidos que tienen al menos uno de sus restos de aminoácidos correspondientes a las posiciones de aminoácidos 1, 18, 20, 22, 25 y/o 29, preferentemente, correspondientes a la posición de aminoácido 20 y/o 29, reemplazado por uno o varios restos de aminoácidos diferentes. En este contexto, "correspondiente/s a" significa en particular el/los mismo/s resto/s de aminoácidos y/o  
 60 de la/s misma/s posición/es o posición/es similar/es. Dichos uno o varios restos de aminoácidos diferentes pueden, por ejemplo, tener utilidad en el marcaje de los respectivos mutantes/variantes de ciclótidos. Un ejemplo no limitante de dichos uno o varios restos de aminoácidos diferentes es Lys. Los ejemplos no limitantes de los mutantes/variantes de ciclótidos respectivos son mutantes/variantes de ciclótidos que comprenden o consisten en (una forma ciclada de cabeza a cola de) una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 a 7, en los que se  
 65 prefieren SEQ ID NO: 5 o 7.

- En un aspecto específico, los mutantes/las variantes de ciclótidos que se van a usar de acuerdo con la invención son ciclótidos que no tienen reemplazado uno o más de sus restos de aminoácidos encontrados entre la "primera" y la "segunda" Cys (correspondiente a la "primera» y "segunda» Cys, respectivamente, como se representa en la fórmula I, *supra*) y/o entre la "segunda" y la "tercera» Cys, respectivamente, como se muestra en fórmula I, *supra*). Preferentemente, en dichos mutantes/variantes de ciclótidos, ninguno de los restos de aminoácidos que flanquean la "segunda" Cys, en particular, el resto de aminoácido junto a la "segunda" Cys en la dirección N-terminal de fórmula I ni el resto de aminoácido junto a la "segunda" Cys en la dirección C-terminal de fórmula I, está reemplazado por otro resto de aminoácido, en particular, no por un resto de Lys o Ala.
- Se prefiere que los ciclótidos y los mutantes/variantes de los mismos carezcan de sitios susceptibles a la hidrólisis o escisión por proteasas, como, por ejemplo, proteasas séricas. Los significados de los términos "hidrólisis" y "proteasas (séricas)" y la estructura de los sitios son bien conocidos en la técnica.
- En un aspecto preferido, en los mutantes/las variantes de ciclótidos que se usarán de acuerdo con la presente invención, en particular, en los mutantes/las variantes de ciclótidos definidos más específicamente en otra parte del presente documento (por ejemplo, los mutantes/las variantes de ciclótidos definidos en los artículos (iii) e (i) a (iii), *supra*, o los artículos (i) a (xii), *infra*), ninguno de los (seis) restos de Cys está reemplazado por otro resto de aminoácido.
- Sin embargo, con respecto a los mutantes/las variantes de los ciclótidos, uno o más de los (seis) restos de Cys, en particular, la Cys definida en el presente documento, también pueden estar reemplazados por otro/s aminoácido/s, siempre que el reemplazo siga conduciendo a un enlace intramolecular individual, como el de un enlace disulfuro, dentro del ciclopeptido, es decir, a un mimetismo correcto del ciclótido nativo. Dicho aminoácido puede ser, entre otros, un aminoácido no natural, como un aminoácido no natural que tiene un grupo -SH capaz de formar un enlace disulfuro. Sin embargo, en el presente documento, se prefiere que la Cys, en particular, la Cys dada en la fórmula I, anteriormente, sea un aminoácido de origen natural, preferentemente, la propia Cys.
- Los expertos en la materia también reconocerán que uno o varios de los aminoácidos que forman el ciclótido que se va a emplear de acuerdo con la presente invención se pueden modificar. Por consiguiente, cualquier aminoácido usado/definido en el presente documento también puede representar su forma modificada. Por ejemplo, un resto de alanina, como se usa en el presente documento, puede comprender un resto de alanina modificado. Dichas modificaciones pueden ser, entre otras, una metilación o acilación, o similares, por lo que dicha modificación o aminoácido modificado es preferible siempre que el aminoácido así modificado, y más concretamente, el ciclótido que contenga dicho aminoácido así modificado siga funcionalmente activo según lo definido en el presente documento. Los respectivos ensayos para determinar si dicho ciclótido, es decir, un ciclótido que comprende uno o varios aminoácidos modificados, cumple este requisito, son bien conocidos por un experto en la materia, entre otros, según lo descrito en el presente documento, particularmente, en la parte de ejemplos.
- En el contexto de la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la presente invención, también se pueden usar derivados de los ciclótidos de tipo kalata B no injertados desvelados tales como sales con ácidos orgánicos e inorgánicos fisiológicos como HCl, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, ácido málico, ácido fumárico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido acético.
- En particular, se contempla que los ciclótidos definidos en el presente documento, y los mutantes y las variantes de ciclótidos definidos en el presente documento (véase, por ejemplo, el artículo (iii), *supra*) tienen al menos una de las funciones deseadas de acuerdo con la presente invención, en particular, una de las funciones mencionadas en los artículos (i) a (xii) que se presentan a continuación. Esta/s función/es hacen que los ciclótidos y los mutantes/las variantes de ciclótidos sean ciclótidos inmunosupresores y mutantes/variantes de ciclótidos inmunosupresores de acuerdo con la presente invención.
- En un aspecto, los ciclótidos y los mutantes/las variantes de ciclótidos que se van a usar de acuerdo con la presente invención y como se define en el presente documento
- (i) son ciclótidos antiproliferativos, es decir, tienen un efecto antiproliferativo (dependiente de la dosis) sobre una o varias células inmunes, y/o suprimen/reducen la/s función/es efectora/s de una o varias células inmunes;
  - (ii) son capaces de inhibir, disminuir o bloquear la proliferación de células inmunes (sin la acumulación de células muertas);
  - (iii) previenen (el inicio de) la activación y/o la proliferación de células inmunes;
  - (iv) conducen a una inhibición, reducción o bloqueo de células inmunes proliferantes (sin acumulación de células muertas);
  - (v) son capaces de desencadenar el reposo de las células inmunes (viables) (sin acumulación de células muertas);
  - (vi) tienen un efecto citostático sobre las células inmunes proliferantes, preferentemente, que carece de un efecto citotóxico;

- (vii) reducen o suprimen una sobreactividad de las células inmunes;
- (viii) son capaces de suprimir/reducir la secreción/producción de citocinas, en particular, de IL-2, IFN-gamma y/o TNF-alfa;
- 5 (ix) son capaces de suprimir/reducir la desgranulación/citotoxicidad de las PBMC, en particular, de las PBMC CD107a<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>;
- (x) son capaces de suprimir/reducir la expresión del receptor superficial de IL-2 CD25 (en las PBMC);
- (xi) son capaces de actuar de manera similar a la ciclosporina A, Muromonab-CD3 y/o Basiliximab; y/o
- 10 (xii) no inducen un cambio en la señalización de Ca<sup>2+</sup> y/o no inducen/aumentan la liberación de Ca<sup>2+</sup> a partir de células (animales).

Se prefiere que las funciones de los ciclótidos definidos en el presente documento se cumplan en el contexto de un esquema de administración citostática. En el contexto de este esquema de administración, los ciclótidos, en particular, kalata B1 o T20K, son capaces de funcionar sin la acumulación de células muertas, es decir, sin un efecto citotóxico. Esto se aplica particularmente a las funciones ciclótídicas definidas en los apartados (ii), (iv) y (v), *supra*.

5 El experto está fácilmente en posición de probar si un ciclótido o mutante/variante de ciclótido dado puede funcionar de acuerdo con la presente invención, por ejemplo, tiene una o más de las funciones definidas en los apartados (i) a (xii), *supra*. Para este fin, el experto puede, por ejemplo, confiar en los ensayos descritos en los ejemplos adjuntos (por ejemplo, ejemplos 3 y 5, más adelante) y en los ensayos respectivos para determinar los efectos antiproliferativos según lo descrito en la técnica (Gründemann, *Journal of Ethnopharmacology* 136, 3, SI, 2011, 444-451).

15 Al confiar en los medios y métodos descritos en el presente documento y en su conocimiento general común, el experto también se encuentra en posición de identificar y aislar ciclótidos o mutantes/variantes de ciclótidos adecuados, por ejemplo, en/de un extracto (vegetal). De este modo, el experto puede además identificar y aislar ciclótidos/mutantes/variantes de ciclótidos que todavía sean desconocidos que se puedan usar de acuerdo con la presente invención. El uso de dichos ciclótidos recientemente identificados/aislados de acuerdo con la presente invención también se contempla en el presente documento.

20 El ciclótido que se va a usar de acuerdo con la presente invención es un ciclótido no injertado (nativo o natural), es decir, un ciclótido "*per se*" sin ningún otro compartimento (farmacéuticamente) activo. Se sabe en la técnica que los ciclótidos pueden actuar como armazones para otros compartimentos (farmacéuticamente) activos, como otros péptidos terapéuticos (véase, por ejemplo, Gunasehara, citado anteriormente). Dichos ciclótidos injertados, es decir, ciclótidos que comprenden un compartimento adicional (farmacéuticamente) activo, no se deben usar en el contexto de la presente invención. En particular, se sabe que los ciclótidos injertados son ciclótidos que tienen al menos un bucle completo entre dos restos de cisteína que está reemplazado por un compartimento adicional (farmacéuticamente) activo. Esto se debe ver en contraste con los ciclótidos y los mutantes/las variantes de ciclótidos que se van a usar en el contexto de la presente invención. Específicamente, estos mutantes/variantes de ciclótidos están mutados de modo que no se introduce ningún compartimento adicional (farmacéuticamente) activo.

30 En principio, también es posible con respecto a estos mutantes/variantes peptídicos que uno o más bucles enteros entre dos restos de cisteína estén reemplazados por (un tramo de) más restos de aminoácidos, siempre que no se introduzca un compartimento (farmacéuticamente) activo adicional. El experto se encuentra fácilmente en posición de distinguir entre un ciclótido injertado y un ciclótido no injertado o un mutante/variante de ciclótido injertado y no injertado.

35 Se prefiere que las células inmunes a las que se hace referencia en los artículos (i) a (xii), *supra*, pero también las células inmunes a las que se hace referencia en otra parte del presente documento, sean células inmunes primarias. Además, se prefiere que las células inmunes a las que se hace referencia en los artículos (i) a (xii), *supra*, pero también las células inmunes a las que se hace referencia en otra parte del presente documento, sean células inmunes activadas y/o proliferantes. También se prefiere que las células inmunes (primarias) (activadas y/o proliferantes) sean de origen humano, es decir, sean células inmunes humanas (primarias) (activadas y/o proliferantes). Los ejemplos particulares de células inmunes a las que se hace referencia en el presente documento son PBMC (primarias, activadas y/o proliferantes) y linfocitos, preferentemente, linfocitos T. De nuevo, se prefiere que estas PBMC y linfocitos T sean de origen humano, es decir, PBMC humanas y linfocitos T humanos. En un aspecto particular, las PBMC son PBMC CD107a<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>.

50 En un aspecto adicional, en el presente documento, se desvela el uso de una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica la estructura principal de aminoácidos/secuencia de aminoácidos primaria de un ciclótido como el desvelado en el contexto de la presente invención. Por ejemplo, dicha molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos como la representada en una cualquiera de SEQ ID NO: 11, 12, 15 y 16 o una secuencia de nucleótidos como la comprendida en una cualquiera de SEQ ID NO: 11, 12, 15 y 16, y que corresponde al ciclótido maduro o a una secuencia de nucleótidos que difiere de la misma debido a la degeneración del código genético.

55 Los significados de las expresiones "molécula/s de ácido nucleico", "secuencia/s de ácido nucleico" y "secuencia/s de nucleótidos" y similares son bien conocidos en la técnica y se usan, por consiguiente, en el contexto de la presente invención.

60 Por ejemplo, cuando se usan a lo largo de la presente invención, estas expresiones se refieren a todas las formas de secuencias de nucleótidos y/o secuencias/moléculas de ácido nucleico naturales o generadas de forma recombinante, así como a secuencias de nucleótidos y/o secuencias/moléculas de ácidos nucleicos sintetizadas químicamente. Estas expresiones también abarcan análogos de ácidos nucleicos y derivados de ácidos nucleicos tales como, por ejemplo, ADN bloqueado, PNA, oligonucleótido tiofosfatos y ribooligonucleótidos sustituidos. Además, estas expresiones también se refieren a cualquier molécula que comprenda nucleótidos o análogos nucleotídicos.

65 Preferentemente, las expresiones "molécula/s de ácido nucleico", "secuencia/s de ácido nucleico" y "secuencia/s de

nucleótidos" y similares se refieren a ácido desoxirribonucleico (ADN) o ácido ribonucleico (ARN). La/s "molécula/s de ácido nucleico", "secuencia/s de ácido nucleico" y "secuencia/s de nucleótidos" pueden prepararse mediante metodología química sintética conocida por los expertos habituales en la materia, o mediante el uso de tecnología recombinante, o pueden aislarse a partir de fuentes naturales, o mediante una combinación de los mismos. El ADN y

5 ARN pueden comprender opcionalmente nucleótidos no naturales, y pueden ser monocatenarios o bicatenarios. La/s "molécula/s de ácido nucleico", "secuencia/s de ácido nucleico" y "secuencia/s de nucleótidos" también se refieren a ADN y ARN sentido o antisentido, es decir, una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia específica de nucleótidos en ADN y/o ARN.

10 Además, las expresiones "molécula/s de ácido nucleico", "secuencia/s de ácido nucleico" y "secuencia/s de nucleótidos" y similares pueden referirse a ADN o ARN o híbridos de los mismos, o a cualquier modificación de los mismos que se conozca en el estado de la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos US 5525711, US 4711955, US 5792608 o EP 302175 para ejemplos de modificaciones). Estas moléculas de la invención pueden ser monocatenarias o bicatenarias, lineales o circulares, naturales o sintéticas, y sin limitación de tamaño. Por ejemplo,

15 la/s "molécula/s de ácido nucleico", "secuencia/s de ácido nucleico" y/o "secuencia/s de nucleótidos" pueden ser ADN genómico, ADNc, ARNm, ARN antisentido, ribozima o un ADN codificante de dichos ARN o quimeroplastos (Cole-Strauss, *Science* 1996 273 (5280) 1386-9). Pueden estar en forma de un plásmido, o de ADN o ARN vírico. La/s "molécula/s de ácido nucleico", "secuencia/s de ácido nucleico" y "secuencia/s de nucleótidos" y similares también pueden referirse a (un) oligonucleótido/s, en el/los que se incluyen cualquiera de las modificaciones del estado de la técnica tales como fosfotioatos o ácidos nucleicos peptídicos (PNA).

20 Las moléculas de ácido nucleico como se describen en el presente documento son particularmente útiles para producir un péptido cíclico de la invención, por ejemplo, mediante un método correspondiente desvelado en el presente documento.

25 La molécula de ácido nucleico como se desvela en el presente documento y se describe en el presente documento puede estar comprendida en un vector.

Dicho vector puede ser un vector de clonación o un vector de expresión, por ejemplo, un fago, plásmido, vector vírico o retrovírico. Los vectores retrovíricos pueden ser competentes en la replicación o ser defectuosos en la replicación. En este último caso, la propagación vírica, en general, solo ocurrirá en el complemento de hospedador/células. La

30 molécula de ácido nucleico desvelada en el presente documento puede unirse a un determinado vector que contenga marcadores seleccionables para la propagación en un hospedador. En general, se introduce un vector plasmídico en un precipitado, tal como un precipitado de fosfato de calcio o precipitado de cloruro de rubidio, o en un complejo con un lípido cargado o en grupos a base de carbono, tales como fullerenos. Si el vector fuera un virus, se puede empaquetar *in vitro* usando una estirpe celular de empaquetamiento apropiada antes de la aplicación a las

35 células hospedadoras.

Preferentemente, la molécula de ácido nucleico desvelada se une operativamente a secuencias de control de la expresión (por ejemplo, dentro del vector desvelado en el presente documento), lo que permite la expresión en células procariontas o eucariotas o fracciones aisladas de las mismas. La expresión de dicho polinucleótido comprende la transcripción de la molécula de ácido nucleico, preferentemente, en un ARNm traducible. Los expertos en la materia conocen bien los elementos reguladores que garantizan la expresión en células eucariotas, preferentemente, las células de mamífero. Por lo general, comprenden secuencias reguladoras que garantizan el inicio de la transcripción y, opcionalmente, señales de poli-A que garantizan la terminación de la transcripción y la estabilización del producto de la transcripción. Otros elementos reguladores adicionales pueden incluir potenciadores

45 de la transcripción, así como de la traducción. Los posibles elementos reguladores que permiten la expresión en células hospedadoras procariontas comprenden, por ejemplo, el promotor *lac*, *trp* o *tac* en *E. coli*, y son ejemplos de elementos reguladores que permiten la expresión en células hospedadoras eucariotas el promotor *AOX1* o *GAL1* en levadura o el promotor de CMV, SV40, RSV (virus del sarcoma de Rous), potenciador de CMV, potenciador de SV40 o un intrón de globina en células de mamífero y otras células animales. Además de los elementos que son responsables del inicio de la transcripción, dichos elementos reguladores también pueden comprender señales de terminación de la transcripción, tales como el sitio poli-A de SV40 o el sitio poli-A de tk, cadena abajo del polinucleótido. En este contexto, los vectores de expresión adecuados son conocidos en la técnica, tales como el vector de expresión de ADNc de Okayama-Berg pcDV1 (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (Invitrogen), pSPORT1 (GIBCO BRL). Preferentemente, dicho vector es un vector de expresión y/o un vector de

50 transferencia génica. Los vectores de expresión que proceden de virus tales como retrovirus, adenovirus, virus vaccinia, virus adenoasociados, virus del herpes o virus del papiloma bovino, se pueden usar para la administración de los polinucleótidos o del vector de la invención en una población celular diana. Se pueden usar métodos bien conocidos por los expertos en la materia para construir un vector de acuerdo con la presente invención; véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook, "Molecular Cloning A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. y Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y. (1994). Como alternativa, los polinucleótidos y vectores desvelados se pueden reconstituir en liposomas para su administración a células diana.

60 La expresión "fracciones aisladas de los mismos" se refiere a fracciones de células eucariotas o procariontas o tejidos que son capaces de transcribir o de transcribir y traducir ARN del vector. Dichas fracciones comprenden proteínas que se requieren para la transcripción de ARN o la transcripción de ARN y la traducción de dicho ARN en un

65

polipéptido. Dichas fracciones aisladas pueden ser, por ejemplo, fracciones nucleares y citoplasmáticas de células eucariotas tales como reticulocitos. Los kits para transcribir y traducir ARN que abarcan dichas fracciones aisladas de células o tejidos están disponibles en el mercado, por ejemplo, como reticulolizado TNT (Promega).

- 5 De nuevo, al igual que las moléculas de ácido nucleico desveladas, también los vectores desvelados son particularmente útiles para producir un péptido cíclico de la invención, por ejemplo, mediante un método correspondiente desvelado en el presente documento.

10 En un aspecto adicional, en el presente documento, se desvela una célula hospedadora recombinante que comprende la molécula de ácido nucleico y/o el vector como se desvela en el presente documento. En el contexto de este aspecto, la molécula de ácido nucleico y/o el vector pueden usarse, entre otros, para diseñar genéticamente células hospedadoras, por ejemplo, para expresar y aislar la cadena principal de aminoácidos/secuencia de aminoácidos primaria de los ciclótidos desvelados en la presente invención.

15 Dicha célula hospedadora puede ser una célula procariota o eucariota; Véase *supra*. La molécula o vector de ácido nucleico que está presente en la célula hospedadora puede estar integrado en el genoma de la célula hospedadora o puede mantenerse extracromosómicamente.

La célula hospedadora puede ser cualquier célula procariota o eucariota, tal como una célula bacteriana, de insecto, fúngica, vegetal, animal, de mamífero o, preferentemente, humana. Las células fúngicas preferidas son, por ejemplo, 20 las del género *Saccharomyces*, en particular, las de la especie *S. cerevisiae*, o las que pertenecen al grupo de hongos hifas, por ejemplo, varias cepas de la penicilina o aspergilla. El término "procariota" pretende incluir todas las bacterias que pueden transformarse o transfectarse con una molécula de ácido nucleico para la expresión de una cadena principal de aminoácidos/secuencia de aminoácidos primaria de los ciclótidos desvelados en el presente documento. Los hospedadores procariotas pueden incluir bacterias gram negativas, así como gram positivas tales como, por ejemplo, *E. coli*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens* y *Bacillus subtilis*. Una molécula de ácido nucleico que codifica una cadena principal de aminoácidos/secuencia de aminoácidos primaria de los ciclótidos cíclicos desvelados en el presente documento puede usarse para transformar o transfectar un hospedador usando cualquiera de las técnicas comúnmente conocidas por los expertos en la materia. Los métodos para preparar genes unidos operativamente, fusionados, y expresarlos en células bacterianas o células animales son bien conocidos en la técnica (Sambrook, *supra*). Las construcciones y los métodos genéticos descritos en el presente documento pueden usarse para la expresión de la cadena principal de aminoácidos/secuencia de aminoácidos primaria mencionada anteriormente en, por ejemplo, Hospedadores procariotas.

En general, los vectores de expresión que contienen secuencias promotoras que facilitan la transcripción eficaz del polinucleótido insertado se usan en conexión con el hospedador. El vector de expresión normalmente contiene un origen de replicación, un promotor y un terminator, así como genes específicos que son capaces de proporcionar selección fenotípica de las células transformadas. Los hospedadores procariotas transformados pueden cultivarse en fermentadores y cultivarse de acuerdo con técnicas conocidas en la materia para lograr un crecimiento celular óptimo. Los péptidos expresados se pueden aislar luego del medio cultivado, lisados celulares o fracciones de la membrana celular. El aislamiento y la purificación de los péptidos expresados de forma microbiana o de otro modo pueden realizarse mediante cualquier medio convencional tal como, por ejemplo, separaciones cromatográficas preparativas y separaciones inmunológicas tales como aquellas que implican el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales (Ausubel, "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994)).

45 De nuevo, al igual que las moléculas de ácido nucleico y los vectores desvelados y descritos en el presente documento, también las células hospedadoras correspondientes son particularmente útiles para producir un ciclótido como se desvela en el presente documento, por ejemplo, mediante el método correspondiente desvelado en el presente documento.

50 El experto puede proporcionar fácilmente, es decir, sintetizar, los ciclótidos que se van a usar de acuerdo con la presente invención o aislarlos de, por ejemplo, extractos (por ejemplo, extractos biológicos como extractos de plantas, hongos, animales o microbios).

55 En particular, se pueden emplear enfoques de síntesis (bio)química o generación de ciclótidos a través de técnicas de recombinación. Por ejemplo, un método de producción de un ciclótido puede comprender las etapas de

- a) (i) cultivar la célula hospedadora recombinante desvelada en el presente documento en condiciones tales que exprese la cadena principal de aminoácidos del ciclótido desvelado en el presente documento y recupere dicha cadena principal de aminoácidos; o  
60 ii) sintetizar químicamente la cadena principal de aminoácidos del ciclótido desvelado en el presente documento; y  
b) ciclar dicha cadena principal de aminoácido para formar el ciclótido desvelado en el presente documento.

65 Como se ha mencionado anteriormente, los péptidos lineales/cadenas principales de aminoácidos de los ciclótidos

que se van a producir también se pueden producir mediante técnicas de ingeniería recombinantes. Dichas técnicas son bien conocidas en la materia (por ejemplo, Sambrook, *supra*). Como también se ha mencionado anteriormente, mediante este tipo de producción de dichos péptidos lineales/cadenas principales de aminoácidos se pueden obtener determinadas ventajas de las moléculas de ácidos nucleicos, los vectores y/o las células hospedadoras que se desvelan y/o describen en el presente documento. Las definiciones proporcionadas anteriormente se aplican en el presente documento, *mutatis mutandis*.

Se conocen en la técnica varios enfoques de síntesis de péptidos y enfoques de síntesis particulares de péptidos cíclicos, (por ejemplo, Williams, "Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides", CRC-Press 1997; Benoiton: Chemistry of Peptide Synthesis. CRC-Press, 2005). El experto está fácilmente en posición de aplicar el conocimiento de la técnica anterior a los requisitos particulares del método desvelado para producir péptidos cíclicos, Basándose en la enseñanza proporcionada en el presente documento.

En el presente documento, también se desvela el uso de un ciclótido obtenible u obtenido mediante los enfoques o método/s desvelados anteriormente de acuerdo con la divulgación proporcionada en el presente documento.

Los términos como "inmunosupresión", "supresión del sistema inmune" y "supresión/reducción de la activación o eficacia del sistema inmune" se usan en el presente documento de una manera comparable. El significado correspondiente es conocido en la técnica, y los términos se usan correspondientemente en el presente documento. En particular, estos términos se refieren a la supresión o reducción de uno o varios parámetros del sistema inmune como, por ejemplo, célula/s inmune/s (activada/s y/o proliferante/s) como se define en el presente documento anteriormente.

De acuerdo con la presente divulgación, uno o varios parámetros del sistema inmune se pueden seleccionar del grupo que consiste en

- (i) células inmunes (en particular, las definidas anteriormente en el presente documento), en particular, PBMC, más en particular, linfocitos, incluso más linfocitos T particulares;
- (ii) una o varias funciones efectoras de células inmunes (en particular, de las definidas anteriormente en el presente documento);
- (iii) citocinas, en particular, el nivel, la secreción y/o la producción de las mismas;
- (iv) desgranulación/citotoxicidad de células inmunes, en particular, de las PBMC CD107a<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>; y
- (v) expresión de (a) receptor superficial de citocinas (por ejemplo, receptor superficial de IL-2 CD25), en particular en PBMC.

Las citocinas de acuerdo con la presente invención pueden ser IL-2, IFN-gamma y TNF-alfa, por lo que se prefiere IL-2.

"Supresión" o "reducción", en el contexto de la presente invención, significa particularmente que se reduce la respuesta de (defensa) del sistema inmune contra uno o varios antígenos/patógenos. En el contexto de la presente invención, esto no solo se debe ver con respecto a un estado activado, es decir, el cuadro clínico, del sistema inmune, sino también con respecto al estado no activado, es decir normal, sano del sistema inmune. En este contexto, es evidente que, incluso en el estado normal y sano, el sistema inmune tiene un nivel básico de activación debido a la línea base común de impacto de antígeno/patógeno.

De este modo, en una realización, la "supresión" del sistema inmune comienza desde un estado normal y sano del sistema inmune y, en otra realización, desde un estado activado y enfermo del sistema inmune.

En particular, se contempla en el contexto de la presente invención que el sistema inmune, en particular, uno o más parámetros del mismo, se suprime/reduzca en al menos un 10 %, preferentemente en al menos un 20 %, más preferentemente en al menos un 30 %, aún más preferentemente en al menos un 50 %, aún más preferentemente en al menos un 80 %, aún más preferentemente en al menos un 90 %, aún más preferentemente en al menos un 95 %, incluso más preferentemente en al menos un 99 % y lo más preferentemente en un 100 % del estado inicial del sistema inmune (que es un estado enfermo o no enfermo), en particular, de uno o más parámetros del mismo. En el presente documento, suprimir/reducir el sistema inmune significa, en particular, suprimir/reducir la proliferación de las células inmunes. El experto está fácilmente en posición de probar el grado de supresión del sistema inmune, por ejemplo, determinando la actividad proliferativa de las células inmunes o la fracción de células inmunes activadas/proliferantes. Es más, el experto está fácilmente en posición de determinar para un fármaco inmunosupresor dado la  $CI_{50}$  para el/la respectivo/a efecto/actividad inmunosupresor/a.

Es evidente para el experto en la materia, de acuerdo con la presente invención, que la composición farmacéutica o el ciclótido desvelado puede administrarse en una dosis farmacéutica/terapéuticamente eficaz, lo que significa que se alcanza una cantidad farmacéutica/terapéuticamente eficaz del compuesto administrado. Preferentemente, una dosis farmacéutica/terapéuticamente eficaz se refiere a la cantidad del compuesto administrado (principio activo) que produce la mejoría de los síntomas o una prolongación de la supervivencia de un sujeto que puede ser determinada por un experto en la materia que realice pruebas de rutina.

- Cabe señalar que la pauta de dosificación de los compuestos que se van a administrar de acuerdo con la presente invención será determinada por el médico tratante y los factores clínicos. Como se sabe en la técnica médica, la dosis para un paciente cualquiera depende de diversos factores, incluyendo la talla del paciente, el área superficial corporal, la edad, el compuesto concreto que se vaya a administrar, el sexo, el tiempo y la vía de administración, el estado general de salud y otros fármacos que se estén administrando concurrentemente. Un experto en la materia conoce y es capaz de probar las dosis relevantes, los compuestos que se van a aplicar médicamente de acuerdo con la presente invención que deben administrarse.
- En el contexto de la composición farmacéutica para el uso de acuerdo con la presente invención, se prevé particularmente que el ciclótido de tipo kalata B no injertado se administre de manera que se produzca una actividad/un efecto citostático pero poco, preferentemente nada, citotóxico. Para este fin, el ciclótido puede, por ejemplo, administrarse de modo que se alcance una concentración (en suero) en el intervalo de 1 a 50  $\mu\text{M}$ , preferentemente, en el intervalo de 1 a 15  $\mu\text{M}$ , más preferentemente, en el intervalo de 3 a 10  $\mu\text{M}$ , más preferentemente, en una cantidad de 4 a 9  $\mu\text{M}$  e incluso más preferentemente en una cantidad de 5 a 9  $\mu\text{M}$ . En particular, el ciclótido puede administrarse a través de una determinada vía de administración y/o en una cantidad/dosis para alcanzar una concentración (en suero) en el intervalo de 1 a 50  $\mu\text{M}$ , preferentemente, en el intervalo de 1 a 15  $\mu\text{M}$ , más preferentemente, en el intervalo de 3 a 10  $\mu\text{M}$ , todavía más preferentemente, en el intervalo de 4 a 9 y aún todavía más preferentemente en el intervalo de 5 a 9  $\mu\text{M}$ .
- Además, el ciclótido puede administrarse, por ejemplo, a una dosis en el intervalo de 0,1 a 15 mg/kg, preferentemente, en el intervalo de 0,1 a 12 mg/kg, más preferentemente, en el intervalo de 1 a 12 mg/kg, más preferentemente, en el intervalo de 1 a 10 mg/kg, más preferentemente, en el intervalo de 5 a 10 mg/kg e incluso más preferentemente, a una dosis de aproximadamente 10 mg/kg.
- La dosis puede administrarse una vez al día, mensualmente o preferentemente, semanalmente. El ciclótido se puede administrar en forma de 1 o más dosis únicas; en particular, 1, 2, 3, 4 o 5 dosis únicas. El ciclótido puede, por ejemplo, administrarse por vía intravenosa o intraperitoneal. Ejemplos no limitantes de esquemas de administración particulares son 3 inyecciones intravenosas únicas de aproximadamente 10 mg/kg a intervalos semanales o una sola dosis intraperitoneal de aproximadamente 10 mg/kg. Otros esquemas de administración posibles se describen a continuación en el presente documento.
- El experto está fácilmente en posición de descubrir la vía particular de administración y la cantidad/dosis de un ciclótido dado que se debe aplicar para alcanzar una actividad citostática, pero poca/ninguna actividad citotóxica.
- En una realización específica, la composición farmacéutica descrita en el presente documento puede comprender además uno o más inmunosupresores adicionales. Preferentemente, este (estos) inmunosupresor/es adicional/es no forma/n parte de una forma injertada del ciclótido, sino que está/n comprendido/s independientemente en la composición farmacéutica. En otra realización específica, El/los inmunosupresor/es adicional/es se administra /n por separado. En otra realización específica, el ciclótido descrito en el presente documento se puede administrar junto con uno o más inmunosupresores adicionales, es decir, antes, simultánea o posteriormente con respecto al/a los inmunosupresor/es adicional/es. Los ejemplos no limitantes de un inmunosupresor adicional se pueden seleccionar del grupo que consiste en ciclosporina A, Muromonab-CD3 (Orthoclone OKT3®) y Basiliximab (Simulect®).
- La composición farmacéutica descrita en el presente documento también puede comprender uno o más ciclótidos (proliferativas anti-células inmunes). De este modo, en una realización específica adicional, la composición farmacéutica descrita en el presente documento puede comprender al menos dos, tres, cuatro o cinco ciclótidos como los descritos en el presente documento. En una realización específica adicional, uno de los ciclótidos descritos en el presente documento debe administrarse junto con, es decir, antes de, simultáneamente con, o posteriormente a, otro, diferente, de los ciclótidos descritos en el presente documento.
- En una realización, la composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la presente invención puede comprender, o estar en forma de, un extracto (nativo), en particular, un extracto vegetal (nativo).
- Los ejemplos no limitantes de plantas a partir de las que se puede obtener dicho extracto son *Betula pendula*, *Oldenlandia affinis*, plantas de la familia *Violaceae* (por ejemplo, *Viola* sp., preferentemente, *V. odorata* y *V. tricolor*), especies de las calabazas (familia *Cucurbitaceae*), especies de *Ecballium*, especies de leguminosas (familia *Fabaceae*) y especies de *Psychotria* (familia *Rubiaceae*; por ejemplo *Psychotria polyphlebia*, *P. poeppigiana*, *P. chiapensis*, *P. borucana*, *P. buchtienii*, *P. pillosa*, *P. mortomiana*, *P. deflexa*, *P. makrophylla*, *P. elata*, *P. solitudinum*, *P. capitata*).
- En el presente documento, se describe (una composición farmacéutica que comprende), un ciclótido para su uso en la supresión inmune o un método para la supresión inmune mediante la administración de (una composición farmacéutica que comprende) un ciclótido. En otro aspecto, en el presente documento, se describe (una composición farmacéutica que comprende) un ciclótido para su uso en el tratamiento o en la prevención de una

enfermedad o trastorno y un método para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno, estando dicha enfermedad o dicho trastorno causado por la actividad del sistema inmune, es decir, una enfermedad o un trastorno que puede tratarse, prevenirse o mejorarse mediante inmunosupresión. En este contexto, no solo se prevé la supresión de un sistema inmune demasiado activo a un nivel inferior, por ejemplo, un nivel normal no enfermo, sino también la supresión de un sistema inmune normal de estado sano. Esto último es, por ejemplo, particularmente relevante con respecto a los enfoques de trasplante de órganos. El experto conoce, o al menos puede probar, determinadas enfermedades que pueden tratarse o prevenirse suprimiendo el sistema inmune. Se dan ejemplos de dichas enfermedades o trastornos en Kumar ("Clinical Medicine", 3ª edición (1994), Baillière Tindall).

10 En particular, la enfermedad o el trastorno que se va a tratar o prevenir de acuerdo con la presente invención se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) trastornos autoinmunes; y
- (ii) inflamaciones mediadas por células inmunes, en las que la célula inmune es un linfocito.

15 El significado y el alcance de "trastorno autoinmune", "trastorno de hipersensibilidad" e "inflamación mediada por células inmunes" se conocen en la técnica y pueden, por ejemplo, deducirse de Kumar ("Clinical Medicine", 3ª edición, 1994, Baillière Tindall).

20 Los ejemplos particulares de trastornos autoinmunes que se van a tratar o prevenir se seleccionan del grupo que consiste en:

- (i) esclerosis múltiple;
- (ii) psoriasis;
- 25 (iii) lupus eritematoso sistémico;
- (iv) síndrome de Sjögren;
- (v) artritis reumatoide (AR), en particular, AR grave;
- (vi) púrpura trombocitopénica idiopática;
- (vii) diabetes;
- 30 (viii) vasculitis; y
- (ix) enfermedad de Crohn.

35 Los ejemplos particulares de trastornos de hipersensibilidad que se van a tratar o prevenir como se describe en el presente documento son trastornos de injerto contra hospedador y dermatitis de contacto.

Un ejemplo particular de una inflamación mediada por células inmunes es una inflamación mediada por linfocitos, en particular, una inflamación mediada por linfocitos T. Los ejemplos particulares de inflamaciones mediadas por linfocitos que se van a tratar o prevenir son la queratoconjuntivitis seca y el síndrome del ojo seco (DES). La claridad corneal se necesita para una visión óptima, y puede verse afectada gravemente por cualquier forma de inflamación de la córnea. Esto está mediado por la infiltración de los leucocitos y la formación de vasos sanguíneos patológicos a largo plazo. En general, cualquier inflamación corneal que se produzca debe tratarse, en especial, si está implicada la córnea central. Una vez que se establece una cicatriz corneal, la queratoplastia se vuelve necesaria para restablecer la transparencia corneal que es indispensable para una visión óptima.

45 En una realización, se prevé, en particular, que las enfermedades o los trastornos de un subgrupo de las enfermedades o trastornos definidos anteriormente (o en cualquier otra parte del presente documento) se traten/previengan, comprendiendo dicho subgrupo de enfermedades o trastornos aquellas enfermedades o trastornos que

- 50 (i) vienen acompañados y/o están causados por un sistema inmune (sobre)activado y/o uno o varios parámetros (sobre)activados/aumentados del sistema inmune o
- (ii) que pueden tratarse/prevenirse mediante la supresión del sistema inmune (a partir de un estado (sobre)activado, enfermo o de un estado normal y sano). Dentro de este subgrupo, en particular, están aquellas enfermedades/trastornos que deben tratarse/prevenirse que vienen y/o están causados por células inmunes (sobre)activadas o que pueden tratarse/prevenirse mediante la reducción de la actividad (proliferante) de las células inmunes.

60 Lo que se ha dicho con respecto al significado de "células inmunes" y "parámetros/s del sistema inmune" en otra parte del presente documento también se aplica en el presente documento, *mutatis mutandis*.

En otra realización, las células inmunes, en particular, la proliferación de las mismas, se van a suprimir en el contexto del tratamiento/de la prevención de la presente invención. Preferentemente, dichas células inmunes son linfocitos T (primarios) activados y/o células mononucleares de sangre periférica (PBMC). De nuevo, lo que se ha dicho con respecto al significado de "células inmunes" en otra parte del presente documento también se aplica en el presente documento *mutatis mutandis*.

En otra realización, uno o varios parámetros del sistema inmune se suprimen/reducen en el contexto del tratamiento/de la prevención de la presente invención. Lo que se ha dicho con respecto al significado de "parámetros/s del sistema inmune" en otra parte del presente documento también se aplica en el presente documento, *mutatis mutandis*.

En un aspecto específico, la enfermedad o el trastorno que se va a tratar/revenir de acuerdo con la presente invención es una enfermedad o un trastorno mediado por una vía de las citocinas, en particular, la vía de IL-2 (a través de CD25).

En otro aspecto específico, la enfermedad o el trastorno que se va a tratar/prevenir es una enfermedad o un trastorno

- (i) que no puede tratarse o no debe tratarse mediante una inducción o aumento de la liberación de  $Ca^{2+}$ ; y/o
- (ii) que no aparece o no está relacionado con un cambio en la señalización de  $Ca^{2+}$ .

En otra realización específica, la enfermedad que se va a tratar/prevenir no es una enfermedad que pueda tratarse/prevenirse inhibiendo la actividad de la triptasa, es decir, es una enfermedad o un trastorno independiente de la triptasa.

Cada una o más de las realizaciones/los aspectos anteriores se aplica/n particularmente a las enfermedades o a los trastornos definidos o ilustrados anteriormente (o en otra parte del documento), en particular, a las enfermedades o los trastornos definidos o ilustrados en los apartados (i) a (ii) o (i) a (ix), *supra*. Más concretamente, cada una o más de las realizaciones/los aspectos anteriores se aplica/n a un subgrupo de estas enfermedades o estos trastornos.

Además de su cadena principal de aminoácidos, los ciclótidos que se van a usar de acuerdo con la invención pueden comprender también (por ejemplo, unirse covalentemente a) uno o varios sustituyentes adicionales, como marcadores, anclajes (como anclajes de membrana proteica), etiquetas (como etiquetas HIS). El/los sustituyente/s se pueden unir de forma covalente o no covalente a los ciclótidos, y directamente o mediante enlaces. El experto en la materia está fácilmente en condiciones de encontrar enlaces apropiados para emplearlos en este contexto. Es más, los expertos en la materia conocen los sustituyentes y los métodos apropiados para añadirlos a un ciclótido.

Los ejemplos de marcadores incluyen, entre otros, fluorocromos (como flúor-18, fluoresceína, rodamina, Rojo Texas, etc.), enzimas (como la peroxidasa de rábano picante,  $\beta$ -galactosidasa, fosfatasa alcalina), radio/isótopos radioactivos (como  $^{32}P$ ,  $^{33}P$ ,  $^{35}S$ ,  $^{125}I$  o  $^{123}I$ ,  $^{135}I$ ,  $^{124}I$ ,  $^{11}C$ ,  $^{15}O$ ), biotina, digoxigenina, metales coloidales, compuestos químicos o bioluminiscentes (como dioxetanos, luminol o acridinios). Uno ejemplo no limitante de un marcador que puede unirse al ciclótido es un fluorocromo, como un fluorocromo FRET, por ejemplo, una variante de GFP, YFP o CFP (por ejemplo, GFP, YFP, CFP, eGFP, EYFP o ECFP). Hay disponibles una variedad de técnicas para marcar biomoléculas, y comprenden, entre otras, el acoplamiento covalente de enzimas o grupos biotínico, fosforilaciones, biotinizaciones, cebado aleatorio, traducciones de mellas, rastreos (usando transferasas terminales). Dichas técnicas se describen, por ejemplo, en Tijssen, "Practice and theory of enzyme immunoassays", Burden and von Knippenburg (Eds), Volumen 15 (1985); "Basic methods in molecular biology", Davis L. G., Dibmer M. D., Battey Elsevier (1990); Mayer, (Eds) "Immunochemical methods in cell and molecular biology" Academic Press, Londres (1987); o en la serie "Methods in Enzymology", Academic Press, Inc. Los métodos de detección correspondientes comprenden, pero sin limitación, autorradiografía, microscopia de fluorescencia, reacciones enzimáticas directas e indirectas, etc.

Los ciclótidos como los descritos y definidos en el presente documento, en particular, los ciclótidos marcados descritos anteriormente pueden emplearse en estudios de biodistribución, es decir, estudios resultantes en un patrón de distribución del ciclótido, por ejemplo, en un animal o, preferentemente, un sujeto/paciente humano. Por ejemplo, dichos estudios de biodistribución pueden comprender generación de imágenes mediante dispositivos de formación de imágenes de fotón único o PET.

La administración de la composición farmacéutica o el/los ciclótido/s de acuerdo con la presente invención se puede efectuar por diferentes vías. Dichas vías pueden ser, por ejemplo, oral, intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intravesical o subcutánea, o administración por inhalación, así como administración transdérmica. Otros ejemplos son administración parenteral, tal como subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, inyección intratecal, transdérmica, transmucosal, subdural transpulmonar, administraciones locales o tópicas y administraciones mediante iontoferesis, administraciones sublinguales, administraciones mediante pulverización por inhalación, o administración en aerosol o rectal, y similares.

En particular, para pacientes y/o para su usos médicos particulares, pueden estar indicadas vías de administración particulares como la infusión sanguínea (por ejemplo, infusión intravenosa), administración rectal (por ejemplo, en forma de enemas o supositorios) o las vías de administración tópica (en particular, cuando se deben tratar enfermedades oculares como el síndrome del ojo seco).

Un vehículo opcionalmente comprendido en la composición farmacéutica de la invención o que se administrará junto con la composición farmacéutica o el ciclótido de la invención puede ser, en particular, un vehículo, excipiente o

diluyente farmacéuticamente aceptable.

Dichos vehículos son bien conocidos en la técnica. El experto en la materia está fácilmente en condiciones de descubrir dichos vehículos que son particularmente adecuados para emplearlos de acuerdo con la presente invención.

5 Los vehículos/excipientes farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en la formulación de las composiciones farmacéuticas que comprenden los compuestos activos definidos en el presente documento (o una sal de los mismos), en general, pueden comprender portadores, vehículos, diluyentes, disolventes tales como alcoholes monohídricos tales como etanol, isopropanol y alcoholes polihídricos tales como glicoles y aceites comestibles tales como aceite de soja, aceite de coco, aceite de oliva, aceite de cártamo, aceite de semilla de algodón, ésteres oleosos tales como oleato de etilo, miristato de isopropilo; aglutinantes, adyuvantes, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes, disgregantes, emolientes, agentes lubricantes, agentes tamponadores, emulsionantes, agentes humectantes, agentes de suspensión, agentes edulcorantes, colorantes, aromas, agentes de recubrimiento, conservantes, antioxidantes, agente de procesamiento, modificadores de la administración de fármacos y potenciadores como fosfato de calcio, estearato de magnesio, talco, monosacáridos, disacáridos, almidón, gelatina, celulosa, metilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, dextrosa, hidroxipropil-β-ciclodextrina, polivinilpirrolidona, cera de bajo punto de fusión, resinas de intercambio iónico. Los vehículos/excipientes farmacéuticamente adecuados se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences, 15ª Ed., Mack Publishing Co., New Jersey (1991).

10

15

20 A continuación, se describen varios esquemas de administración no limitantes y el uso de vehículos farmacéuticamente aceptables correspondientemente adecuados.

Para una administración de la composición farmacéutica o los ciclótidos de acuerdo con la presente invención por inyección subcutánea (s.c.) o intravenosa (i.v./intraarterial (i.a.)), los ciclótidos (o secuencias codificantes) se pueden formular en solución acuosa, preferentemente, en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hanks, solución de Ringer o tampón salino fisiológico. Para la administración transmucosa y transpulmonar, se usan en la formulación agentes penetrantes adecuados para la barrera que va a atravesarse. Dichos penetrantes se conocen en general en la técnica.

25

El uso de vehículos farmacéuticamente aceptables para formular los ciclótidos en formulaciones o composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración sistémica, es decir, intravenosa/intraarterial o subcutánea, está dentro del alcance de la presente invención. Con la elección adecuada del vehículo y la práctica de fabricación adecuada, las composiciones de la presente invención, en particular, las formuladas como soluciones, se pueden administrar por vía parenteral, tal como mediante inyección intravenosa. Los compuestos pueden formularse fácilmente usando vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica a dosis adecuadas para la administración subcutánea u oral. Dichos vehículos permiten que los compuestos de acuerdo con la presente invención se formulen en forma de comprimidos, píldoras, cápsulas, grageas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones acuosas, suspensiones y similares, para su ingestión oral por un sujeto que se va a tratar.

30

35

Los compuestos desvelados y descritos en el contexto de la presente invención, o los medicamentos o las composiciones farmacéuticas que los comprenden, destinados a administrarse intracorporal/intracelularmente pueden administrarse usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, dichos agentes pueden encapsularse en liposomas, luego administrarse como se ha descrito anteriormente. Los liposomas son bicapas lipídicas esféricas con interiores acuosos. Todas las moléculas presentes en una solución acuosa en el momento de la formación del liposoma se incorporan al interior acuoso. Los contenidos liposómicos están protegidos del microambiente externo y, debido a que los liposomas se fusionan con las membranas celulares, se administran eficazmente cerca de la superficie de la célula. En la patente de EE.UU. n.º 4.880.635 de Janoff *et al.*, se desvelan sistemas de administración que incluyen liposomas. Las publicaciones y patentes proporcionan descripciones útiles de técnicas para la administración de fármacos liposómicos.

40

45

50

Las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto como el desvelado o descrito en el contexto de la presente invención para la administración parenteral y/o subcutánea incluyen soluciones acuosas del/de los compuesto/s activo/s en forma hidrosoluble. Además, se pueden preparar suspensiones de los compuestos activos en forma de suspensiones oleosas para inyección adecuadas. Los disolventes o vehículos lipófilos adecuados incluyen aceites grasos tales como aceite de sésamo o aceite de ricino, o ésteres de ácidos grasos sintéticos, tales como oleato de etilo o triglicéridos, o liposomas. Las suspensiones acuosas para inyección pueden contener compuestos que aumenten la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa sódica, sorbitol, dextrano o similares. Opcionalmente, La suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que aumentan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones muy concentradas y para permitir una liberación constantemente lenta de la sustancia en el organismo.

55

60

Un "paciente"/"sujeto" para los fines de la presente invención, es decir, a quien se le va a administrar una composición farmacéutica o un ciclótido de acuerdo con la presente invención o que padece la enfermedad o el trastorno definido o descrito en el presente documento, incluye tanto seres humanos como animales y otros organismos. Por lo tanto, las composiciones de la presente invención son aplicables al, o están en conexión tanto

65

con, el tratamiento humano como aplicaciones veterinarias que incluyen procedimientos y métodos de tratamiento/prevención. En la realización preferida, el paciente/sujeto es un mamífero, y en la realización más preferida, el paciente/sujeto es un ser humano.

5 Se desvela además en el presente documento un método de exploración y/o selección de un ciclótido inmunosupresor que comprende la etapa de

10 i) poner en contacto un ciclótido o un extracto (vegetal) que contiene un ciclótido con (una muestra de) una célula (activada) del sistema inmune; y determinar la actividad proliferativa de dicha célula, en el que una actividad proliferativa suprimida o reducida (en comparación con un control) es indicativo de la actividad inmunosupresora del ciclótido; o

15 ii) administrar a un modelo animal una cantidad farmacéuticamente eficaz de un ciclótido o un extracto (vegetal) que contenga un ciclótido; y determinar el (uno o varios parámetros del) sistema inmune o uno o varios signos clínicos/la presencia de una enfermedad o de un trastorno según lo definido en el presente documento, en el que la supresión o reducción (de los parámetros) del sistema inmune o la disminución del/de los signo/s clínico/s/mejoría de la enfermedad o del trastorno (en comparación con un control) es indicativo de la actividad inmunosupresora del ciclótido.

20 El método de exploración y/o selección puede comprender además la etapa de aislar y/o identificar el ciclótido inmunosupresor (procedente del extracto (vegetal)). Por ejemplo, dicha etapa de aislamiento y/o identificación puede comprender (nano) reconstrucción de LC-MS/MS o de LC-MS, preferentemente, una combinación de ambas, (nano) reconstrucción de LC-MS/MS y de LC-MS. Opcionalmente, dicha etapa puede comprender además la búsqueda en bases de datos (automática) y/o la secuenciación manual de péptidos *de novo* asignando iones de fragmentos b e y de espectros de MS/MS.

25 Es más, el método de exploración y/o selección puede comprender además una etapa de determinación del patrón de biodistribución del ciclótido inmunosupresor (aislado y/o identificado) en (una muestra de) un sujeto humano o animal. Los ejemplos de técnicas de biodistribución correspondientes se han descrito en el presente documento anteriormente.

30 Un control adecuado del método desvelado en el presente documento para explorar y/o seleccionar un ciclótido inmunosupresor puede ser (una muestra de) una célula (activada) del sistema inmune que

35 (i) no se haya puesto en contacto con el ciclótido o el extracto (vegetal) que contiene un ciclótido; o  
(ii) se haya puesto en contacto con un ciclótido que no tenga actividad inmunosupresora.

Otro control adecuado del método desvelado en el presente documento para explorar y/o seleccionar un ciclótido inmunosupresor puede ser un modelo animal al que

40 (i) no se haya administrado dicho ciclótido o extracto (vegetal) que contiene un ciclótido; o  
(ii) se haya administrado un ciclótido que no tenga actividad inmunosupresora (a una cantidad comparable o la misma cantidad).

45 Se desvela además en el presente documento un método de exploración y/o selección de una mutación que, cuando se introduce en un ciclótido, da lugar a un ciclótido mutado que tiene una actividad inmunosupresora inducida o potenciada en comparación con el ciclótido no mutado, comprendiendo dicho método las etapas de

50 (i) introducir una mutación en un ciclótido; y  
(ii) poner en contacto el ciclótido así mutado con (una muestra de) una célula (activada) del sistema inmune; y determinar la actividad proliferativa de dicha célula, en el que una actividad proliferativa reducida en comparación con un control indica que la mutación confiere actividad inmunosupresora (potenciada) al ciclótido; o administrar a un modelo animal una cantidad farmacéuticamente eficaz del ciclótido así mutado; y determinar el (uno o varios parámetros del) sistema inmune o uno o varios signos clínicos/la presencia de una enfermedad o de un trastorno según lo definido en el presente documento, en el que la supresión o reducción (de los parámetros) del sistema inmune o la disminución del/de los signo/s clínico/s/mejoría de la afección/del trastorno en comparación con un control confiere actividad inmunosupresora (potenciada) al ciclótido.

60 Un control adecuado del método desvelado en el presente documento para explorar y/o seleccionar una mutación puede ser (una muestra de) una célula (activada) del sistema inmune que

(i) no se haya puesto en contacto con el ciclótido mutado; o  
(ii) se haya puesto en contacto con la forma no mutada del ciclótido o con un ciclótido que no tenga actividad inmunosupresora.

65 Otro control adecuado del método desvelado en el presente documento para explorar y/o seleccionar una mutación

puede ser un modelo animal al que

- (i) no se haya administrado dicho ciclótido mutado; o
- (ii) se haya administrado la forma no mutada del ciclótido o un ciclótido que no tenga actividad inmunosupresora.

5 Los ejemplos no limitantes de ciclótidos que no tienen actividad inmunosupresora se seleccionan del grupo que consiste en los mutantes Kalata B1 T8K, V10A y V10K según lo desvelado en el presente documento.

10 La supresión o reducción de la actividad proliferativa, (el/los parámetro/s de) el sistema inmune o la disminución del/de los signo/s clínico/s/mejoría de la afección/del trastorno en comparación con un control significa preferentemente una supresión o reducción en al menos un 20 %, más preferentemente en al menos un 30 %, más preferentemente en al menos un 40 %, más preferentemente en al menos un 50 %, más preferentemente en al menos un 60 %, más preferentemente en al menos un 70 %, más preferentemente en al menos un 80 %, más preferentemente, al menos en un 90 % y lo más preferentemente, al menos en un 95 % en comparación con un control.

Se desvela además en el presente documento un método para producir un ciclótido inmunosupresor que comprende la etapa de introducir una mutación rastreada y/o seleccionada de acuerdo con el método anterior en un ciclótido.

20 En general, "mutación" en el contexto de la presente invención significa cualquier cambio en la estructura del ciclótido (nativo o de tipo silvestre), en particular, en la secuencia de aminoácidos primaria de la misma. Más concretamente, "mutación" significa que uno o más restos de aminoácidos del ciclótido (nativo o de tipo silvestre) se reemplazan, sustituyen o añaden. En un aspecto específico, "mutación" se refiere a una mutación puntual, es decir, al reemplazo, la sustitución o la adición de un resto de aminoácido. En un aspecto más específico, "mutación" se refiere al reemplazo de un resto de aminoácido. Lo que se ha dicho con respecto a las formas mutadas/variantes que se usarán de acuerdo con la presente invención en otra parte del presente documento también se aplica al significado del término "mutación", *mutatis mutandis*.

30 Si no se especifica de manera diferente, "inducción", "inducir" o "inducido", en el contexto de la presente invención, significa partir de un valor inicial que es casi cero. "Aumento"/"aumentar" o "potenciar"/"potenciado/a" no significan necesariamente comenzar desde un valor inicial de casi cero, sino que también puede significar comenzar desde un nivel que ya esté por encima de cero. Por ejemplo, una actividad inmunosupresora inducida se refiere a cuando inicialmente no hubo actividad inmunosupresora en absoluto; una actividad inmunosupresora potenciada/aumentada se refiere a cuando inicialmente ya existía alguna actividad inmunosupresora que luego se potenció/aumentó.

35 Un modelo animal preferido para su aplicación en el contexto del método de exploración y/o selección desvelado en el presente documento es un modelo animal para una cualquiera de las enfermedades o trastornos definidos en el presente documento. Los modelos animales correspondientes son conocidos en la técnica. Por ejemplo, dicho modelo animal puede ser un modelo animal para una enfermedad autoinmune, como, por ejemplo, EM. Un ejemplo no limitante para un modelo animal de EM es un modelo animal de EAE, por ejemplo, un modelo de ratón de EAE. Otro ejemplo de un modelo animal que se puede aplicar en este contexto es un modelo (ratón, rata y similar) para el síndrome del ojo seco (DES), como, por ejemplo, un modelo para DES que usa ratas Fisher y/o Lewis.

40 El uso de dichos modelos animales en el contexto de los métodos de exploración/selección desvelados en el presente documento se describe con más detalle en el siguiente ejemplo no limitante.

45 La claridad corneal se necesita para una visión óptima, y puede verse afectada gravemente por cualquier forma de inflamación de la córnea. Esto está mediado por la infiltración de los leucocitos y la formación de vasos sanguíneos patológicos a largo plazo. Independientemente de las razones, cualquier inflamación corneal que se produzca debe tratarse, en especial, si está implicada la córnea central. Una vez que se establece una cicatriz corneal, la queratoplastia se vuelve necesaria para restablecer la transparencia corneal que es indispensable para una visión óptima. Se puede realizar un trasplante corneal ortotópico entre las ratas Fisher y Lewis. Las ratas receptoras pueden tratarse con un control o con el componente (es decir, ciclótido) de interés. El tratamiento puede administrarse por vía intraperitoneal (u otro método descrito anteriormente) durante, por ejemplo, 14 días. Todos los tratamientos pueden controlarse en un entorno singénico. Los injertos de córnea pueden repararse con ocho suturas interrumpidas y protegerse con una blefarorrafia durante los 3 días iniciales posteriores al trasplante. Tras la extirpación de la blefarorrafia, los injertos pueden ser examinados por dos investigadores independientes para detectar los signos de opacidad, vascularización y edema de acuerdo con una puntuación aceptada internacionalmente. La opacidad del injerto se puede puntuar de la siguiente manera: 0 = sin opacidad; 1 = ligera opacidad, detalles del iris claramente visibles; 2 = opacidad moderada, algunos detalles del iris ya no son visibles; 3 = fuerte opacidad, pupila aún reconocible; 4 = opacidad total. El rechazo se puede definir como la opacidad completa del injerto (grado 4). Además, todos los animales pueden controlarse diariamente para detectar signos de efectos secundarios tóxicos, tales como la pérdida de peso. Las ratas pueden sacrificarse por la caracterización histológica del infiltrado leucocitario en el injerto. Además, se pueden preparar los ganglios linfáticos submandibulares drenantes y no drenantes, así como el bazo para el análisis de citometría de flujo de la activación de los linfocitos T y la apoptosis de los linfocitos T. Finalmente, se puede determinar la fuerza inducida sistémicamente de la respuesta de los linfocitos T mediante una reacción de leucocitos mixtos en ambos ganglios mencionados.

El experto en la materia está en posición de aplicar y adaptar el uso ilustrativo descrito de un modelo de DES también a otros modelos animales de cualquiera de las enfermedades o trastornos definidos en el presente documento.

5 En un aspecto específico, (una muestra de) una célula (activada) del sistema inmune se puede ver como un "modelo animal" de acuerdo con la presente descripción.

Se prevé particularmente que el ciclótido que se va a explorar/seleccionar sea un ciclótido como se define en el presente documento. Las respectivas definiciones se aplican en el presente documento *mutatis mutandis*.

10 En el contexto de los métodos de exploración/selección desvelados en el presente documento, la célula (activada) o el parámetro del sistema inmune puede ser una célula inmune o un parámetro del sistema inmune como se define y se describe en otra parte del presente documento. Las respectivas definiciones también se aplican en el presente documento, *mutatis mutandis*.

15 Una "muestra" adecuada de acuerdo con la presente descripción incluye, aunque sin limitación, una o varias muestras biológicas o médicas, como, por ejemplo, una o varias muestras que comprenden célula/s o tejido/s. Por ejemplo, Dichas una o varias muestras pueden comprender material biológico de biopsias. El significado de "biopsias" es conocido en la técnica. Por ejemplo, las biopsias comprenden la/s célula/s o tejido/s tomado/s, por ejemplo, por el médico responsable, de un paciente/sujeto como se describe en el presente documento. De manera  
20 ilustrativa, pero sin limitaciones, la muestra biológica o médica que se va a analizar en el contexto de la presente invención es o se obtiene de sangre, plasma, glóbulos blancos, orina, semen, esputo, líquido cefalorraquídeo, linfa, o tejidos o células linfáticas, células musculares, células del corazón, células de venas o arterias, células nerviosas, células de la médula espinal, células del cerebro, células hepáticas, células renales, células del tracto intestinal, células del testículo, células del tracto urogenital, células del colon, piel, hueso, médula ósea, placenta, fluido  
25 amniótico, cabello, cabello y/o folículos, células madre (embrionarias, neuronales y/u otras) o estirpes celulares primarias o inmortalizadas (linfocitos, macrófagos o estirpes celulares). Las "muestras" preferidas de acuerdo con la presente descripción son las derivadas de sangre o plasma. La muestra biológica o médica definida en el presente documento también puede derivarse de biopsias, por ejemplo, biopsias derivadas de tejido cardíaco, venas o  
30 arterias.

En un aspecto de la composición farmacéutica o de los métodos desvelados y descritos en el presente documento, el efecto antiproliferativo o la supresión/reducción está mediado de una manera dependiente de las citocinas, por ejemplo, de una manera dependiente de IL-2, IFN-gamma y/o TNF-alfa, y/o puede ser antagonizado por una citocina, por ejemplo, por IL-2.

35 En el presente documento, se desvela además un método para producir una composición farmacéutica inmunosupresora que comprende la etapa de mezclar

(i) un ciclótido como se define en el presente documento; o  
40 (ii) un ciclótido explorado, seleccionado, producido, aislado o identificado como se describe en el presente documento

con en un vehículo farmacéuticamente aceptable.

45 En el presente documento, se desvela además un ciclótido mutado que tiene actividad inmunosupresora y, en particular, un ciclótido mutado como se define y describe en el presente documento (por ejemplo, un ciclótido mutado que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3 a 7 o un ciclótido que consiste en una forma ciclada de cabeza a cola de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3 a 7).

50 Además, en el presente documento, se desvela una composición farmacéutica que comprende un ciclótido mutado que tiene actividad inmunosupresora y, opcionalmente, un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. También en este contexto, se prevé, en particular, que el ciclótido mutado sea un ciclótido mutado como se define en el presente documento anteriormente.

55 La presente invención se describe además por referencia a las siguientes figuras y ejemplos no limitantes.

Las Figuras muestran:

60 **Figura 1. Diversidad de estructura y secuencia de los ciclótidos.** Se muestra la estructura del ciclótido kalata B1 típico se muestra en un dibujo en blanco y negro. Las seis cisteínas conservadas están marcadas con números romanos, y se muestra la conectividad del disulfuro de nudo de cisteína resultante ((C<sub>I</sub>-C<sub>IV</sub>, C<sub>II</sub>-C<sub>V</sub> y C<sub>III</sub>-C<sub>VI</sub>). La secuencia de aminoácidos y la conectividad del disulfuro de kalata B1 se muestran bajo el dibujo de la estructura. Los números (n) indican la longitud posible (en aminoácidos) de los bucles inter-cisteína que comprenden todos los  
65 ciclótidos actualmente conocidos (de acuerdo con Ireland, 2010, *J Nat Prod*, 73, 1610-1622)). Los bucles inter-

cisteína pueden tolerar una amplia variedad de sustituciones de aminoácidos y son un indicador de la diversidad combinatoria del armazón ciclótico. Las posiciones de las mutaciones sintéticas que se han introducido durante este estudio están indicadas por el código de aminoácido de una letra, el número y el asterisco. El punto natural de ciclación está indicado por una flecha.

5 **Figura 2. Efectos del extracto de ciclótico de *O. affinis* en la proliferación celular de células mononucleares de sangre periférica humanas activadas.** Se activaron PBMC humanas primarias marcadas con CFSE con anticuerpos (anticuerpos monoclonales anti-CD3/CD28) y se cultivaron en presencia de medio (ctrl), camptotecina (CPT, 30 µg/ml) o diferentes concentraciones (50-100 µg/ml) de extracto de ciclótico de *O. affinis*. Las células se  
10 analizaron además para determinar la viabilidad celular y la capacidad de proliferación usando un análisis de citometría de flujo basado en la dispersión de flujo lateral directo (A y B). El análisis de división celular se evaluó mediante FACS y se ilustró como gráficos de puntos representativos (C). Se resumen los resultados de tres experimentos independientes en (D) y los datos se presentan como la media ± ETM.

15 **Figura 3. Cromatograma de nano LC-MS de ciclóticos de *O. affinis*.** se controló el perfil de elución de nanoflujo de ciclóticos de *O. affinis* con la absorbancia UV a 214 nm y espectrometría de masas. Se muestra el gráfico de HPLC de un extracto de ciclótico en bruto representativo, y sus ciclóticos principales se indican por el nombre y la abundancia relativa. Se determinó el contenido relativo de ciclótico (media ± ETM) mediante la integración máxima de cinco experimentos independientes (véase la Tabla 6). Las condiciones de HPLC y MS para el análisis de los  
20 ciclóticos se muestran en el apartado de Métodos.

**Figura 4. Efectos de kalata B1 en la proliferación celular de células mononucleares de sangre periférica humanas activadas.** Se midió la influencia del medio (ctrl), de la camptotecina (CPT, 30 µg/ml) o de las diferentes concentraciones de kalata B1 (1,8-14 µM) sobre la proliferación de PBMC primarias humanas activadas por anticuerpos monoclonales anti-CD3/CD28 CFSE<sup>+</sup> mediante análisis de división celular usando citometría de flujo. Los datos se presentan como la media ± ETM de cuatro experimentos independientes.

**Figura 5. Efectos de kalata B1 en la citotoxicidad de células mononucleares de sangre periférica humanas activadas.** Se activaron PBMC primarias humanas con anticuerpos monoclonales anti-CD3/CD28 en presencia de medio (ctrl), camptotecina (CPT, 30 µg/ml), Triton-X 100 (T-x) o diferentes concentraciones de kalata B1 (1,8-14 µM) y se analizó el contenido de ADN "subG1" (A) mediante citometría de flujo. Se tiñeron las células con anexina V y yoduro de propidio (PI) para evaluar los porcentajes de células viables (anexina V/PI<sup>-</sup>), apoptóticas (anexina V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> o anexina V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) y necróticas (anexina V/PI<sup>+</sup>). Se analizaron los diagramas de puntos, y se muestran gráficos representativos en (B). Se resumen los resultados de tres experimentos independientes, y los datos se presentan  
35 como la media ± ETM (C y D). nd = no detectable.

**Figura 6. Alineación estructural de kalata B1 y B2.** Se alinearon estructuralmente las estructuras de solución de RMN de kalata B1 (código PDB: 1NB1) y kalata B2 (1PT4) usando PyMol. La alineación de todos los átomos (A) da lugar a una RMSD de 0,725 Å (solo se resaltan en negrita los cinco restos diferentes, los restos restantes se muestran sin resaltar) y los átomos de la estructura (B) se ajustan a una RMSD de 0,599 Å. Las secuencias de ambos ciclóticos se muestran debajo de las estructuras alineadas con los diferentes restos indicados por recuadros  
40 negros.

**Figura 7. Determinación de CI<sub>50</sub> para el efecto antiproliferativo de Kalata B1 en PBMC.** La CI<sub>50</sub> de los efectos antiproliferativos de kalata B1 (véase la Figura 4) se ha determinado mediante análisis de regresión no lineal (inhibidor logarítmico frente a la respuesta normalizada) usando GraphPad Prism.

**Figura 8. Efectos de la melitina sobre la proliferación celular y la citotoxicidad de las células mononucleares de sangre periférica humanas activadas.** Se cultivaron linfocitos humanos activados por anticuerpos (anticuerpos monoclonales anti-CD3/CD28) en presencia de medio (ctrl), camptotecina (CPT, 30 µg/ml), Triton-X 100 (T-x) o diferentes concentraciones de melitina (0,05-1,6 µM) para el análisis por citometría de flujo de la división celular (A), del contenido de ADN "subG1" (B) o del contenido de células apoptóticas (C) y necróticas (D). Para la detección apoptótica y necrótica, las células se tiñeron con anexina V y yoduro de propidio para evaluar los porcentajes de células viables (anexina V/PI<sup>-</sup>), células apoptóticas (anexina V<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> o anexina V<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) y necróticas (anexina V/PI<sup>+</sup>). Los datos se presentan como la media ± ETM de tres a cuatro experimentos independientes, n.d. =  
55 no detectable.

**Figura 9. Efectos de mutantes ciclóticos sobre la proliferación celular de células mononucleares de sangre periférica humanas activadas (PBMC).** Se midió la influencia de no activado (Ø), medio (ctrl), camptotecina (CPT, 30 µM), ciclosporina A (CsA, 1 µg/ml) o de diferentes concentraciones de ciclóticos (1,8-14 µM) sobre la proliferación de PBMC primarias humanas activadas por anticuerpos monoclonales anti-CD3/CD28 CFSE<sup>+</sup> (100 ng/ml de cada) mediante análisis de división celular usando citometría de flujo. Los datos se representan como la media + DT de al menos dos donantes y experimentos independientes. Los mutantes de ciclótico G18K, N29K y T20K muestran capacidad antiproliferativa. T20K + G1K es citotóxico a 14 µM. Los controles son similares en cada diagrama de  
65 barras. Los resultados con las células purificadas de CD3 están de acuerdo con esos datos (véase la Tabla 2).

**Figura 10. Actividad de kalata B1 *in vivo* en la encefalomiélitis autoinmune experimental en ratones.** (A) Se determinó la puntuación clínica de ratones con EAE tras la vacunación con kalata B1 (línea clara) o control de PBS (línea negra) como se indica en el apartado de Materiales y Métodos. La vacunación con el ciclótido produjo una reducción en la incidencia y gravedad de la EAE. (B) Se examinó la influencia de la vacunación con kalata B1 en la formación de lesiones inflamatorias y desmielinizantes del SNC mediante estudios histológicos de tejido fijado usando tinción con hematoxilina/eosina, Luxol azul rápido y plata Bielshowsky. El SNC de todos los ratones tratados con PBS mostró lesiones inflamatorias, desmielinización y daño axonal que fueron particularmente llamativos en el cerebelo y en la médula espinal (indicados por flechas). La vacunación con kalata B1 conduce a una reducción tanto de los signos clínicos como de las lesiones histológicas de EAE. (C) La proliferación de células del bazo en respuesta al gen de la encefalitis MOG<sub>35-55</sub> y la estimulación por los activadores policlonales, anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28 muestra, independientemente del régimen de tratamiento, esplenocitos de todos los ratones vacunados proliferados a MOG, y estos esplenocitos mostraron fuertes respuestas proliferativas hacia los anticuerpos anti-CD3/CD28. (D) La supresión de la EAE por kalata B1 no se asocia con una supresión de la producción de anticuerpos anti-MOG. Como se muestra, se detectaron anticuerpos anti-MOG en todos los sueros independientemente del régimen de vacunación. (E, F) los linfocitos T reactivos con MOG en animales protegidos no cambiaron a un fenotipo de linfocito T antiinflamatorio. Se demostraron niveles significativamente reducidos de la quimiocina MIG (E) y TNF $\alpha$  (F) en sobrenadantes de células de bazo no estimuladas generados a partir de animales tratados con kalata B1.

**Figura 11. Expresión de la cadena alfa CD25 del receptor de IL-2 en PBMC tras el tratamiento con ciclótido.** Se trataron previamente las PBMC con ciclosporina A (CsA; 5  $\mu$ g/ml) o diferentes ciclótidos (4  $\mu$ M; T20K, V10A, V10K, T8K) y se cultivaron en presencia de medio (SC) o se estimularon con PHA-L (10  $\mu$ g/ml; CTRL). El día 1 (A y B) o el día 2 (C y D) después del cultivo, las células se tiñeron en la superficie con anticuerpo monoclonal anti-CD25 humano y se analizaron mediante citometría de flujo. Los resultados representativos se representaron como gráficos de puntos (A y C) y los resultados de tres experimentos independientes se presentan como la media y desviación típica (DT) de tres experimentos independientes. Los asteriscos representan diferencias significativas solo de las células estimuladas no tratadas. Los porcentajes indicados en los gráficos de puntos representan las PBMC CD25<sup>+</sup>.

**Figura 12. A. Secreción de IL-2 a partir de PBMC activadas tratadas con ciclótido.** Se trataron previamente las PBMC con ciclosporina A (CsA; 5  $\mu$ g/ml) o un ciclótido (4  $\mu$ M; T20K), y se cultivaron en presencia de medio (SC) o se estimularon con PHA-L (10  $\mu$ g/ml; CTRL). 24 horas después del cultivo, se volvieron a estimular las PBMC con PMA/Ionomicina durante 6 horas más. Después, se midió la cantidad de IL-2 en el sobrenadante usando una técnica de citometría de flujo basada en ELISA. Los datos se presentan como la media y la desviación típica (DT) de tres experimentos independientes.

**B. Liberación de IL2 en linfocitos T humanos tras el tratamiento con ciclótido.** Se sembraron linfocitos T humanos (proporcionados por A. Dohnal, PhD, de CCRI, Viena)  $4 \times 10^6$ /ml en placas de fondo plano de 96 pocillos (100  $\mu$ l/pocillo) y se incubaron durante dos horas a 37 °C antes de que se estimularan con CsA (5 mg/ml), T20K (4  $\mu$ M) and V10K (4  $\mu$ M). Tras otras dos horas, se añadió PHA-L (10  $\mu$ g/ml) a los pocillos apropiados y se incubó durante la noche a 37 °C. Al día siguiente, se volvieron a estimular los linfocitos T con Ionomicina (500 ng/ml) y PMA (50 ng/ml) durante 6 horas a 37 °C. Las células se centrifugaron luego a 3.000 rpm durante 5 minutos para obtener sus sobrenadantes. Los sobrenadantes de los linfocitos T estimulados se analizaron para determinar su liberación de IL2 usando un kit de ELISA de IL-2 humana de eBioscience de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La reacción de color se evaluó a una densidad óptica de 450 nm mediante el lector de microplacas Synergy H4 (BioTek). La estimulación con PHA-L de los linfocitos T humanos ilustró la liberación más alta de IL2, también la estimulación con V10K y PMA + Ionomicina lograron resultados comparables, mientras que las células no tratadas y tratadas con CsA no mostraron la producción de esta citocina. Además, los linfocitos T incubados con el ciclótido T20K demostraron una inhibición significativa de la proliferación celular de acuerdo con el nivel de IL2.

**C. Análisis de la expresión del gen IL-2 usando RT-PCR.** Se aisló ARN celular total de células activadas con PHA-L que se incubaron con medio, CsA o T20K durante 4 horas. La RT-PCR se llevó a cabo usando cebadores específicos para el gen indicado. Los datos se normalizaron con respecto al valor de Ct del ARNr 18s del gen constitutivo, y se usó el nivel relativo de ARNm en el grupo estimulado no tratado como calibrador. Los datos se expresaron como la media + DT de tres experimentos independientes.

**Figura 13. Capacidad de proliferación de PBMC tratadas con ciclótido en presencia de IL-2 exógena.** Se trataron previamente PBMC marcadas con CFSE con ciclosporina A (CsA; 5  $\mu$ g/ml) o diferentes ciclótidos (4  $\mu$ M; T20K, V10A, V10K, T8K) y se cultivaron en presencia de medio (SC) o se estimularon con PHA-L (10  $\mu$ g/ml; CTRL). Las células se cultivaron sin IL-2 exógena (10 U/ml) (A y B) o en presencia de IL-2 (C y D). Las células marcadas con CFSE se midieron tras un período de cultivo de 3 días mediante citometría de flujo y los datos representativos se presentan en gráficos de puntos (A y C). Los datos se presentan como la media y la desviación típica (DT) de tres experimentos independientes.

**Figura 14. Secreción de IFN- $\gamma$  por PBMC tratadas con ciclótido.** Se incubaron previamente PBMC purificadas con un ciclótido (4  $\mu$ M; T20K) o ciclosporina A (CsA; 5  $\mu$ g/ml), y se estimularon con PHA-L (10  $\mu$ g/ml). Se usaron células sin tratar como controles. Tras 24 horas o 36 horas de cultivo, se volvieron a estimular las células con

PMA/Ionomicina durante 6 horas más. Se midió la cantidad de IFN- $\gamma$  en el sobrenadante de células cultivadas usando un método de citometría de flujo basado en ELISA. Los datos se presentan como la media y la desviación típica (DT) de tres experimentos independientes.

5 **Figura 15. Secreción de TNF-alfa por PBMC tratadas con ciclótido.** Se incubaron previamente PBMC purificadas con un ciclótido (4  $\mu$ M; T20K) o ciclosporina A (CsA; 5  $\mu$ g/ml), y se estimularon con PHA-L (10  $\mu$ g/ml). Se usaron células sin tratar como controles. Tras 24 h o 36 h de cultivo, se volvieron a estimular las células con PMA/Ionomicina durante 6 horas más. Se midió la cantidad de TNF-alfa en el sobrenadante de células cultivadas usando un método de citometría de flujo basado en ELISA. Los datos se presentan como la media y la desviación  
10 típica (DT) de tres experimentos independientes.

**Figura 16. Capacidad de desgranulación de PBMC humanas activadas tratadas con ciclótido.** Se trataron previamente las PBMC con ciclosporina A (CsA; 5  $\mu$ g/ml) o un ciclótido (4  $\mu$ M; T20K), y se cultivaron en presencia de medio (SC) o se estimularon con PHA-L (10  $\mu$ g/ml; CTRL). Tras 36 horas de cultivo, se volvieron a estimular las células con PMA/Ionomicina durante 2,5 horas en presencia de anticuerpos CD107a y reactivo GolgiStop para determinar la cantidad de desgranulación mediante citometría de flujo. Los datos representativos se muestran en gráficos de puntos (A) y (B) y los datos se presentan como la media y la desviación típica (DT) de tres experimentos  
15 independientes.

20 **Figura 17. Liberación de Ca<sup>2+</sup> en células Jurkat y linfocitos T humanos.** Se cargaron  $1 \times 10^6$  células Jurkat (A) y los linfocitos T (B) con Fura-2 1  $\mu$ M y Puronic F-127 al 0,02 % durante 30 minutos a 37 °C. Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 1.200 rpm y se volvieron a suspender en medio [RPMI 1640 con FCS al 10 %, penicilina (100 U/ml) estreptomycin(100 U/ml)]. Se transfirieron 100  $\mu$ l de suspensión celular a una placa negra de 96 pocillos con un fondo plano transparente. En resumen, antes del análisis, se atemperó a 37 °C el fluorómetro Synergy H4 (BioTek). El curso del tiempo de fluorescencia se midió entonces con: extinción a 340/380 nm y emisión a 510 nm en intervalos de 30 segundos, agitando continuamente. La afluencia de Ca<sup>2+</sup> se inició al añadir  
25 compuestos a las células (ilustrado por la flecha). Para recibir la liberación máxima de Ca<sup>2+</sup>, se estimularon las células con PMA (50 ng/ml) y Ionomicina (500 ng/ml), y los linfocitos T además con PHA-L (10  $\mu$ g/ml). Para los niveles más bajos de Ca<sup>2+</sup>, las células no se trataron. La estimulación de CsA (5 mg/ml), T20K (4  $\mu$ M) y V10K (4  $\mu$ M)  
30 no indujo un cambio en la señalización de Ca<sup>2+</sup> en las células Jurkat. Por el contrario, los linfocitos T primarios humanos demuestran una liberación de Ca<sup>2+</sup> creciente tras la incubación con los ciclótidos T20K.

**Figura 18. Esquema de inmunización (véase también el Ejemplo 14)**

35 **Figura 19. Efecto en la puntuación clínica de la EAE.** Tras la inducción de la EAE, se puntuaron los ratones tratados con T20K y los ratones sin tratamiento previo cada segundo día, comenzando el día 10. El grupo no tratado previamente, que no recibió T20K, desarrolló el peor curso de la enfermedad, mientras que los ratones tratados con T20K mostraron síntomas tardíos y menores de EAE referidos al punto de tiempo de la inyección de ciclótidos. En especial, los ratones tratados siete días antes de la inducción de la EAE demuestran significativamente el efecto  
40 profiláctico del mutante kalata B1 (de acuerdo con la prueba de comparación múltiple de Dunnett).

**Figura 20. Efecto sobre el peso de ratones con EAE inducida.** Se midió el peso de los ratones inmunizados el día (-7), 0, 7 y cada día además de la puntuación. Los ratones que recibieron inyecciones de ciclótidos al día (-7) aumentaron de peso en los días siguientes. Mientras que los ratones no tratados o ratones que se trataron el día 7  
45 permanecieron constantes o incluso perdieron peso corporal de acuerdo con el curso de la enfermedad. Aproximadamente el día 20, la EAE en estos dos grupos mejoró y, por lo tanto, estos ratones recuperaron el peso corporal.

**Figura 21. Efecto sobre la liberación de citocinas de PBMC aisladas ex vivo el día 3.** Se aislaron esplenocitos de ratones sacrificados y se volvieron a estimular con MOG<sub>35-55</sub> (30  $\mu$ g/ml) durante tres días o se dejaron sin tratar. Los sobrenadantes de estas células se usaron para analizar la liberación de citocinas en los ELISA. En (A), la liberación de interleucina 2 fue mayor en los linfocitos T esplénicos aislados del grupo de ratones sin tratamiento previo que en los que se volvieron a estimular con MOG, en correlación con el curso de la enfermedad. En los ratones tratados con T20K (7), la liberación de IL2 fue menor que en el grupo sin tratamiento previo tras la  
50 estimulación con MOG. Los esplenocitos de ratones previamente tratados (T20K -7, 0) muestran una inhibición significativa de la producción de IL2 (de acuerdo con la prueba de comparación múltiple de Dunnett). Este efecto inhibitor también podría demostrarse hacia el citocinas IL17, IL22 e INF- $\gamma$  en linfocitos T de ratones tratados con T20K (-7, 0), aunque no significativamente (B-D). Casi no se detectó ninguna citocina IL4 (E), en oposición a una respuesta inmune T<sub>H2</sub>, como era de esperar.  
55

60 **Figura 22. Efecto sobre la liberación de citocinas de PBMC aisladas ex vivo en el día 1 y 2.** Se aislaron linfocitos T esplénicos del grupo de ratones no tratados previamente sacrificados, y se estimularon con T20K (4  $\mu$ M) en diferentes momentos, con MOG<sub>35-55</sub> (30  $\mu$ g/ml), y, para propósitos de control, con CsA (5  $\mu$ g/ml) y V10K (4  $\mu$ M), como se indica en el presente documento. La liberación de IL2 se inhibe significativamente tras una incubación de  
65 48 h de las células con T20K, independientemente de los diferentes puntos de tiempo de la adición de ciclótido.

incluso tras 24 h, la inhibición de IL2 no es significativa para el agente inmunosupresor CsA. También V10K muestra una capacidad inhibitoria hacia la liberación de IL2 en los linfocitos T de ratón tras 48 h de incubación (A, B). La producción de la citocina IL17 también es inhibida por T20K tras 48 h, en relación con el punto de tiempo de la adición del compuesto (C, D). Además, la liberación de citocinas INF- $\gamma$  y IL22 se suprime de manera significativa, dependiendo de la adición de ciclótido (E-H). Para aprobar este sesgo de T<sub>H</sub> de EAE hacia los linfocitos T<sub>H</sub>17 y T<sub>H</sub>1, se analizó de nuevo la liberación de IL4, pero esta citocina T<sub>H</sub>2 no fue detectable (I, J), como ya se indicó en (D).

**Figura 23. Efecto de los ciclótidos en la expresión de proteína de NFAT1c.** Se incubaron linfocitos T humanos con CsA (5  $\mu$ g/ml), T20K (4  $\mu$ M) y V10K (4  $\mu$ M) durante dos horas. Pero en lugar de estimular con PHA-L y PMA/ionomicina, se estimuló una parte de las células con PHA-L (10  $\mu$ g/ml) y la otra con PMA (50 ng/ml)/ionomicina (500 ng/ml) durante una noche. La incubación de CsA y T20K muestra una señal reducida de NFATc1 en comparación con las células estimuladas con V10K, PHA-L y PMA/ionomicina (A). los linfocitos T esplénicos aislados del grupo de ratones sin tratamiento previo se estimularon como se ha descrito anteriormente. Las células incubadas con los ciclótidos T20K demuestran una señal reducida de NFATc1 en comparación con las células incubadas con V10K y las células estimuladas con el antígeno natural MOG. Sin embargo, las células tratadas con el compuesto inmunosupresor CsA que tiene NFATc1 como una diana molecular principal, muestran una señal potente (B).

**Figura 24. Captación celular de T20K.** Se incubaron linfocitos T humanos con T20K 4  $\mu$ M marcado con FITC para realizar microscopía de fluorescencia. (A) demuestra una visión general de los linfocitos T con los ciclótidos T20K incorporados en su citosol. Parece que el péptido se encuentra principalmente alrededor de la membrana del núcleo, pero también en la membrana de los compartimentos vesiculares, como el aparato de Golgi o el retículo endoplásmico (B, C). Por el contrario, la incubación de células Jurkat (D) con el péptido marcado no mostró esta fluorescencia intracelular, en cambio, los ciclótidos solo tiñeron las células muertas.

Los ejemplos ilustran la invención.

### Ejemplo 1: Materiales y métodos

**Preparación de extracción y purificación de ciclótidos de plantas.** Se cultivaron plantas de *Oldenlandia affinis* (R & S) DC en el invernadero del Departamento de Farmacognosia (Universidad de Viena) a partir de semillas que fueron obsequio de David Craik (Instituto de Biociencias Moleculares, Universidad de Queensland). Se cosecharon las partes aéreas de las plantas y se secaron. Se pulverizó el material vegetal usando una trituradora de rotor y se extrajo dos veces durante una noche en diclorometano:metanol (1:1 v/v). Los extractos se concentraron en un rotavaporizador y se liofilizaron. Se disolvieron los extractos secos en disolvente A (ddH<sub>2</sub>O con TFA al 0,1 %) y se purificaron previamente en lote con extracción en fase sólida C<sub>18</sub> (ZEOprep 60 Å, C<sub>18</sub> irregular 40-63  $\mu$ m; ZEOCHEM, Uetikon, Suiza). Para separar los compuestos hidrófilos no ciclótidos de los compuestos hidrófobos ciclótidos, se lavaron las perlas C<sub>18</sub> con disolvente B al 10 % (acetonitrilo al 90 % en ddH<sub>2</sub>O con TFA al 0,08 %) y se eluyeron con disolvente B al 80 %. Se analizó la fracción eluida que contenía ciclótidos por MALDI-TOF-MS y se reconstituyó en ddH<sub>2</sub>O a 10 mg/ml para los ensayos biológicos o se usó para el análisis nano LC-MS/MS y la posterior purificación. Se purificó Kalata B1 del extracto en bruto de *O. affinis* mediante HPLC usando un sistema Perkin Elmer Serie 200 con columnas de HPLC RP-C<sub>18</sub> preparativa (Phenomenex Jupiter, 10  $\mu$ m, 300 Å, 250 x 21,2 mm; 8 ml/min) y semipreparativa (Kromasil C<sub>18</sub>, 5  $\mu$ m, 100 Å, 250 x 10 mm; 3 ml/min) y gradientes lineales de 0-80 % de disolvente B en 80 min. Los péptidos de elución se controlaron con absorbancia UV (A<sub>280</sub>), se recogieron manualmente y se liofilizaron. Se evaluaron la pureza y la calidad de kalata B1 mediante HPLC analítica y MALDI-TOF MS.

**Análisis de Nano LC-MS y LC-MS/MS.** Se analizaron extractos vegetales preparados o digeridos ZipTip™, en bruto, (extracto de *O. affinis* previamente purificado con C<sub>18</sub>, véase más arriba) mediante nano LC-MS o LC-MS/MS en un sistema de nano HPLC Ultimate 3000 controlado por el software Chromeleon 6.8 (Dionex, Ámsterdam, Países Bajos). Para el análisis de LC, se inyectaron muestras de extracto de *O. affinis* (1-5  $\mu$ l), se concentraron previamente usando cartuchos Dionex PepMap™ C<sub>18</sub> (300  $\mu$ m x 5 mm, 5  $\mu$ m, 100 Å) y se separaron mediante nano-RP-HPLC antes del análisis en línea de MS usando una columna Dionex Acclaim PepMap™ C<sub>18</sub> (150 mm) x 75  $\mu$ m, 3  $\mu$ m, 100Å; 300 nl/min). La fase móvil consistió en disolvente C (ácido fórmico acuoso al 0,1 %) y disolvente D (acetonitrilo/ácido fórmico acuoso al 0,08 % 90/10). Los péptidos se eluyeron usando un gradiente lineal de D al 4-90 % en 35 min, retención de 5 min a D al 90 %, seguido de un retorno a D al 4 % para un equilibrio de 20 min. Para el análisis de LC-MS/MS, se concentraron previamente alícuotas (1-10  $\mu$ l) de extractos vegetales digeridos con triptico o endo-GluC, y se separaron mediante nano LC C<sub>18</sub> como se ha descrito anteriormente, usando varios gradientes de LC de hasta 120 min de duración (por ejemplo B al 4-60 % en 100 min, B al 60-90 % en 1 min y, finalmente, una retención de 5 min en B al 90 %, seguido de un retorno a B al 4 % para un equilibrio de 10 min). Los péptidos eluidos se introdujeron directamente en la fuente de nanopulverización. Los experimentos de espectrometría de masas se realizaron en un sistema híbrido de MS/MS de cuadrupolo/trampa de iones lineal 4000 QTRAP (ABSciex, Foster City, CA, EE. UU.) que se ejecuta con el paquete de software Analyst 1.5.1. El 4000 QTRAP dotado de una fuente de nano-pulverización se operó en modo de ionización positiva. Los análisis de LC-MS para la cuantificación e identificación de ciclótidos según el peso molecular se realizaron usando la adquisición de barrido múltiple mejorada (EMS) con una velocidad de exploración de 1.000 UMA/segundo en el intervalo de masas

de 400-1400 Da. Los datos de LC-MS se analizaron mediante "reconstrucción de LC-MS" en el intervalo de PM de 2.700 a 3.500 Da y mediante el uso de varios ajustes de filtro de señal-ruido para obtener el peso molecular y la puntuación de validez de todos los máximos peptídicos. Los análisis de LC-MS/MS se realizaron usando la adquisición dependiente de la información (IDA). El protocolo de adquisición usado para proporcionar datos espectrales de masa para la búsqueda en bases de datos implicó el siguiente procedimiento: perfilado de masas del eluyente de HPLC usando EMS; los iones sobre el umbral de fondo se sometieron a examen usando el barrido de resolución mejorada (ER) para confirmar los estados de carga de los iones moleculares con carga múltiple. Los iones más abundantes y los siguientes más abundantes de cada uno de estos barridos con un estado de carga de +2 a +4 o con carga desconocida fueron sometidos a CID usando energía de colisión rodante. Se usó un barrido de iones de producto mejorado para clasificar los iones de fragmentos y presentar el espectro de los iones de producto para búsquedas posteriores en las bases de datos.

**Digestión enzimática y secuenciación de péptidos usando análisis de bases de datos.** Se prepararon ciclótidos de extracto de *O. affinis* previamente purificados con C<sub>18</sub> para la secuenciación de MS/MS como se ha descrito anteriormente (Chen, 2005, *J Biol Chem*, 280, 22395-22405; Irlanda, 2006, *Biochem J*, 400, 1-12). Se redujo el extracto, se alquiló con yodoacetamida y se digirió enzimáticamente usando tripsina o endo-GluC (Sigma-Aldrich, Austria). Los extractos de péptidos digeridos se analizaron con nano LC-MS/MS como se ha descrito anteriormente, y los datos de IDA se usaron para análisis adicionales. La búsqueda en bases de datos de los datos de LC-MS/MS se llevó a cabo usando el software ProteinPilot™ y el algoritmo Paragon con la herramienta de base de datos ERA para la identificación de ciclótidos (Colgrave, 2010, *Biopolymers*, 94, 592-601).

**Cuantificación relativa de ciclótidos usando análisis de nano LC-MS.** Se separó el extracto de *O. affinis* previamente purificado con C<sub>18</sub> mediante nano LC-MS unidimensional como se ha descrito anteriormente. Se cuantificaron los máximos de ciclótido por área relativa bajo la curva (todos los máximos se procesaron a 214 nm de absorbancia de 15 a 55 minutos) usando el asistente de cuantificación del software Chromeleon 6.8. Los máximos del cromatograma de LC se identificaron por el peso molecular y el tiempo de retención de los máximos de LC-MS correspondientes. La cuantificación se realizó en cinco experimentos de LC-MS independientes y la abundancia relativa de los ciclótidos se presenta como la media ± ETM.

**Preparación de células mononucleares de sangre periférica humanas y cultivo celular.** Se aislaron células mononucleares de sangre periférica humanas (PBMC) de la sangre de donantes adultos sanos obtenida del Centro de Transfusiones de Sangre (University Medical Center, Friburgo, Alemania). Se centrifugó la sangre venosa en un gradiente LymphoPrep™ (densidad: 1,077 g/cm<sup>3</sup>, 20 min, 500 x g, 20 °C; Progen, Heidelberg, Alemania). Tras ello, las células se lavaron dos veces con medio, y se determinaron la viabilidad celular y la concentración usando el ensayo de exclusión con azul de tripano. Las PBMC se cultivaron en medio RPMI 1640 complementado con suero fetal bovino inactivado por calor al 10 % (PAA, Coelbe, Alemania), L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina y 100 U/ml de estreptomycin (todas de Invitrogen, Karlsruhe, Alemania). Las células se cultivaron a 37 °C en una incubadora humidificada con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 %/aire al 95 %. Todos los experimentos realizados con material humano fueron aprobados por el Comité de Ética de la Universidad de Freiburg.

**Purificación alternativa de células mononucleares periféricas humanas (PBMC).** Se aislaron PBMC de muestras de sangre de adultos sanos que fueron proporcionadas por el centro de transfusiones del hospital universitario de Freiburg (Alemania). La sangre venosa se diluyó a 1:2 (v/v) con PBS y se centrifugó con un gradiente de LymphoPrep (usando 15 ml de sangre diluida y 20 ml de solución de LymphoPrep); densidad: 1,077 g/cm<sup>3</sup>, 20 min, 500 x g, 20 °C). Se transfirió la capa enriquecida en linfocitos a un nuevo recipiente, y se lavó tres veces con PBS y se centrifugó de nuevo (10 min, dos veces con 300 xg y la última vez con 800 rpm, 20 °C). Para los siguientes experimentos, las células se tiñeron con CFSE o se diluyeron con un medio de 4 x 10<sup>6</sup> células/ml. Las células se contaron en un microscopio electrónico usando tinción con azul de tripano y un hemocitómetro.

**Activación y tratamiento de PBMC.** Se estimularon células PBMC (10<sup>5</sup>) con anticuerpos monoclonales anti-CD3 humano (clon OKT3) y anti-CD28 humano (clon 28.2) (ambos de eBioscience, Frankfurt, Alemania) durante 72 horas en presencia de medio, los agentes de control camptotecina (CPT; 30 µg/ml: Tocris, Eching, Alemania) y Triton-X 100 (0,5 %; Carl Roth, Karlsruhe, Alemania) o diferentes concentraciones de extracto de *O. affinis*, melitina (PolyPeptide, Estrasburgo, Francia) o kalata B1, respectivamente. Tras el cultivo, las células se evaluaron en bioensayos como se describe en el texto.

**Activación y tratamiento alternativos de PBMC.** Tras la purificación, las PBMC se equilibraron durante 2 horas a 37 °C. Tras ello, se incubaron previamente 100 µl de PBMC (4 x 10<sup>6</sup> células/ml) en una placa de 96 pocillos durante 2 horas con CsA (ciclosporina A) o ciclótidos, se transfirieron a una placa nueva y se estimularon con 10 µg/ml de PHA-L durante 1 hora. A esto, le siguió el lavado de cada pocillo con 100 µl de PBS (centrifugación durante 5 minutos, 1.000 rpm, 20 °C) y la resuspensión de las células en 100 µl de medio para ensayos adicionales.

**Determinación de la proliferación celular y división celular.** Para el análisis de seguimiento de la proliferación celular y de la división celular, se recogieron PBMC y se lavaron dos veces en PBS frío, y se volvieron a suspender en PBS a una concentración de 5 x 10<sup>6</sup> células/ml. Las células se incubaron durante 10 minutos a 37 °C con éster

succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE; 5 µM: Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Alemania). La reacción de tinción se detuvo lavando dos veces con medio completo. Después, se analizó el progreso de la división celular usando análisis de citometría de flujo.

- 5 **Análisis alternativo de proliferación celular y división celular usando tinción con CFSE.** Se incubaron PBMC purificadas ( $5 \times 10^6$  células/ml) con 0,5 mM del colorante fluorescente CFSE (5-carboxifluorescein-diacetato-succiniléster) durante 10 minutos a 37 °C. Se detuvo la reacción usando medio, las células se lavaron una vez con medio por centrifugación (10 min, 300 x g, 20 °C) y se diluyeron con un medio de  $4 \times 10^6$  células/ml.
- 10 **Determinación de apoptosis y necrosis de PBMC usando tinción con anexina V y yoduro de propidio.** Se determinaron los niveles de apoptosis usando el kit de detección de apoptosis anexina V-FITC (eBioscience, Frankfurt, Alemania) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Tras la tinción con anexina V, se añadió una solución de yoduro de propidio (PI; eBioscience) y las células se incubaron a oscuras, seguido de un análisis de citometría de flujo para determinar la cantidad de apoptosis y necrosis. Se usaron CPT (30 µg/ml) y Triton-X 100 (0,5 %) como controles positivos para la apoptosis y la necrosis, respectivamente.
- 15

**Ratones.** Se criaron ratones C57BL/6 (10-16 semanas de vida) y se mantuvieron en las instalaciones del Servicio de Animales de la Universidad de Monash. Todos los experimentos se realizaron de acuerdo con el *código australiano de prácticas para el cuidado y uso de animales con fines científicos* (NHMRC, 1997), tras la aprobación del Comité de Ética Animal de la Universidad de Monash (Clayton/Melbourne, Australia).

20

**Inducción y evaluación clínica de la EAE.** Se inyectó por vía subcutánea en los costados un total de 200 µg del péptido encefalitogénico MOG<sub>35-55</sub> (MEVGWYRSPFSRWHLRNGK; GL Biochem, Shanghai, China) emulsionado en CFA (Sigma) complementado con 4 mg/ml de *Mycobacterium tuberculosis* (BD). A continuación, los ratones recibieron de inmediato mediante inyección por vía intravenosa 350 ng de vacuna de pertussis (List Biological Laboratories, Campbell, EE. UU.) y, de nuevo, 48 horas después (Bernard, *J Mol Med* 75, 1997, 77-88; Albouz-Abo *Eur J Biochem* 246, 1997, 59-70; Hvas *Scand J Immunol* 46, 1997, 195-203; Johns *Mol Immunol* 34, 1997, 33-38; Menon *J Neurochem* 69, 1997, 214-222). Los animales se controlaron diariamente, y se cuantificó el deterioro neurológico en una escala clínica arbitraria: 0, sin deterioro detectable; 1, cola flácida; 2, debilidad de los miembros posteriores; 3, parálisis de los miembros posteriores; 4, parálisis de los miembros posteriores y parálisis ascendente; 5, moribundo o fallecido (Liu *Nat Med* 4, 78-83 1998; Slavin *Autoimmunity* 28, 109-120 1998). Bajo la recomendación del comité de ética animal, los ratones fueron sacrificados tras alcanzar una puntuación clínica de 4.

25

30

**Anticuerpos y proteínas recombinantes.** Se purificó el anticuerpo monoclonal anti-MOG de ratón (clon 8-18C5) a partir de sobrenadantes de cultivo de hibridoma en la columna de Proteína G-Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se generó antisuero contra el péptido MOG<sub>35-55</sub> (Ichikawa *Int Immunol* 8, 1996, 1667-1674; Ichikawa *J Immunol* 157, 1996, 919-926) en conejos mediante procedimientos similares a los descritos previamente (Bernard *Clin Exp Immunol* 52, 1983, 98-106; Pedersen *J Neuroimmunol* 5, 1983, 251-259). Se produjo el dominio extracelular de MOG de ratón (restos de aminoácidos 1-117 de la proteína madura) (rMOG) en la cepa M15pREP4 de *E. coli* usando el vector de expresión pQE9 (Qiagen, Australia) para incorporar una etiqueta de histidina amino-terminal según las instrucciones del fabricante. Se cargó un lisado bacteriano clarificado que contenía rMOG en una columna Ni-NTA Superflow (Qiagen, Australia) en condiciones desnaturalizantes (Guanidina-HCl 6 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, Tris 10 mM, pH 8,0) según las instrucciones del fabricante usando un sistema de cromatografía LP BioLogic (Bio-Rad Laboratories, Australia). La proteína unida se lavó secuencialmente con Tampón A (Urea 8 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, Tris 10 mM, pH 8,0), Tampón A (a pH 6,3), Tris 10 mM pH 8/isopropanol al 60 % (para eliminar la endotoxina) y, de nuevo, con Tampón A. Se llevó a cabo el replegamiento de la proteína unida aplicando un gradiente lineal de Tampón A que contenía 2-mercaptoetanol 14 mM (100 %-0 %) frente a Tampón B (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, Tris 10 mM, pH 8,0, glutatión reducido 2 mM, glutatión oxidado 0,2 mM) (0 %-100 %). A este, le siguió un segundo gradiente lineal de Tampón B (100 %-0 %) frente a Tampón C (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, Tris 10 mM, pH 8,0) (0 %-100 %). La proteína unida se eluyó usando Tampón C que contenía imidazol 300 mM, luego se dializó extensamente frente a NaCl 50 mM/Tris 10 mM pH 8. Se estimaron la concentración de proteína y la pureza usando un ensayo Micro BCA (Bio-Rad Laboratories, Australia) y SDS-PAGE, respectivamente. Se verificó la proteína producida como rMOG mediante análisis de transferencia Western usando anticuerpos específicos para MOG nativo. Los niveles de endotoxina se determinaron usando un ensayo de lisado de amebocito *Limulus* (Associates of Cape Cod, Falmouth, MA).

35

40

45

50

55

**Vacunación con el péptido MOG.** Se emulsionaron 200 µg del péptido MOG con un volumen igual de IFA (Difco) y se inyectaron por vía subcutánea en los costados superiores (100 µl divididos por igual) tres semanas antes la exposición encefalitogénica. A esto, se siguieron dos inyecciones más a intervalos semanales (200 µg/IFA/100 µl).

60

**Histopatología y evaluación de la inflamación, la desmielinización y el daño axonal.** Al finalizar los experimentos, se anestesiaron los ratones, se recogió su sangre (para la posterior determinación de los anticuerpos) y se extrajeron cuidadosamente el cerebro y la médula espinal, antes de la inmersión en una solución de paraformaldehído al 4 % y tampón fosfato 0,1 M. Se embebieron segmentos de cerebro, cerebelo y médula espinal en parafina. Se tiñeron cortes con hematoxilina/eosina, Luxol azul rápido y Bielschowsky en busca de evidencias de

65

inflamación, desmielinización y daño axonal, respectivamente (McQualter, 2001 *J Exp Med.* 1 de octubre; 194(7), 873-82). Se realizó una evaluación histológica semicuantitativa de la inflamación y la desmielinización, y se puntuó con ocultación de la siguiente manera: 0, sin inflamación; 1, infiltrado celular solo en las zonas perivasculares y las meninges; 2, infiltrado celular leve en el parénquima; 3, infiltrado celular moderado en el parénquima; y 4, infiltrado celular grave en el parénquima (Bettadapura *J Neurochem* 70, 199, 1593-1599 8; Okuda *J Neuroimmunol* 131, 2002, 115-125).

**Determinación de anticuerpos específicos de MOG.** Se midió la actividad de los anticuerpos contra rMOG y MOG<sub>35-55</sub> en suero de ratón mediante ELISA, como se ha descrito previamente en Ichikawa *Cell Immunol* 191, 1999, 97-104). Brevemente, se recogió suero al final de los experimentos y se analizó mediante ELISA con placas recubiertas con péptido rMOG y MOG<sub>35-55</sub> (Maxisorp, Nunc).

**Proliferación de linfocitos T y producción de citocinas.** Se extrajeron los bazos de ratones sacrificados 32-46 días después de la inmunización con MOG<sub>35-55</sub>. Se dispersaron suavemente las células a través de una malla de nailon de 70  $\mu\text{m}$  (BD) en una suspensión de células individuales, se lavaron y cultivaron a  $2,5 \times 10^6$  células/ml en RPMI completo (RPMI 1640 que contenía suero de ternera fetal inactivado por calor al 10 % (Sigma), L-glutamina 2 mM, 100 U/ml de penicilina, 100  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomycin, 2-mercaptoetanol 50  $\mu\text{M}$  y piruvato sódico 1 mM). Luego, se añadieron doscientos microlitros de suspensiones celulares a placas de microtitulación de 96 pocillos, solo con MOG<sub>35-55</sub> (20  $\mu\text{g/ml}$ ) o anti-CD3 $\epsilon$  y anti-CD28 (20  $\mu\text{g/ml}$  de cada uno), y se incubaron durante 66 horas a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 %. Se añadieron microlitros de [<sup>3</sup>H]timidina (1  $\mu\text{Ci/pocillo}$ ; Amersham, Australia; diluidos 1/10 en medio) a cada pocillo durante las últimas 18 h. Las placas se recogieron en filtros de fibra de vidrio y se añadió una gota de Microscint Scintillant (Perkin Elmer) a cada pocillo. Los recuentos se leyeron usando un contador de centelleo Top Count NXT (Perkin Elmer). Los valores presentados son la media de tres pocillos. Para los ensayos de citocinas, se añadieron 2 ml de células ( $5 \times 10^6$  células/ml) de bazos aislados 32-46 días después de la inmunización a placas de 24 pocillos, ya sea solas o con MOG<sub>35-55</sub> (10  $\mu\text{g/ml}$ ) o con anti-CD3 $\epsilon$  y anti-CD28 (20  $\mu\text{g/ml}$  de cada uno). Los sobrenadantes se recogieron a las 48 y 72 h. La cuantificación del contenido de citocinas de ratón que incluían citocinas Th1, Th2, y quimiocina (IFN $\gamma$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, GM-CSF, KC, MCP-1, MIG y TNF) se determinaron simultáneamente usando un ensayo de perlas multiplexado (ajustes de Cytometric Bead Array Flex [CBA]) de acuerdo con el protocolo recomendado por el fabricante (Becton Dickinson). Se realizó la adquisición de 4.500 eventos usando un citómetro de flujo FACScanto II (Becton Dickinson, San José, EE. UU.) y el software Diva, y los datos se analizaron y se ajustaron a una ecuación logística de 4 parámetros usando el software FCAP array (Soft Flow, Pécs, Hungría). Los niveles mínimos de detección de cada citocina fueron: IFN $\gamma$ , 5,2 pg/ml; IL-2, 1,5 pg/ml; IL-3, 4,2 pg/ml; IL-4, 0,8 pg/ml; IL-5, 4,8 pg/ml; IL-6, 6,5 pg/ml; IL-9, 10,5 pg/ml; IL-10, 16,4 pg/ml; IL-12p70, 9,2 pg/ml; IL-13, 7,3 pg/ml; GM-CSF, 9,9 pg/ml; KC, 16,2 pg/ml; MCP-1, 29 pg/ml; MIG, 11,4 pg/ml y TNF, 17,1 pg/ml.

**Análisis del receptor superficial de IL-2.** Se transfirieron células activadas a una placa de 96 pocillos, se centrifugaron (5 min, 1.000 rpm, 20 °C), se lavaron una vez con 100  $\mu\text{l}$  de tampón FACS y se tiñeron con CD25 PE durante 15 min a 4 °C. Luego, se lavaron las células dos veces con tampón FCS y se volvieron a suspender en 100  $\mu\text{l}$  de tampón FACS, se transfirieron a viales de FACS con un volumen total de 250  $\mu\text{l}$ , y se midió la expresión del receptor superficial de IL2 CD25 mediante análisis FACS usando un instrumento FACSCalibur (BD Biosciences).

**Determinación de la liberación de citocina usando ELISA.** Se volvieron a suspender células activadas en 50  $\mu\text{l}$  de medio, se transfirieron a una placa de 96 pocillos y se trataron con 10  $\mu\text{g/ml}$  de PHA-L. Tras la incubación durante 24 horas, se volvieron a estimular las células con PMA (50 ng/ml) e ionomicina (500 ng/ml) durante 6 h. A continuación, se transfirieron las células a tubos Eppendorf, se centrifugaron (5 min, 3.000 RPM, 20 °C) y se transfirieron de nuevo 50  $\mu\text{l}$  del sobrenadante a tubos nuevos y se almacenaron a -20 °C. La producción de citocinas se midió y se cuantificó usando el kit FlowCytomix™ de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

**CD107a - Análisis de desgranulación.** Se cultivaron células activadas durante 36 h y luego se trataron para la repetición de la estimulación con PMA (50 ng/ml) e ionomicina (500 ng/ml), y se tiñeron con CD107a PE. Tras 1 h, la reacción se detuvo con 2  $\mu\text{l}$  de Golgi-Stop (1:10) y se incubó durante 2,5 h a 37 °C. Se transfirieron células a una placa de 96 pocillos, se centrifugaron (5 min, 1.000 RPM, 20 °C) y se lavaron con 100  $\mu\text{l}$  de tampón FACS. Después, se tiñeron las células PBMC con CD8 PE-Cy5 durante 15 minutos a 4 °C y, tras ciclos de lavado con tampón FACS, las células se volvieron a suspender en 100  $\mu\text{l}$ , se transfirieron a viales de FACS con un volumen total de 250  $\mu\text{l}$  y se midió la desgranulación mediante análisis FACS.

**Producción intracelular de IFN-gamma y TNF-alfa.** Se cultivaron células activadas durante 36 h y luego se trataron para la repetición de la estimulación con PMA (50 ng/ml), ionomicina (500 ng/ml) y brefeldina A durante 6 horas a 37 °C. Tras transferir las células a una placa de 96 pocillos, se centrifugaron (5 min, 1.000 RPM, 20 °C) y se lavaron con 100  $\mu\text{l}$  de tampón FACS. Después, se tiñeron las PBMC con CD8 PE-Cy5 durante 15 minutos a 4 °C y se lavaron nuevamente dos veces con tampón de FACS. Las células se trataron con 50  $\mu\text{l}$  de paraformaldehído al 4 % durante 10 min a 4 °C, se lavaron dos veces con 100  $\mu\text{l}$  de tampón de FACS y luego se permeabilizaron mediante incubación con 100  $\mu\text{l}$  de solución de permeabilización/lavado (1:10) durante 15 min a 4 °C. Tras la centrifugación (5 min, 1.000 rpm, 20 °C), las PBMC se incubaron con IFN-gamma PE o TNF-alfa PE,

respectivamente, durante 30 min a 4 °C. Los anticuerpos libres se lavaron con solución de permeabilización/lavado y las PBMC se volvieron a suspender en 100 µl de tampón de FACS. La producción de IFN-gamma y TNF-alfa se determinó individualmente mediante análisis FACS.

5 **Extracción de ARN total y transcripción inversa.** Se extrajo el ARN total de los controles o las células tratadas ( $2 \times 10^6$ ) congeladas a -80 °C. Se realizó la purificación del ARN de acuerdo con las instrucciones del fabricante para los kits de digestión RNeasy mini y Rnase-Free Dnase Set (Qiagen, Hilden, Alemania). La cantidad y pureza del ARN extraído se midió por espectrofotometría (Nanodrop, Peqlab, Erlangen, Alemania) y el ARN purificado se transcribió de forma inversa usando el kit RT<sup>2</sup> First Stand (Qiagen, Hilden, Alemania).

10 **PCR en tiempo real.** Se llevaron a cabo reacciones de RT-PCR en un BioRad MyiQ, Munich, Alemania) en un volumen final de 25 µl usando el ensayo de cebadores de qPCR RT<sup>2</sup> (para IL-2) y la mezcla maestra de qPCR SYBR® Green (ambos de Qiagen, Hilden, Alemania). Cada determinación se realizó por duplicado y el ARNr 18s del gen constitutivo se usó como control interno. El programa del termociclador en tiempo real consistió en una etapa inicial de desnaturalización a 95 °C durante 10 minutos, seguida de un programa de ciclos de dos etapas con 40 ciclos (95 °C, 15 s; y 60 °C, 60 s). Los resultados se expresaron como la expresión génica relativa de IL-2, y se determinaron mediante el método Ct comparativo. Los datos se normalizaron con respecto al valor de Ct del ARNr 18s del gen constitutivo, y se usó el nivel relativo de ARNm en el grupo no tratado (activado con PHA-L sin tratar) como calibrador.

20 **Análisis de datos y análisis estadístico.** Para la Figura 10, el análisis estadístico se realizó usando la prueba *t* de Student, considerados los valores de  $p < 0,05$  significativos. Todos los demás gráficos se prepararon usando el software GraphPad Prism™ y los datos se presentan como la media ± error típico (ETM). Cuando fue aplicable, los datos se analizaron estadísticamente usando el ensayo de Kruskal Wallis de ANOVA de una vía y el análisis posterior de comparación múltiple de Dunn.

25 Los gráficos y los resultados de FACS se prepararon usando el software CellQuest Pro (BD Biosciences) y se presentan como la media + DT o ETM. Todos los datos pertenecientes a los Ejemplos 8-12 se evaluaron estadísticamente mediante ANOVA y la prueba post hoc de Dunnet usando SPSS v19.0 (IBM, NY, EE.UU.).

### 30 **Ejemplo 2: Análisis químico de extracto vegetal de *Oldenlandia affinis***

Se analizó químicamente el extracto en bruto de la planta de la familia del café *Oldenlandia affinis* usando un flujo de trabajo peptidómico rápido utilizando nano-LC-MS, reconstrucción de péptido con identificación de base de datos y análisis de secuencias automático de MS/MS para determinar su contenido de ciclótido.

35 Se cultivaron plantas de *O. affinis* y se aislaron las partes aéreas de acuerdo con protocolos de laboratorio bien conocidos usando la extracción durante una noche con diclorometano y metanol, seguida de la extracción en fase sólida C<sub>18</sub> de la parte acuosa. Este procedimiento convencional comúnmente produce muchos gramos de extracto de ciclótido en bruto por kilogramo de peso de hoja de planta nueva (Gruber, 2007, *Toxicon*, 49, 561-575; Gran, 1970, *Medd Nor Farm Selsk*, 12, 173-180), mientras que el contenido de diversos ciclótidos depende de las condiciones de crecimiento (por ejemplo, del hábitat) de las plantas y otros factores ambientales (Trabi, 2004, *J Nat Prod*, 67, 806-810; Seydel, 2007, *Appl. Microb. Biotechnol.*, 77, 275-284).

45 En general, la secuenciación de aminoácidos solo es viable a partir de fracciones ciclótidas puras o semipurificadas. Por lo tanto, se usó un enfoque peptidómico alternativo para diseccionar el contenido de ciclótido de un extracto vegetal en bruto mediante la combinación de LC-MS de nanoflujo y la reconstrucción de péptidos (identificación por peso molecular), así como la digestión proteolítica, la LCMS/MS y el análisis automático de bases de datos (identificación por secuencia de aminoácidos) usando la herramienta de base de datos de ciclótidos ERA recientemente publicada (Colgrave, 2010, *Biopolymers*, 94, 592-601). El extracto de ciclótido en bruto se analizó con diversos gradientes lineales en nano LC C<sub>18</sub> de fase inversa acoplada en línea a un espectrómetro de masas híbrido triple cuadrupolar/ESI-QqLIT de ionización por electronebulización, que se operó en modo de MS mejorada con velocidades de barrido de 1.000 y 4.000 UMA/segundo, respectivamente. La aplicación de una herramienta de reconstrucción de LC-MS automática produjo inicialmente unos cuantos cientos de masas peptídicas en el intervalo de 2.700 a 3.500 Da (PM típico para ciclótidos). Es probable que el número alto represente algunos aciertos falsos positivos debido a la inclusión de datos abundantes bajos en el cálculo. De este modo, se ajustó el factor de señal a ruido en el algoritmo y normalmente se obtuvieron entre 50-100 masas peptídicas reconstruidas con puntuaciones significativas superiores a 0,99. Los datos reconstruidos de LC-MS representativos (de al menos tres experimentos independientes) se enumeran en la Tabla 4. Se identificó un total de 72 masas peptídicas en el intervalo de 2.700-3.500 Da. Al comparar esas masas peptídicas con la base de datos de ciclótidos (CyBase (Wang, 2008, *Nucleic Acids Res*, 36, D206-210)), se identificaron 23 ciclótidos conocidos de *O. affinis*, 24 masas peptídicas correspondientes a péptidos de otras especies de plantas ciclótidas y 25 nuevas masas ciclótidas (no descritas previamente). Los experimentos de LC-MS se analizaron además con la reconstrucción manual de péptidos extrayendo los iones cargados doble y triplemente de los máximos de ciclótido respectivos y calculando el peso molecular medio (datos no publicados). El análisis manual fue útil como control interno para garantizar la integridad de los datos automatizados generados.

Además del análisis de los ciclótidos de *O. affinis* por peso molecular y la comparación de las bases de datos, se realizaron varias modificaciones químicas del extracto en bruto, es decir, reducción y alquilación seguidas de proteólisis con tripsina y endo-GluC. Debido a la naturaleza estructural y a la alta estabilidad de los ciclótidos, estas modificaciones químicas son necesarias para producir iones precursores susceptibles para la secuenciación mediante MS/MS. Las mezclas modificadas y digeridas se analizaron con un flujo de trabajo peptidómico usando nano LC y secuenciación de péptidos mediante la adquisición dependiente de la información (para más detalles, véase el apartado de Métodos). Los datos resultantes de MS y MS/MS se usaron para la identificación automática de ciclótidos usando el algoritmo Paragon™ con una base de datos de ciclótidos ERA adaptada (una herramienta que está disponible gratuitamente en la web). Usando este análisis peptidómico de ciclótidos, se pudieron identificar 14 ciclótidos conocidos por secuencia de aminoácidos (véase la Tabla 5). En resumen, usando el flujo de trabajo peptidómico descrito anteriormente, se pudieron identificar casi todos los ciclótidos actualmente conocidos y un número todavía mayor de nuevas masas peptídicas correspondientes a otros ciclótidos conocidos o nuevos (por peso molecular) en extracto de ciclótido en bruto de la planta *O. affinis* (véase la Tabla 1).

La combinación de reconstrucción de nano LC-MS/MS y LC-MS, así como la búsqueda automática en bases de datos es una técnica rápida y útil para la identificación de ciclótidos en extractos en bruto. Comparado con un estudio anterior de Plan *et al.*, (Plan, 2007, *ChemBioChem*, 8, 1001-1011), que describió el primer identificador genético ciclótido de *O. affinis* usando la purificación clásica de péptidos mediante HPLC analítica y secuenciación de MS/MS fuera de línea, se han identificado 8 ciclótidos conocidos adicionales y se ha proporcionado una lista de ~50 masas peptídicas correspondientes a ciclótidos de los que algunas pueden identificarse mediante análisis de identificación genética de péptidos en CyBase (base de datos de ciclótidos (Wang, 2008, *Nucleic Acids Res*, 36, D206-210)). Esto sugiere que el número de ciclótidos que se pueden encontrar en una sola especie puede ser >70 y es, por lo tanto, al menos el doble del número anticipado previamente de (en promedio) 34 ciclótidos por especie (Gruber, 2008, *Plant Cell*, 20, 2471-2483). Esto, por supuesto, tiene un gran impacto en la determinación del número total de ciclótidos del reino vegetal y, por consiguiente, daría lugar a la necesidad de revisar el número de nuevos ciclótidos que se descubrieron en las plantas.

### Ejemplo 3: Efectos antiproliferativos del extracto de ciclótido de *O. affinis*

Una vez finalizado el análisis químico, se ensayaron diferentes concentraciones del extracto de ciclótido de *O. affinis* en bruto para determinar su capacidad antiproliferativa en PBMC primarias humanas activadas (Figura 2). Usando análisis de dispersión lateral directa basado en citometría de flujo, se demostró que el extracto muestra una reducción dependiente de la dosis (50-100 µg/ml) de PBMC proliferantes activadas en comparación con el control estimulado sin tratar (Figuras 2A y B). Simultáneamente, se observó un contenido constante de PBMC en reposo, viables, sin acumulación de células muertas, lo que demuestra que las concentraciones aplicadas del extracto de ciclótido no son perjudiciales para las células. Por encima de este intervalo de concentraciones, el extracto mostró un efecto citotóxico creciente. En esta línea, la camptotecina (CPT, 30 µg/ml), que se usó como control positivo de la proliferación inhibitoria, produjo una alta proporción de células muertas, lo que indica que el efecto antiproliferativo observado, en contraste con el extracto de ciclótido de *O. affinis*, se debía principalmente a la citotoxicidad.

Se evaluó además el impacto del preparado de ciclótido de *O. affinis* en bruto en el nivel de división celular de PBMC activadas. Para este fin, las células se marcaron con el colorante de éster succinimidílico de diacetato de carboxifluoresceína (CFSE), que no influye en la viabilidad de las células teñidas y es heredado por las células hijas tras la división celular, y cada célula en división pierde consecuentemente intensidad fluorescente. Estos datos, mostrados en las Figuras 2C y D, indican que el extracto causó una inhibición dependiente de la dosis de la división celular de las PBMC activadas, lo que confirma que el preparado de ciclótido de *O. affinis* en bruto tiene la capacidad de inhibir la proliferación de PBMC sin provocar daño celular.

### Ejemplo 4: Cuantificación relativa de ciclótidos y aislamiento de kalata B1

Como se obtuvo una actividad antiproliferativa prometedora del extracto de ciclótido total de *O. affinis*, se determinó la cantidad relativa de los ciclótidos principales, y se purificaron además los componentes principales para la caracterización biológica. Con este fin, el extracto de ciclótido en bruto se usó para el análisis cuantitativo de nano LC-MS, de manera similar a la descrita anteriormente. Se separaron alícuotas diluidas del extracto mediante nano RP-HPLC C<sub>18</sub> acoplada en línea al espectrómetro de masas. Los péptidos eluidos se controlaron tanto con absorbancia a 214 nm como en peso molecular. El área bajo la curva de los principales máximos de ciclótido de *O. affinis* se determinó por integración automática (y, en caso necesario, mediante el posterior procesamiento manual). El análisis de cuantificación relativa del contenido de ciclótido se ha llevado a cabo a partir de cinco experimentos de LC-MS independientes (véase la Tabla 6) y, en la Figura 3, se muestra un perfil de elución de *O. affinis* representativo, que indica los máximos ciclótidos principales y su abundancia relativa (media ± ETM).

Como se ha presentado anteriormente, y de acuerdo con estudios anteriores (Plan, 2007, *ChemBioChem*, 8, 1001-1011), los ciclótidos kalata B1 y kalata B2 son los principales componentes peptídicos, representando aprox. el 34 % del contenido total de ciclótidos de *O. affinis*. Kalata B1 y B2 solo difieren en cinco posiciones de aminoácidos (véase la Figura 6), concretamente en Val a Phe (bucle 2) y sustituciones conservativas de Thr a Ser (bucle 4), Ser a Thr

(bucle 5), Val a Ile (en el bucle 5) y Asn a Asp (en el bucle 6) en kalata B2. Dado que estas sustituciones no tienen consecuencias estructurales significativas ( $RMSD_{cadena\ principal\ kB1/kB2} = 0,599 \text{ \AA}$ , véase la Figura 6), y dado que los dos péptidos tienen un perfil de bioactividad similar (Gruber, 2007, *Toxicon*, 49, 561-575), se usó kalata B1 (que comprende ~14 % del extracto total) para análisis biológicos adicionales y su potencial antiproliferativo en PBMC primarias humanas activadas.

#### Ejemplo 5: Efectos antiproliferativos y citotóxicos de kalata B1

Para analizar si kalata B1 tiene la capacidad de inhibir la proliferación de PBMC primarias humanas activadas, se marcaron las células con el colorante fluorescente CFSE y se analizaron las propiedades de división celular en presencia de las concentraciones de kalata B1 en el intervalo de 1,8 a 14 mM usando citometría de flujo. Tras la exposición de PBMC a kalata B1, se observó una disminución dependiente de la dosis de la capacidad de división celular, en comparación con los controles de PBMC estimulados no tratados, como se muestra en la Figura 4. La concentración inhibitoria  $CI_{50}$  para el efecto antiproliferativo de kalata B1 fue de  $3,9 \pm 0,5 \mu\text{M}$  (Figura 7), que se compara con otros efectos de kalata B1, tal como el nematocida (Huang, 2010, *J Biol Chem*, 285, 10797-10805) y actividades citotóxicas (Svangard, 2004, *J Nat Prod*, 67, 144-147; Lindholm, 2002, *Mol Cancer Ther*, 1, 365-369; Daly, 2004, *FEBS Lett*, 574, 69-72) como se resume en la Tabla 3.

Para analizar si el efecto antiproliferativo se debía al daño celular, se examinó la influencia de Kalata B1 sobre la inducción de la apoptosis o necrosis de PBMC (Figura 5). Se midieron los marcadores apoptóticos y necróticos celulares mediante el ensayo de la fragmentación de ADN internucleosómico (células  $subG1^+$ ) y el análisis superficial de fosfatidilserina a través de la tinción con anexina V única y combinatoria y la tinción con yoduro de propidio. Este doble proceso de tinción permitió la diferenciación entre células viables (anexina<sup>-</sup>/PI<sup>-</sup>), apoptóticas (anexina<sup>+</sup>/PI<sup>-</sup> y anexina<sup>+</sup>/PI<sup>+</sup>) o necróticas (anexina<sup>-</sup>/PI<sup>+</sup>). Los datos mostrados en la Figura 5 A a C demuestran que kalata B1 no tuvo una influencia significativa en la inducción de la apoptosis. La necrosis se aumentó ligeramente a una concentración más alta (14  $\mu\text{M}$ ) de kalata B1, en comparación con un control sin tratar (Figura 5D). Los controles positivos para la apoptosis y la necrosis, CPT (30  $\mu\text{g/ml}$ ) y detergente (Triton-X 100), respectivamente, aumentaron significativamente las fracciones de estas células.

La actividad antiproliferativa de kalata B1 desencadenó experimentos de validación y control para determinar la naturaleza del efecto observado. El análisis de dispersión lateral directa basado en citometría (datos no mostrados) proporcionó pruebas sólidas de que el efecto antiproliferativo inducido por el ciclótido no causa la muerte celular ni por apoptosis ni por necrosis, sino que inhibe el crecimiento de los linfocitos de forma citostática. Las concentraciones superiores a 14  $\mu\text{M}$  del péptido son citotóxicas para las células (datos no mostrados). Esto era de esperar ya que, recientemente, se ha informado que el ciclótido kalata B1 causa hemólisis y la alteración de la membrana a concentraciones superiores a ~50  $\mu\text{M}$  (Barry, 2003, *Biochemistry*, 42, 6688-6695; Henriques, 2011, *J Biol Chem*, 286, 24231-24241). Por lo tanto, se realizaron experimentos de control con el componente de veneno de abeja melitina, un potente agente peptídico que rompe la membrana comúnmente usado.

Se analizaron las concentraciones a las que se describieron los efectos citotóxicos sobre los linfocitos humanos, para garantizar que la configuración experimental de los presentes inventores fuera lo suficientemente sensible como para detectar los posibles efectos citotóxicos de kalata B1 (Pratt, 2005, *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 41, 349-355) (véase la Figura 8). Los datos revelaron que, en contraste con Kalata B1, la melitina causó una reducción de las PBMC proliferantes a 1,6  $\mu\text{M}$  (Figura 8A), pero este efecto se debía principalmente a la inducción de la apoptosis, según lo indicado por los resultados del análisis de la fragmentación de ADN internucleosómico (Figura 8B) y por la inducción de células apoptóticas específicas a estas concentraciones (Figura 8C). Además, hubo un ligero efecto sobre la inducción de la necrosis a altas concentraciones de melitina (Figura 8D).

A partir de estos datos de control, se concluyó que kalata B1, a diferencia de la melitina, tiene una capacidad antiproliferativa, que no se debe a los efectos citotóxicos ni a la capacidad de lisis de la membrana de kalata B1, ya que, de otro modo, cabría esperar observaciones similares del péptido citotóxico melitina mucho más potente. La prueba de los efectos antiproliferativos al mantener las células en un estado "inactivo" en el que todavía son viables, pero no pueden crecer ni proliferar sin causar la muerte celular en un cierto intervalo de dosis, es una condición previa crucial para clasificar una sustancia como inmunosupresora, porque la citotoxicidad causaría efectos secundarios.

#### Ejemplo 6: Prueba de mutantes/variantes de ciclótidos en ensayos antiproliferativos en células PBMC y linfocitos T aislados

El efecto antiproliferativo de los mutantes/variantes de ciclótido se probó de acuerdo con el Ejemplo 5. En resumen, se estimularon PBMC marcadas con CFSE, o linfocitos  $CD3^+$  purificados magnéticamente con anticuerpos monoclonales anti- $CD3/28$ , en presencia de medio (ctrl), camptotecina (CPT, 30  $\mu\text{g/ml}$ ), ciclosporina A (CsA, 1  $\mu\text{g/ml}$ ) o diferentes concentraciones de ciclótidos (1,8-14  $\mu\text{M}$ ) durante 72 h. Posteriormente, se evaluó la proliferación celular mediante el análisis de la división celular usando el análisis de histograma basado en citometría de flujo. Se han probado los siguientes péptidos (1,8-14  $\mu\text{M}$ ) tanto en PBMC como en linfocitos T purificados con  $CD3$  ( $n \geq 2$ ):

# ES 2 677 895 T3

Kalata B1:	GLPVCGETCVGGTCNTPGCTCSWPVCTRN
Kalata B2:	GLPVCGETCFGGGTCNTPGCSTWPICTRD
D-kalataB2: all-D	GLPVCGETCFGGGTCNTPGCSTWPICTRD
Kalata T8K:	GLPVCGEKCVGGTCNTPGCTCSWPVCTRN
Kalata V10A:	GLPVCGETCAGGTCNTPGCTCSWPVCTRN
Kalata V10K:	GLPVCGETCKGGTCNTPGCTCSWPVCTRN
Kalata G18K:	GLPVCGETCVGGTCNTPKCTCSWPVCTRN
Kalata N29K:	GLPVCGETCVGGTCNTPGCTCSWPVCTRK
Kalata T20K, G1K:	KLPVCGETCVGGTCNTPGCKCSWPVCTRN
Kalata T20K:	GLPVCGETCVGGTCNTPGCKCSWPVCTRN

Los valores de  $CI_{50}$  correspondientes se pueden encontrar en la Tabla 2:

**Tabla 2. Comparación de los efectos inhibidores de kalata B1 (y otros ciclótidos) sobre PBMC y proliferación de los linfocitos T purificados con CD3.**

5

Péptido	$CI_{50}$ ( $\mu M$ ) $\pm$ DT	Actividad relativa en otros ensayos (Diferencia con kB1) nematocida   hemolítica insecticida		
<i>PBMC</i>				
Kalata B1	2,9 $\pm$ 1,3 <sup>a</sup>	1,0	0,7	1,0
Kalata B2	0,2 $\pm$ 0,1 <sup>c</sup>	-	-	-
all-D kalata B2	2,3 $\pm$ 0,8 <sup>c</sup>	-	-	-
Kalata B1 T8K	no activo (n.a.) <sup>b</sup>	< 0,2	T8A: 0,1	0,2
V10A	n.a. <sup>b</sup>	-	0,5	1,1
V10K	n.a. <sup>b</sup>	< 0,2	-	-
G18K	4,4 $\pm$ 0,5 <sup>b</sup>	2,4	G18A: 0,6	1,2
N29K	3,2 $\pm$ 0,6 <sup>b</sup>	7,0/3,8	N29A: 0,5	1,0
T20K, G1K	1,9 $\pm$ 0,1 <sup>*b</sup> (citotóxico)	6,5/6,8	-	-
T20K	1,9 $\pm$ 0,6 <sup>c</sup>	3,0/2,6	-	-
MCo59	n.a. <sup>b</sup>	-	-	-
MCo-CC1	n.a. <sup>b</sup>	-	-	-
MCO-CC2	n.a. <sup>b</sup>	-	-	-
<i>Linfocitos purificados con CD3</i>				
Kalata B1	2,4 $\pm$ 0,5 <sup>d</sup>	-	-	-
Kalata B2	0,6 $\pm$ 0,02 <sup>d</sup>	-	-	-
all-D kalata B2	2,9 $\pm$ 0,4 <sup>d</sup>	-	-	-
G18K	3,2 $\pm$ 1,8 <sup>c</sup>	-	-	-
N29K	2,1 $\pm$ 0,9 <sup>c</sup>	-	-	-
T20K, G1K	1,1 $\pm$ 0,7 <sup>c</sup> (citotóxico)	-	-	-
T20K	2,7 $\pm$ 0,6 <sup>d</sup>	-	-	-

\*Este compuesto es citotóxico a 14  $\mu M$ ; Todos los datos se han normalizado y analizado con regresión no lineal (pendiente fija) usando Graph Pad, a: n = 7, b: n = 4, c: n = 3, d: n=2; los péptidos distintos de kalata B1 han sido suministrados por David Craik (Instituto de Biociencia Molecular, Australia).

10 **Ejemplo 7. Actividad *in vivo* en el modelo de ratón con EAE de EM**

Se ensayó la actividad *in vivo* de los ciclótidos en el modelo de ratón con EAE de EM, como se ha descrito previamente (Okuda *J Interferon Cytokine Res* 18, 1998, 415-421). Se examinó la capacidad de los ratones para recuperarse del déficit motor tras desarrollar una forma progresiva crónica de EAE vacunando a los ratones con kalata B1. Se usó el modelo de enfermedad similar a EM MOG en ratones C57BL/6 (Bernard *J Mol Med* 75, 1997, 77-88), en el que se vacunaron ratones adultos hembra C57BL/6 (10-12 semanas) con tres inyecciones subcutáneas (s.c.) sucesivas de ciclótidos (200 mg cada vez) en adyuvante de Freund incompleto (IFA) a intervalos semanales antes de inducir la EAE con MOG<sub>35-55</sub>. Los ratones de control se trataron de manera similar, pero recibieron PBS en IFA. Los animales se evaluaron diariamente para detectar signos clínicos de EAE durante un período de 43 días.

15 La vacunación con kalata B1 produjo una reducción en la incidencia y gravedad de la EAE (Figuras 10A). Los ratones tratados con kalata B1 mostraron signos clínicos significativamente más leves (puntuación acumulativa media de 42,2  $\pm$  13,0;  $p < 0,01$ ) en comparación con el grupo de control de PBS (puntuación acumulativa: 96,6  $\pm$  7,1; duración de la enfermedad: 29,1  $\pm$  0,9).

20 Se examinó la influencia de la vacunación con kalata B1 en la formación de lesiones inflamatorias y desmielinizantes del SNC mediante estudios histológicos de tejido fijado usando tinción con hemotoxilina/eosina, Luxol azul rápido y plata Bielshowsky. El SNC de todos los ratones tratados con PBS mostró lesiones inflamatorias extendidas, caracterizadas por células inflamatorias mononucleares, que eran particularmente llamativas en el cerebelo y la médula espinal (Figura 10B). La tinción con LFB y plata Bielshowsky reveló una notable pérdida de mielina y una

25 grave lesión axonal, respectivamente, particularmente alrededor del tejido lesionado en las tres regiones del SNC examinadas. Los ratones tratados con Kalata B1 mostraron alguna mejoría en la gravedad de la enfermedad según

30

se juzgó por la reducción de las lesiones histológicas de EAE (Figura 10B).

La capacidad de las células del bazo para proliferar en respuesta al gen de la encefalitis MOG<sub>35-55</sub> para determinar si el efecto supresor sobre la EAE tras la vacunación con kalata B1 se asoció con una reducción de las respuestas de linfocitos T específicas de MOG. Además, para abordar si esta supresión de la EAE era específica del antígeno y/o el resultado de un defecto en la activación o función de los linfocitos T, se estimuló la misma población de esplenocitos por los activadores policlonales, anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. La Figura 10C muestra que, independientemente del régimen de tratamiento, los esplenocitos de todos los ratones vacunados proliferaron a MOG con índices de estimulación (IE) de  $2,9 \pm 0,4$  y  $2,7 \pm 0,5$  para los grupos tratados con kalata B1 y PBS, respectivamente. Estos esplenocitos mostraron fuertes respuestas proliferativas a los anticuerpos anti-CD3/CD28 con IE que variaron de 17 a 47.

Se examinó si la supresión de la EAE en ratones vacunados con kalata B1 se asoció con una disminución en la producción de anticuerpos específicos contra MOG. Por consiguiente, se recogieron sueros de los ratones tratados con kalata B1 y PBS al finalizar el experimento (día 43) y se analizaron en cuanto a su reactividad hacia MOG<sub>35-55</sub>. Como se indica en la Figura 10D, se detectaron anticuerpos anti-MOG en todos los sueros independientemente del régimen de vacunación.

Está bien establecido que el desarrollo de EAE está asociado con la secreción de citocinas proinflamatorias por linfocitos T específicos de los antígenos del SNC (Owens *Curr Opin Neurol* 16, 2003, 259-265). Dado que la supresión de la EAE tras la vacunación con kalata B1 no se asoció con una disminución de la reactividad de los linfocitos T hacia MOG, se investigó si los linfocitos T reactivos con MOG en animales protegidos pueden haber cambiado a un fenotipo de linfocitos T antiinflamatorios. Por consiguiente, se evaluaron los medios acondicionados generados a partir de cultivos de células de bazo estimulados *in vitro* y no estimulados en ensayos de matriz de perlas de citocinas. Se analizó un total de 15 citocinas simultáneamente, que incluyeron, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL9, IL10, IL12p70, IL13, IFN $\gamma$ , GM-CSF, KC, MCP1, MIG y TNF $\alpha$ . No hubo cambios marcados en el contenido de citocinas en los sobrenadantes estimulados con MOG<sub>35-55</sub> o CD3/38 entre los grupos de animales tratados con ciclótido y de control (datos no mostrados). Por el contrario, se demostraron niveles significativamente reducidos de quimiocina MIG, conocida por desempeñar un papel en el tráfico de linfocitos T, y de TNF $\alpha$ , una citocina proinflamatoria conocida por su participación en la patogénesis de la EAE (Nicholson, *Curr Opin Immunol* 8, 1996, 837-842) en sobrenadantes de células de bazo no estimuladas generados a partir de animales tratados con kalata B1 (Figuras 10E y 10F). Basándose en este perfil de citocinas, se puede deducir que la vacunación con ciclótido, conduce a la producción de una respuesta T antiinflamatoria.

#### 35 **Ejemplo 8. Influencia/efecto de diversos ciclótidos sobre la expresión de la cadena alfa CD25 de IL-2.**

Entre otras rutas, la proliferación de los linfocitos T se determina mediante la unión de la citocina IL-2 a su receptor de superficie celular. Por lo tanto, se probó la influencia de los ciclótidos en la expresión del receptor de IL-2. Los compuestos de ensayo fueron T20K, V10A, V10K y T8K y, por tanto, las PBMC se trataron con estos ciclótidos, tras la estimulación con PHA-L para determinar la expresión de los receptores de superficie de IL-2 CD25 tras 24 y 48 horas de cultivo, respectivamente, usando análisis FACS (Fig. 11). Como sustancia de control, se usó CsA. El tratamiento de las PBMC con CsA conduce a una reducción de la expresión superficial de CD25, y produce un  $76 \% \pm 10,7$  tras 24 horas, y el tratamiento con T20K produce un  $79 \% \pm 10,1$  en comparación con células no tratadas, es decir, PBMC estimuladas (CTRL, 100 %) (Fig. 11B). El tratamiento con V10A produce un  $114 \% \pm 12,5$ , V10K produce un  $112 \% \pm 16,3$  y T8K produce un  $114 \% \pm 17,3$  de expresión superficial de CD25 tras 24 h en comparación con el control (Fig. 11B). Esta tendencia continúa tras 48 h, es decir, la expresión de CD25 se reduce aún más mediante el tratamiento con CsA ( $62 \% \pm 7,3$ ) y T20K ( $46 \% \pm 18,2$ ), mientras que el tratamiento con V10A, V10K y T8K no conduce a cambios significativos en la expresión del receptor (Fig. 11C y D). En resumen, el tratamiento con CsA ( $p \leq 0,01$ ) y el ciclótido T20K ( $p \leq 0,001$ ) conduce a una reducción significativa de la expresión de CD25, mientras que los ciclótidos V10A, V10K y T8K no influyen en el nivel de expresión del receptor CD25.

#### 50 **Ejemplo 9. Influencia de los ciclótidos sobre la liberación de IL-2 y la expresión génica.**

Para analizar el mecanismo de la antiproliferación de linfocitos T mediada por ciclótidos, se determinó su efecto sobre la liberación directa de IL-2 en células PBMC. Las células se trataron con un ciclótido y se activaron con PHA-L. Tras 24 h, se volvieron a estimular las células con PMA e ionomicina y se midió la concentración de IL-2 en el sobrenadante (IL-2 liberada) con una metodología de FACS basada en ELISA (Fig. 12A). La liberación de IL-2 fue significativamente ( $p \leq 0,01$ ) reducida por el tratamiento con CsA ( $18 \% \pm 15,7$ ) y T20K ( $24 \% \pm 18,6$ ) en comparación con las células de control. El ciclótido V10K no tuvo efecto sobre la liberación de IL-2 (datos no mostrados).

Es más, los sobrenadantes de los linfocitos T estimulados se analizaron para determinar su liberación de IL2 usando un kit de ELISA de IL-2 humana de eBioscience de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La reacción de color se evaluó a una densidad óptica de 450 nm por el lector de microplacas Synergy H4 (BioTek) (Fig. 12B).

Para determinar si los ciclótidos tienen un impacto en la expresión génica, se examinó el nivel de expresión del gen *il-2* (como control, se usó *ARNr 18s*) en células PBMC mediante PCR cuantitativa en tiempo real (Fig. 12C). El ciclótido T20K disminuye claramente el nivel de ARNm de IL-2 en contraste con el control, por lo que, como control de inhibición positivo, se usó ciclosporina A.

5

#### **Ejemplo 10. Influencia de la adición de IL-2 exógena a PBMC tratadas con ciclótido**

Para determinar la validez de la reducción significativa de la liberación de IL-2 tras el tratamiento con ciclótido, se probó la influencia de la adición exógena de IL-2 tras el tratamiento. Si la síntesis de IL-2 se reduce mediante el tratamiento con CsA y ciclótidos, cabría esperar que este efecto pueda revertirse mediante la adición exógena de IL-2 a las células tratadas. Por lo tanto, se trataron PBMC con ciclótidos y CsA, y las células se activaron con PHA-L. En paralelo, se cultivaron las células con la adición de IL-2 exógena (Fig. 13). El pretratamiento de PBMC con CsA y ciclótido T20K conduce a un efecto antiproliferativo ( $13\% \pm 17,6$  y  $29\% \pm 24$ , respectivamente) en comparación con las células de control (Fig. 13A y B), mientras que el tratamiento con los ciclótidos V10A, V10K y T8K no tiene ningún efecto sobre la proliferación. Al añadir IL-2 exógena, fue posible revertir el efecto antiproliferativo de CsA en parte ( $54\% \pm 19,3$ ) y de T20K casi por completo ( $91\% \pm 1,4$ ) (Fig. 13C y D). La adición de IL-2 a las PBMC tratadas con V10A, V10K o T8K no modificó el efecto sobre la proliferación (Fig. 13).

10

15

#### **Ejemplo 11. Influencia de los ciclótidos en la producción de IFN-gamma o TNF-alfa**

20

A partir de los resultados obtenidos hasta ahora, es evidente que el tratamiento de PBMC activadas con CsA o ciclótido T20K influye en la expresión del receptor de superficie de IL-2 CD25 (figura 11), así como en la secreción de IL-2 (Fig. 12). Además, el efecto antiproliferativo de T20K en las PBMC puede antagonizarse mediante la adición de IL-2 exógena (Fig. 13). Por lo tanto, es de interés determinar si los ciclótidos solo tienen efectos antiproliferativos o también afectan a la función efectora de los linfocitos T, o que se relacionaría directamente con los cambios en la producción de IFN-gamma y TNF-alfa. Por lo tanto, se probó la producción de ambas citocinas de PBMC activadas tratadas con ciclótido en un punto de tiempo temprano tras la activación de las PBMC. Se trataron previamente las PBMC con CsA o ciclótidos, seguido de la activación con PHA-L. Tras 24 h, se volvieron a estimular las células durante 6 h con PMA e ionomicina y, después, se midieron las concentraciones de IFN-gamma (Fig. 14) y TNF-alfa (Fig. 15) en el sobrenadante celular usando un método de FACS basado en ELISA. La concentración de IFN-gamma de las células tratadas con CsA se redujo a  $14\% \pm 3,4$  en comparación con el control, y también el tratamiento con ciclótido T20K produjo una reducción de IFN-gamma ( $21\% \pm 13,2$ ). En resumen, la producción de IFN-gamma tras 24 h fue reducida significativamente por CsA ( $p \leq 0,01$ ) y T20K ( $p \leq 0,001$ ) (Fig. 14), pero no por V10K (datos no mostrados).

25

30

35

CsA ( $23\% \pm 1,8$ ) y T20K ( $23\% \pm 10,6$ ) también condujeron a una expresión de TNF-alfa reducida significativa ( $p \leq 0,001$ ) en comparación con el control (Fig. 15). Para evaluar si la función efectora de los linfocitos T sigue comprometida tras el tratamiento con T20K, se midió la liberación de IFN-gamma y de TNF-alfa en un punto de tiempo posterior, es decir, 36 horas después de la estimulación. Las células tratadas con CsA experimentaron una reducción significativa ( $p \leq 0,01$ ) en la producción de IFN-gamma del  $23\% \pm 2$  en comparación con el control (Fig. 14), mientras que todos los ciclótidos (T20K, V10A, V10K, T8K) no indujeron cambios significativos en el nivel de IFN-gamma (Fig. 14). La producción de TNF-alfa se redujo significativamente ( $p \leq 0,001$ ) tras el tratamiento con CsA ( $20\% \pm 14,4$ ), mientras que todas las células tratadas con ciclótido no dieron lugar a ningún cambio en el nivel de TNF-alfa (Fig. 15). Por lo tanto, es evidente que el tratamiento con ciclótido T20K conduce a una reducción inicial de la función efectora, como lo indica la producción reducida de IFN-gamma y TNF-alfa, pero el nivel de ambas citocinas se estabiliza con el tiempo. Esto indica además que T20K y CsA tienen un mecanismo de acción diferente.

40

45

#### **Ejemplo 12. Influencia de los ciclótidos en la actividad de desgranulación de PBMC activadas**

Tras determinar la influencia del tratamiento con ciclótido sobre la función efectora de las PBMC basándose en la medición de los niveles de citocinas IFN-gamma y TNF-alfa, es de interés determinar un efecto de los ciclótidos sobre la actividad de desgranulación. La activación de los linfocitos CD8<sup>+</sup> citotóxicos conduce a una liberación de gránulos citolíticos, que contienen/expresan la proteína 1 de la membrana asociada a los lisosomas (CD107; LAMP-1). Durante la desgranulación, las membranas de las vesículas granulares se fusionan con las membranas de los linfocitos CD8<sup>+</sup> activados y, por lo tanto, LAMP-1 puede usarse como una proteína marcadora para la actividad citotóxica de los linfocitos T, que puede medirse con FACS. Tras 36 h, el  $42\% \pm 21,4$  de las células tratadas con CsA y el  $49\% \pm 16,8$  de las células tratadas con T20K contienen el marcador de desgranulación LAMP-1 en comparación con el control (Fig. 16). Esto puede interpretarse en la forma en que las células tratadas con CsA y T20K tienen una citotoxicidad reducida. Los ciclótidos V10K y T8K no tuvieron influencia en la actividad de desgranulación de las PBMC activadas (datos no mostrados).

50

55

60

#### **Ejemplo 13. Liberación de Ca<sup>2+</sup> de células Jurkat**

Los linfocitos T de las células Jurkat se trataron como se describe para la Figura 17, *supra*. Para las células Jurkat, la estimulación con CsA (5 mg/ml), T20K (4  $\mu$ M) and V10K (4  $\mu$ M) no indujo un cambio en la señalización de Ca<sup>2+</sup> en las células Jurkat. Dado que ni CsA ni los ciclótidos conducen a ningún cambio en la señalización de Ca<sup>2+</sup>, es

65

evidente que cualquiera de los compuestos actuará secuencia abajo de la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  y, por lo tanto, esto indica un mecanismo inmunosupresor similar de los ciclótidos en comparación con la CsA en estas células. Por el contrario, los linfocitos T primarios humanos demuestran una liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  creciente tras la incubación con el ciclótido T20K y, por lo tanto, el mecanismo de acción puede depender del tipo de célula.

5

#### **Ejemplo 14. Efecto de los ciclótidos en ratones C57BU6J**

##### **Materiales**

10 Se adquirieron ratones C57BL/6J hembra de siete semanas de vida del Departamento de Zoología y Genética (Himberg, Austria). Todos los experimentos fueron aprobados de acuerdo con las normas de la Comunidad Europea de cuidado de animales con el permiso del Ministerio de Ciencia de Austria. T20K y V10K fueron proporcionados por D. J. Craik, de la Universidad de Queensland, Instituto de Biociencia Molecular (Brisbane, Australia). La 5-carboxifluoresceína-N-hidroxisuccinimida se adquirió en Sigma-Aldrich (Viena, Austria).

15

##### **Inmunización**

Se trataron ratones ( $n = 10/\text{grupo}$ ) el día (-7), 0, 7 con 200  $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$ /ratón de T20K solubilizados en PBS estéril por vía intraperitoneal (i.p.), como se indica en la figura. El día 0, se inmunizaron por vía subcutánea con glicoproteína de oligodendrocitos de mielina (MOG<sub>35-55</sub>, 1 mg/ml), y el adyuvante completo de Freud (CFA, 10 mg/ml) se mezcló a partes iguales. Por lo tanto, se inyectaron 70  $\mu\text{l}$  en el costado izquierdo y derecho. Además, los ratones recibieron 100  $\mu\text{l}$  de toxina de pertussis (2  $\mu\text{l}/\text{ml}$ ) i. p. el día 0 y nuevamente el día 2. Comenzando el día 10, los ratones se puntuaron cada dos días. El peso también se midió el día (-7), 0, 7, y el mismo día durante la puntuación. Los ratones se sacrificaron el día 24 tras alcanzar puntuaciones altas.

25

##### **Aislamiento y estimulación de esplenocitos**

Se extrajeron los bazos de ratones sacrificados y se transfirieron a una placa Petri de 6 cm con 5 ml de PBS estéril. Para recibir una suspensión de esplenocitos, se enmallaron los bazos y se filtraron a través de un tamiz de nailon de 70  $\mu\text{m}$ . Las células se centrifugaron a 1.200 rpm durante 5 minutos y se volvieron a suspender en medio RPMI 1640 complementado con suero de ternera fetal al 10 % (FCS), L-glutamina 2 mM, penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ). Los esplenocitos se cultivaron a una concentración de  $3 \times 10^6/\text{ml}$  en una placa de fondo plano de 48 pocillos (500  $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ ). Las células se estimularon con 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de MOG<sub>35-55</sub> o se dejaron sin tratar y se incubaron a 37 °C durante tres días. Los sobrenadantes y las células se almacenaron a -20 °C hasta nuevos experimentos. Las células aisladas del grupo de ratones sin tratamiento previo se cultivaron además en una placa de 96 pocillos de fondo plano (100  $\mu\text{l}/\text{pocillo}$ ) y se estimularon con T20K (4  $\mu\text{M}$ ), T20K + MOG, T20K (12 h), V10K (4  $\mu\text{M}$ , 12 h), CsA (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; 12 h), MOG (12 h) o se dejaron sin tratar. Tras 12 horas, se añadió MOG o T20K a los pocillos apropiados. Los sobrenadantes se almacenaron tras 24 horas y tras 48 horas a -20 °C.

40

##### **Ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzima**

Se analizaron los sobrenadantes de esplenocitos estimulados para determinar su liberación de citocinas IL2, IL17, INF $\gamma$ , IL4 e IL22 usando anticuerpos anti-ratón para ELISA de eBioscience de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La reacción de color se evaluó a una densidad óptica de 450 nm mediante el lector de microplacas Synergy H4 (BioTek).

45

##### **SDS-PAGE y transferencia Western para NFAT1c**

Se estimularon los linfocitos T humanos proporcionadas por CCRI de A. Dohnal, PhD de acuerdo con el protocolo para la liberación de IL2 descrito anteriormente. Se volvieron a suspender los linfocitos estimulados en TBS y se mezclaron a partes iguales con tampón de muestra y se calentaron durante cinco minutos a 95 °C. Se preparó un gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio para separar las proteínas obtenidas de los linfocitos T lisados. Tras la electroforesis, las proteínas se transfirieron desde el gel a una membrana. Tras bloquear la membrana con BSA al 3 % en TBST durante una noche a 4 °C, el primer anticuerpo anti-NFATc1 de ratón se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. Tras cinco lavados con TBST y Tween al 0,1 %, la membrana se incubó con el segundo anticuerpo anti-HRP IgG de ratón durante una hora a temperatura ambiente. La membrana se secó y se trató con Solución West Pico o West Femto Super Signal de acuerdo con el protocolo del fabricante para evaluar la señal de quimioluminiscencia.

60

##### **Ejemplo 15. Permeabilidad celular de los ciclótidos T20K (marcaje químico y microscopía)**

Se disolvieron 1,5 mg de T20K en 1,5 ml de tampón de carbonato de sodio 100 mM de pH 8,8. Se añadió éster de 5-carboxifluoresceína-N-hidroxisuccinimida (5-CFSE) en un exceso de 10 veces como compuesto sólido (2,5 mg). Se dejó que la reacción prosiguiera durante 120 min a temperatura ambiente. Después, la mezcla de reacción se calentó a 50 °C durante 30 minutos para completar la hidrólisis del éster de N-hidroxisuccinimida (NHS). La

65

purificación se realizó usando cromatografía semipreparativa, aplicando una columna Kromasil RP 250 x 10 de DI, 5  $\mu\text{m}$  100 Å. El eluyente A fue ddH<sub>2</sub>O/TFA al 99,9/0,1 % (v/v), el eluyente B fue AcN/H<sub>2</sub>O/TFA al 90/10/0,08 % (v/v/v). Se usó el gradiente lineal desde eluyente B al 5 % hasta eluyente B al 80 % en 50 min. El análisis Maldi-TOF-MS de las fracciones recogidas arrojó una masa de 3.276,3 Da en una de las fracciones. El máximo de masa de 3.276,3 Da se identificó como las especies mono-derivatizadas de T20K con 5-carboxifluoresceína con un desplazamiento de masa de 357 Da. Se incubaron linfocitos T humanos y células Jurkat con una solución 4  $\mu\text{M}$  del derivado de T20K en medio RPMI 1640 suplementado con los aditivos descritos anteriormente durante 20 minutos. El microscopio de fluorescencia era del microscopio confocal Zeiss LSM 510. La longitud de excitación fue de 488 nm y la longitud de onda de emisión fue de 520 nm.

### Ejemplo 16.

La presente invención se refiere a las siguientes tablas suplementarias:

15 **Tabla 1. Ciclotidos del extracto de *O. affinis* identificados por nano LC-MS y MS/MS**

Ciclotido <sup>1</sup>	PM (media) Da <sup>2</sup>	PM (mono.) Da <sup>2</sup>	Puntuación <sup>3</sup>	Evidencia <sup>4</sup>	PM teórico Da <sup>5</sup>	$\Delta$ PM Da <sup>6</sup>
kalata B1	2892,85	2890,39	1	ICP	2892,33	0,52
kalata B2	2956,14	2953,74	1	ICS	2955,38	0,76
kalata B3	3083,31	3080,64	1	ICS	3082,48	0,83
kalata B4	2893,24	2890,56	1	IS	2893,31	0,07
kalata B5	-	-	-	P	3061,59	-
kalata B6	3029,96	3027,66	0,9999	IS	3029,42	0,54
kalata B7	3072,26	3069,74	0,9998	IS	3071,59	0,67
kalata B8	3284,34	3281,75	1	ICS	3283,79	0,55
kalata B9	-	-	-	P	3272,72	-
kalata B9 lin	-	-	-	P	3290,74	-
kalata B10	3030,21	3027,53	1	ICS	3030,41	0,20
kalata B10 lin	3048,54	3046,50	1	ICS	3048,43	0,11
kalata B11	2884,48	2881,44	0,9999	I	2884,26	0,22
kalata B12	-	-	-	P	2880,27	-
kalata B13	3036,06	3033,58	1	IC	3036,46	0,40
kalata B14	3023,74	3021,17	0,9987	I	3022,43	1,31
kalata B15	2977,00	2974,56	1	ICS	2976,40	0,60
kalata B18	3147,33	3145,02	0,9977	I	3145,67	1,66
kalata S	2878,81	2875,93	0,9993	I	2878,30	0,51
ciclotido Oak6 1	3035,87	3033,49	1	IC	3035,47	0,40
[G-A] kalata B1 <sup>7</sup>	2906,47	2904,75	0,9995	I	2906,35	0,12
kalata b1-1	2724,12	2722,28	1	IC	2724,18	0,06
[L2A] kalata B1	2851,88	2849,54	1	IC	2850,25	1,63
Ac-[desGly]-KB1-Am	2854,31	2851,68	0,9996	I	2853,30	1,01
kalata B1 acíclico	2911,32	2908,36	1	IC	2910,35	0,97
ciclotido Oak6 2	3093,29	3090,61	1	IC	3092,56	0,73

<sup>1</sup>Identificación mediante reconstrucción de LC-MS de al menos 3 experimentos de LC-MS representativos ( $\pm 1$  Da, 20-70 min, EMS 1000 2 barridos) o identificación mediante digestión (tripsina o endo-GluC), nano LC-MS/MS y búsqueda en base de datos (ERA); <sup>2</sup>Peso molecular observado; <sup>3</sup>Puntuación que indica la calidad del péptido reconstruido por LC-MS ( $\leq 1,0$ ); <sup>4</sup>Evidencias para los ciclótidos identificados, I = patrón de isotipo, C = patrón de carga, S = secuencia completa, P = secuencia parcial o etiqueta de secuencia; <sup>5</sup>Datos tomados de CyBase (Wang, 2008, *Nucleic Acids Res*, 36, D206-210); <sup>6</sup> $\Delta$  PM determinada con respecto al peso molecular medio; <sup>7</sup> posición del aminoácido no especificada (reemplazo de G-A).

**Tabla 3. Comparación de los valores de  $CI_{50}$  de los efectos inhibidores de kalata B1 (y otros ciclótidos) en diversos sistemas de ensayo celular**

Sistema de ensayo	Células	$CI_{50}(\mu M)$	Referencias
<b>kalata B1</b>			
Actividad antiproliferativa	células mononucleares de sangre periférica humanas	3,9 ± 0,5	Gründemann <i>et al.</i> , 2012
Actividad nematocida	nematodos <i>H. contortus</i>	2,7	Huang <i>et al.</i> , 2010
	nematodos <i>T. colibriformus</i>	4,5	Huang <i>et al.</i> , 2010
Citotoxicidad	linfocitos linfoblásticos T humanos	3,5	Daly <i>et al.</i> , 2004
<b>otros ciclótidos*</b>			
Citotoxicidad	estirpe celular de linfoma humano (U-937)	0,6-6	Svangard <i>et al.</i> , 2004
		0,3-7	Lindholm <i>et al.</i> , 2002
Citotoxicidad	estirpe celular de mieloma humano (RPMI-8226/s)	1-4	Svangard <i>et al.</i> , 2004
		0,1-6	Lindholm <i>et al.</i> , 2002

5 \*Se informó de la actividad de diversos ciclótidos (varv A, varv E, varv F, vitri A, ciclovilacina O2) de *Viola arvensis*, *V. odorata* y *V. tricolor*

**Tabla 4. Reconstrucción de LC-MS de ciclótidos de *O. affinis*.** Se analizan mediante nano LC-MS los datos en bruto (marcados) de la reconstrucción de LC-MS de extractos de *O. affinis*.**Reconstrucción de LC-EM. EMS 1000 Da/segundo**

10 **Reconstrucción de 2.700-3.500 Da, señal a ruido: 4, 25, 50; conjuntos de datos combinados de al menos 3 ciclos de LC-MS independientes Comparaciones con CyBase:**

15 **PM +/- 1 Da**

\* = otro ciclótido detectado (no *Oaffinis*)

\*\* = PM +/- 2 Da

N.º	ciclótido	Masa Da (media)	Da (mono.)	Puntuación	Evidencia	Masa teórica Da (media)	$\Delta$ Masa Da
1	nuevo	2706,63	2704,37	0,9997	I		
2	nuevo	2723,22	2721,27	1	I		
3	kalata b1-1	2724,12	2722,28	1	IC	2724,18	0,0559
4	nuevo	2821,78	2819,36	1	IC		
5	nuevo	2822,30	2820,55	0,9995	I		
6	nuevo	2833,30	2831,41	1	I		
7	[L2A] kalata B1 Ac-[desGly]-KB1-	2851,88	2849,54	1	IC	2850,25	1,6322
8	Am	2854,31	2851,68	0,9996	I	2853,3	1,0072
9	nuevo	2873,73	2871,13	0,9996	I		
10	kalata S	2878,81	2875,93	0,9993	I	2878,30	0,5141
11	nuevo	2879,82	2877,46	1	IC		
12	kalata B12**	2882,30	2880,83	0,9969	I	2880,27	2,0256
13	kalata B11	2884,48	2881,44	0,9999	I	2884,26	0,2236
14	nuevo	2891,45	2888,50	1	IC		
15	kalata B1	2892,85	2890,39	1	IC	2892,33	0,5228
16	kalata B4	2893,24	2890,56	1	I	2893,31	0,0718
17	nuevo*	2896,70	2894,45	0,9999	I		

ES 2 677 895 T3

N.º	ciclótido	Masa Da (media)	Da (mono.)	Puntuación	Evidencia	Masa teórica Da (media)	Δ Masa Da
18	nuevo	2897,11	2894,57	1	IC		
19	[G-A] kalata B1	2906,47	2904,75	0,9995	I	2906,35	0,1191
20	nuevo	2909,53	2906,90	1	IC		
21	kalata B1 acíclico	2911,32	2908,36	1	IC	2910,35	0,9675
22	nuevo*	2912,90	2911,43	0,9999	I		
23	nuevo*	2922,95	2920,48	1	IC		
24	nuevo*	2925,32	2922,40	1	IC		
25	nuevo*	2926,80	2923,70	1	IC		
26	nuevo	2927,30	2924,66	1	IC		
27	nuevo	2937,91	2935,50	0,9998	I		
28	nuevo	2942,99	2940,48	1	IC		
29	kalata B2	2956,14	2953,74	1	IC	2955,38	0,7637
30	nuevo*	2959,95	2957,56	1	IC		
31	nuevo	2960,36	2958,24	0,9996	I		
32	nuevo	2969,25	2968,13	0,9997	I		
33	nuevo*	2971,44	2969,50	1	IC		
34	nuevo	2973,80	2970,55	1	IC		
35	nuevo	2974,14	2971,51	1	IC		
36	nuevo*	2975,38	2973,49	1	IC		
37	kalata B15	2977,00	2974,56	1	IC	2976,40	0.602
38	nuevo*	2986,57	2983,80	1	I		
39	nuevo	2988,28	2985,60	1	IC		
40	nuevo	2990,37	2987,51	1	IC		
41	nuevo	2994,11	2991,86	1	IC		
42	nuevo*	3006,25	3003,50	1	IC		
43	nuevo*	3010,97	3008,88	1	IC		
44	kalata B14	3023,74	3021,17	0,9987	I	3022,43	1,3147
45	nuevo*	3028,61	3025,92	0,9998	I		
46	kalata B6	3029,96	3027,66	0,9999	I	3029,42	0,5381
47	kalata B10	3030,21	3027,53	1	IC	3030,41	0,2028
48	ciclótido Oak6 1	3035,87	3033,49	1	IC	3035,47	0.398
49	kalata B13	3036,06	3033,58	1	IC	3036,46	0,4018
50	nuevo	3039,91	3037,45	1	IC		
51	nuevo	3040,05	3036,62	1	IC		
52	nuevo*	3045,78	3043,50	1	IC		
53	nuevo*	3046,32	3044,95	1	IC		
54	nuevo*	3047,97	3046,60	0,9999	I		
55	kalata B10 lin	3048,54	3046,50	1	IC	3048,43	0,1091
56	nuevo*	3051,82	3048,48	1	IC		
57	nuevo*	3052,72	3049,57	1	IC		
58	nuevo*	3065,79	3063,36	0,9997	I		
59	kalata B7	3072,26	3069,74	0,9998	I	3071,59	0,67
60	nuevo*	3073,89	3072,70	0,9999	I		

ES 2 677 895 T3

N.º	ciclótido	Masa Da (media)	Da (mono.)	Puntuación	Evidencia	Masa teórica Da (media)	Δ Masa Da
61	kalata B3	3083,31	3080,64	1	IC	3082,48	0,8309
62	nuevo*	3087,22	3084,61	1	IC		
63	nuevo	3089,27	3086,96	0,9997	I		
64	nuevo	3091,00	3089,03	0,9997	I		
65	ciclótido Oak6 2	3093,29	3090,61	1	IC	3092,56	0,7328
66	nuevo*	3097,63	3094,57	1	IC		
67	nuevo*	3099,85	3096,60	1	IC		
68	kalata B18**	3147,33	3145,02	0,9977	I	3145,67	1,6615
69	nuevo*	3266,81	3264,99	0,9997	I		
70	kalata B8	3284,34	3281,75	1	IC	3283,79	0,5453
71	nuevo*	3300,96		1	C		
72	nuevo	3446,88	3444,98	0,9998	I		

**Total: 72**

**Nuevos: 25**

**Nuevos\*: 24**

**Tabla 5. Resultados de la búsqueda en la base de datos de *O. affinis* tras las digestiones y análisis de LC-MS/MS. Resultados de la búsqueda en la base de datos Protein Pilot™ del análisis de LC-MS/MS del ciclotido.**

N	Sin usar	Total	% de Cov	% de Cov (50)	% de Cov (95)	Acceso	Nombre	Péptidos (95 %)
Digestión con tripsina								
1	6,43	6,43	100,00	85,48	82,26	cb P85175	kalata B8/1-31  cybaseid = 168 organismo = <i>Oldenlandia affinis</i>	4
2	6,00	6,00	100,00	51,72	51,72	cb P58457	kalata B7/1-29  cybaseid = 26 organismo = <i>Oldenlandia affinis</i>	6
3	5,91	5,91	100,00	98,28	96,55	cb P58454	kalata B2/1-29  cybaseid = 4 organismo = <i>Oldenlandia affinis</i>	4
4	2,75	2,75	100,00	98,28	72,41	cb P83938	kalata B4/1-29  cybaseid = 30 organismo = <i>Oldenlandia affinis</i>	2
5	2,63	2,63	93,33	88,33	88,33	cb P58456	kalata B5/1-30  cybaseid = 59 organismo = <i>Oldenlandia affinis</i>	5
6	2,00	3,75	100,00	98,28	72,41	cb P85133	kalata B15/1-29  cybaseid = 253 organismo = <i>Oldenlandia affinis</i>	3
7	2,00	2,00	100,00	50,00	50,00	cb P85128	kalata B10/1-30  cybaseid = 246 organismo = <i>Oldenlandia affinis</i>	1
7	0,00	2,00	100,00	50,00	50,00	cb 247	kalata B10 lineal/1-30  cybaseid = 247 organismo = <i>Oldenlandia affinis</i>	1
8	2,00	2,00	85,48	85,48	43,55	cb P85127	kalata B9/1-31  cybaseid = 244 organismo = <i>Oldenlandia affinis</i>	1
8	0,00	2,00	85,48	85,48	43,55	cb 245	kalata B9 lineal/1-31  cybaseid = 245 organismo = <i>Oldenlandia affinis</i>	1
9	2,00	2,00	98,21	50,00	50,00	cb P85130	kalata B12/1-28  cybaseid = 250 organismo = <i>Oldenlandia affinis</i>	2
10	1,06	2,00	100,00	50,00	50,00	cb P58455-b3	kalata B6/1-30  cybaseid = 24 organismo = <i>Oldenlandia affinis</i>	1
10	0,00	2,00	100,00	50,00	50,00	cb 247	kalata B10 lineal/1-30  cybaseid = 247 organismo = <i>Oldenlandia affinis</i>	1
11	0,63	2,01	98,28	98,28	72,41	cb P56254	kalata B1/1-29  cybaseid = 1 organismo = <i>Viola odorata</i> ; <i>Oldenlandia affinis</i> ; <i>Viola baoshanensis</i> ; <i>Viola yedoensis</i>	4
12	0,20	0,20	100,00	61,67	0,00	cb P58455-b6	kalata B3/1-30  cybaseid = 25 organismo = <i>Oldenlandia affinis</i>	0
Digestión con Endo GluC								
1	0,88	0,88	100	87,92999983	0	cb P58454	kalata B2/1-29  cybaseid = 4 organismo = <i>Oldenlandia affinis</i>	0
2	0,52	0,52	100	50	50	cb P58457	kalata B7/1-29  cybaseid = 26 organismo = <i>Oldenlandia affinis</i>	1
3	0,21	0,21	100	25	0	cb P58455-b6	kalata B3/1-30  cybaseid = 25 organismo = <i>Oldenlandia affinis</i>	0

Tabla 6. Datos de cuantificación de ciclótidos Datos de cinco experimentos independientes de cuantificación de ciclótidos.

Ciclótido identificado	PM calculado (Da)	ETM	$\Delta$ PM (Da)	PM de reconstrucción de LC-MS (Da)	ETM	$\Delta$ PM (Da)	PM teórico (Da)	TR (min)	ETM	Área (mAU*min)	ETM	Altura (mAU)	ETM	% de área rel.	ETM
kalata B8	3283,91	0,15	0,12	3284,24	0,19	0,45	3283,79	29,95	0,01	20,55	0,57	28,01	0,72	5,6	0,2
kalata B7	3071,83	0,19	0,24	3072,27	0,17	0,68	3071,59	37,54	0,04	7,89	0,22	41,43	0,21	2,2	0,1
kalata B1	2892,27	0,27	0,06	2892,98	0,21	0,65	2892,33	45,48	0,02	50,81	0,84	96,96	0,61	13,9	0,2
kalata B6	3029,60	0,28	0,18	3029,84	0,12	0,42	3029,42	46,50	0,03	29,63	0,46	46,88	0,38	8,1	0,1
kalata B13	3035,56	0,20	0,90	3035,89	0,12	0,57	3036,46	50,32	0,03	14,88	1,16	28,75	0,38	4,1	0,3
kalata B2	2955,76	0,12	0,38	2955,90	0,09	0,52	2955,38	51,82	0,03	72,86	3,17	103,65	0,86	20,0	0,6
kalata B3	3082,72	0,21	0,24	3083,04	0,08	6,55	3082,48	52,59	0,07	11,00	1,40	23,02	1,27	3,0	0,4

\*n = 5, Cuantificación mediante HPLC (área bajo la curva) de cinco experimentos independientes

\*\*PM masa media

\*\*\*PM calculado de ion +2 o +3

La presente invención se refiere a las siguientes secuencias de nucleótidos y de aminoácidos:

SEQ ID NO. 1:  
Secuencia de aminoácidos de Kalata B1: GLP**V**CG**E**T**C**VGG**T**C**N**T**P**G**C**T**C**S**W**P**V**C**T**R**N**

SEQ ID NO. 2:  
Secuencia de aminoácidos de Kalata B2: GLP**V**CG**E**T**C**FGG**T**C**N**T**P**G**C**S**C**T**W**P**I**C**T**R**D**

SEQ ID NO. 3:  
Secuencia de aminoácidos de D-Kalata B2: all-D GLP**V**CG**E**T**C**FGG**T**C**N**T**P**G**C**S**C**T**W**P**I**C**T**R**D**

SEQ ID NO. 4:  
Secuencia de aminoácidos de Kalata G18K: GLP**V**CG**E**T**C**VGG**T**C**N**T**P**K**C**T**C**S**W**P**V**C**T**R**N**

SEQ ID NO. 5:  
Secuencia de aminoácidos de Kalata N29K: GLP**V**CG**E**T**C**VGG**T**C**N**T**P**G**C**T**C**S**W**P**V**C**T**R**K**

SEQ ID NO. 6:  
Secuencia de aminoácidos de Kalata T20K, G1K: KLP**V**CG**E**T**C**VGG**T**C**N**T**P**G**C**K**C**S**W**P**V**C**T**R**N**

SEQ ID NO. 7:  
Secuencia de aminoácidos de Kalata T20K: GLP**V**CG**E**T**C**VGG**T**C**N**T**P**G**C**K**C**S**W**P**V**C**T**R**N**

SEQ ID NO. 8:  
Secuencia de aminoácidos de Kalata T8K: GLP**V**CG**E**K**C**VGG**T**C**N**T**P**G**C**T**C**S**W**P**V**C**T**R**N**

SEQ ID NO. 9:  
Secuencia de aminoácidos de Kalata V10A: GLP**V**CG**E**T**C**AGG**T**C**N**T**P**G**C**T**C**S**W**P**V**C**T**R**N**

SEQ ID NO. 10:  
Secuencia de aminoácidos de Kalata V10K: GLP**V**CG**E**T**C**KGG**T**C**N**T**P**G**C**T**C**S**W**P**V**C**T**R**N**

5 SEQ ID NO. 11:  
Secuencia de nucleótidos codificante de Kalata B1:  
GGACTTCCAGTATGCGGTGAGACTTGTGTTGGGGGAAGTTCGAACACTCCAGGCTGCACTTGCT  
CCTGGCCTGTTTGCACACGCAAT

10 SEQ ID NO. 12:  
Secuencia de nucleótidos codificante de Kalata B2:  
GGTCTTCCAGTATGCGGCGAGACTTGCTTTGGGGGAAGTTCGAACACTCCAGGCTGCTCTTGCA  
CCTGGCCTATCTGCACACGCGAT

SEQ ID NO. 13:  
Secuencia de aminoácidos de proteína precursora de Kalata B1. El dominio maduro Kalata B1 está subrayado.

15 P56254, Kalata-B1, *Odenlandia affinis*  
MAKFTVCLLLCLLLAAFVGAFGSELSDSHKTTLVNEIAEKMLQRKILDGVEATLVTDVAEKMFLRKMKAETSET  
ADQVFLKQLQLKGLPVCGETCVGGTCNTPGCTCSWPVCTRNGLPSLAA

20 SEQ ID NO. 14:  
Secuencia de aminoácidos de proteína precursora de Kalata B2. Los tres dominios maduros de Kalata B2 están subrayados.

P58454, Kalata-B2, *Odenlandia affinis*  
MAKFTNCLVLSLLLAFAFGAFAEFSEADKATLVNDIAENIQKEILGEVKTSETVLTMFLKEMQLKGLPVCGETCF  
GGTCNTPGCSCTWPICTRDSLPMRAGGKTSETTLHMFLKEMQLKGLPVCGETCFGGTCNTPGCSCTWPICTRDSLP  
MSAGGKTSETTLHMFLKEMQLKGLPVCGETCFGGTCNTPGCSCTWPICTRDSLPLVAA

SEQ ID NO. 15:

Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína precursora de Kalata B1. La secuencia de nucleótidos correspondiente al dominio maduro de Kalata B1 está subrayada.

5 >gi|15667740|gb|AF393825.1| precursor de kalata B1 de *Oldenlandia affinis*, ARNm, cds completa  
 GGCACCAGCACTTTCTTAAATTTACTGCTTTTTCTTATTTCTTGTCTGTGCTTGCCTTCTCCATGGCTAAGTTC  
 ACCGTCTGTCTCCTCCTGTGCTTGCCTTCTTGAGCATTGTTGGGGCGTTTGGATCTGAGCTTTCTGACTCCCACA  
 AGACCACCTTGGTCAATGAAATCGCTGAGAAGATGCTACAAAGAAAGATATTGGATGGAGTGGAAAGCTACTTTGGT  
 CACTGATGTCGCCGAGAAGATGTTCTTAAGAAAGATGAAGGCTGAAGCGAAAACCTCTGAAACCGCCGATCAGGTG  
 TTCTGAAACAGTTGCAGCTCAAAGGACTTCCAGTATGCGGTGAGACTTGTGTTGGGGGAACCTGCAACACTCCAG  
GCTGCACTTGCCTGGCCTGTTTGCACACGCAATGGCCTTCTAGTTTGGCCGCATAATTTGCTTGATCAAACCTG  
 CAAAAATGAATGAGAAGGCCGACACCAATAAAGCTATCAATGTAGTTGGTCCCTGTACTTAATTTGGTTGGCTCCA  
 AACCATGTGTGCTGCTCTTGTTTTTGTTTTTCTTTTTTCTTCTCTCTTTCGGGCACTCTTCAGGACATGAAAGTGA  
 TGATCAGTACTCTTTGCTATCATGTTTTCTGTGCACACCTTCTATTGTAGGTGTTGTTGTGATGTTGATGCCCAAT  
 TGGAAATAAAGTGTGTCGTTGTTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

SEQ ID NO. 16:

10 Secuencia de nucleótidos que codifica la proteína precursora de Kalata B2. Las secuencias de nucleótidos correspondientes a los tres dominios maduros de Kalata B2 están subrayadas.

>gi|15667746|gb|AF393828.1| precursor de kalata B2 de *Oldenlandia affinis*, ARNm, cds completa  
 GGCACCAGATACAACCCCTTTCTTATAATTTATTGCTTTTCTTATTCCCTTGAAAAAGGAGAAATAATATTGGATCT  
 TCCATGGCTAAGTTCACCAACTGTCTCGTCTGAGCTTGCCTTCTAGCAGCATTTGTTGGGGCTTTCGGAGCTGAGT  
 TTTCTGAAGCCGACAAGGCCACCTTGGTCAATGATATCGCTGAGAATATCCAAAAAGAGATACTGGGCGAAGTGAA  
 GACTTCTGAAACCGTCTTACGATGTTCTGAAAGAGATGCAGCTCAAAGGTCTTCCAGTATGCGGGCAGACTTGC  
TTTGGGGGAACCTGCAACACTCCAGGCTGCTCTTGCACCTGGCCTATCTGCACACGCGATAGCCTTCTATGAGGG  
CTGGAGGAAAAACATCTGAAACCACCCTTCATATGTTCTGAAAGAGATGCAGCTCAAGGGTCTTCCAGTTTGC  
CGAGACTTGCCTTGGGGGAACCTGCAACACTCCAGGCTGCTCGTGCACCTGGCCTATCTGCACACGCGATAGCCTT  
CCTATGAGTGCCTGGAGGAAAAACATCTGAAACCACCCTTCATATGTTCTGAAAGAGATGCAGCTCAAGGGTCTTC  
CAGTTTGC  
CGGAGACTTGCCTTGGGGGAACCTGCAACACTCCAGGCTGCTCGTGCACCTGGCCTATATGCACACG  
TGATAGCCTTCTCTTGTGGCTGCATAATTTGCTTCATCAAACCTGCAAAATGAATAAGAAGGGACACTAAATTAGC  
 TATGAATTTTGTGGCCCTTGTGTCTGGTAATTTGGTTCCCGCCAAATTAACCATATGTATGCATTGCTCCTTTTT  
 TCTTTCTTTTTTTTCCCCCTCATTGGGGCACTCTTCATTACATGAAGAGATCATGACGCTTTGTTACTCTGAGCAC  
 CCCCTGTTGGTGTGTTTCACATGTTGATGCCCATGTTGGAATAAAGTCTTGTTTTTGTTACCAAAAAAAAAAAAAA  
 AAAAA

15 SEQ ID NO. 17:

Secuencia de aminoácidos consenso de ciclótidos activos (Xxx<sub>1</sub> es cualquier aminoácido, aminoácido no natural o peptidomimético; Xxx<sub>2</sub> es cualquier aminoácido, aminoácido no natural o peptidomimético, excepto Lys; y Xxx<sub>3</sub> es cualquier aminoácido, aminoácido no natural o peptidomimético, a excepción de Ala o Lys):

20 Xxx<sub>1</sub>-Leu-Pro-Val-Cys-Gly-Glu-Xxx<sub>2</sub>-Cys-Xxx<sub>3</sub>-Gly-Gly-Thr-Cys-Asn-Thr-Pro-Xxx<sub>1</sub>-Cys-Xxx<sub>1</sub>-Cys-Xxx<sub>1</sub>-Trp-Pro-Xxx<sub>1</sub>-Cys-Thr-Arg-Xxx<sub>1</sub>

**Referencias adicionales**

25 1. Ewing *Immunol Cell Biol* 76, 47-54 (1998).  
 2. Bernard *Curr Opin Immunol* 4, 760-765 (1992).  
 3. Onuki *Microsc Res Tech* 52, 731-739 (2001).  
 4. Ayers *Neurochem Int* 45, 409-419 (2004).  
 5. Bernard *J Mol Med* 75, 77-88 (1997).

6. Dubois *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74, 946-949 (2003).
7. Krause *Febs J* 274, 86-95 (2007).
8. Reiss *Platelets* 17, 153-157 (2006).
9. Zhou *J Virol* 81, 7517-7528 (2007).
- 5 10. dos Santos *J Neuroimmunol* 162, 122-129 (2005).
11. Martin *Nat Biotechnol* 21, 71 -76 (2003).
12. Craik *J Mol Biol* 294, 1327-1336 (1999).
13. Craik *Science* 311, 1563-1564 (2006).
14. Craik *Biopolymers* 84, 250-266 (2006).
- 10 15. Rosengren *J Biol Chem* 278, 8606-8616 (2003).
16. Simonsen, *J Biol Chem* 283, 9805-9813 (2008).
17. Cemazar *Internat. J. of Peptide Research and Therapeutics* 12, 253-260 (2006).
18. Colgrave *Biochemistry* 43, 5965-5975 (2004).
19. Okuda *J Interferon Cytokine Res* 18, 415-421 (1998).
- 15 20. Schnolzer *Int J Pept Protein Res* 40, 180-193 (1992).
21. Dawson *Science* 266, 776-779 (1994).
22. Albouz-Abo *Eur J Biochem* 246, 59-70 (1997).
23. Hvas *Scand J Immunol* 46, 195-203 (1997).
24. Johns *Mol Immunol* 34, 33-38 (1997).
- 20 25. Menon *J Neurochem* 69, 214-222 (1997).
26. Liu *Nat Med* 4, 78-83 (1998).
27. Slavin *Autoimmunity* 28, 109-120 (1998).
28. Ichikawa *Int Immunol* 8, 1667-1674 (1996).
29. Ichikawa *J Immunol* 157, 919-926 (1996).
- 25 30. Bernard *Clin Exp Immunol* 52, 98-106 (1983).
31. Pedersen *J Neuroimmunol* 5, 251-259 (1983).
32. Bettadapura *J Neurochem* 70, 1593-1599 (1998).
33. Okuda *J Neuroimmunol* 131, 115-125 (2002).
34. Ichikawa *Cell Immunol* 191, 97-104 (1999).
- 30 35. Daly *Biochemistry* 38, 10606-10614 (1999).
36. Cemazar *J Biol Chem* 281, 8224-8232 (2006).
37. Owens *Curr Opin Neurol* 16, 259-265 (2003).
38. Nicholson *Curr Opin Immunol* 8, 837-842 (1996).
39. Gonzalo *J Immunol* 166, 1 -5 (2001).
- 35 40. Henry *Immunol Today* 20, 285-288 (1999).
41. Ihle *Nature* 377, 591-594 (1995).
42. Janeway *Cell* 76, 275-285 (1994).
42. Minami *Annu. Rev. Immunol* 11, 245-268 (1993).
43. Svanborg *Curr Opin Microbiol* 2, 99-105 (1999).
- 40 44. DeVries *Semin Immunol* 11, 95-104 (1999).
45. Larsson *Inflammation* 23, 217-230 (1999).
46. Cerdan *Res Immunol* 146, 164-168 (1995).
47. Jain *Curr Opin Immunol* 7, 333-342 (1995).
48. Romagnani *Inflamm Bowel Dis* 5, 285-294 (1999).
- 45 49. Orlinick *Cell Signal* 10, 543-551 (1998).
50. Romanic *Lab Invest* 76, 11 -23 (1997).
51. Horn *Immunobiology* 202, 151-167 (2000).
52. Callan *J Clin Invest* 106, 1251-1261 (2000).
53. Grundemann *J Nat Prod* 75, 167-174 (2012).
- 50 54. Betts *J Immunol Methods* 281, 65-78 (2003).
55. Abraham *Curr Opin Immunol* 10, 330-336 (1998).
56. Ohta *J Immunol* 183, 5487-5493 (2009).

#### Listado de secuencias

- 55 <110> Medizinische Universität Wien *et al.*
- <120> Ciclotidos como agentes inmunosupresores
- 60 <130> T2741 PCT S3
- <150> EP 11 19 5413.7
- <151> 22-12-2011
- 65 <150> EP 12 19 6918.2

<151> 13-12-2012

ES 2 677 895 T3

<160> 17

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> *Oldenlandia affinis*

10 <400> 1

Gly Leu Pro Val Cys Gly Glu Thr Cys Val Gly Gly Thr Cys Asn Thr  
 1 5 10 15

Pro Gly Cys Thr Cys Ser Trp Pro Val Cys Thr Arg Asn  
 20 25

15 <210> 2  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> *Oldenlandia affinis*

20 <400> 2

Gly Leu Pro Val Cys Gly Glu Thr Cys Phe Gly Gly Thr Cys Asn Thr  
 1 5 10 15

Pro Gly Cys Ser Cys Thr Trp Pro Ile Cys Thr Arg Asp  
 20 25

25 <210> 3  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Forma mutante de Kalata B1

<400> 3

Gly Leu Pro Val Cys Gly Glu Thr Cys Phe Gly Gly Thr Cys Asn Thr  
 1 5 10 15

Pro Gly Cys Ser Cys Thr Trp Pro Ile Cys Thr Arg Asp  
 20 25

35 <210> 4  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

40 <220>  
 <223> Forma mutante de Kalata B1

<400> 4

45

ES 2 677 895 T3

Gly Leu Pro Val Cys Gly Glu Thr Cys Val Gly Gly Thr Cys Asn Thr  
1 5 10 15

Pro Lys Cys Thr Cys Ser Trp Pro Val Cys Thr Arg Asn  
20 25

5 <210> 5  
<211> 29  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10 <220>  
<223> Forma mutante de Kalata B1  
<400> 5

Gly Leu Pro Val Cys Gly Glu Thr Cys Val Gly Gly Thr Cys Asn Thr  
1 5 10 15

Pro Gly Cys Thr Cys Ser Trp Pro Val Cys Thr Arg Lys  
20 25

15 <210> 6  
<211> 29  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20 <220>  
<223> Forma mutante de Kalata B1  
<400> 6

Lys Leu Pro Val Cys Gly Glu Thr Cys Val Gly Gly Thr Cys Asn Thr  
1 5 10 15

Pro Gly Cys Lys Cys Ser Trp Pro Val Cys Thr Arg Asn  
20 25

25 <210> 7  
<211> 29  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Forma mutante de Kalata B1  
35 <400> 7

Gly Leu Pro Val Cys Gly Glu Thr Cys Val Gly Gly Thr Cys Asn Thr  
1 5 10 15

Pro Gly Cys Lys Cys Ser Trp Pro Val Cys Thr Arg Asn  
20 25

<210> 8

ES 2 677 895 T3

<211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5

<220>  
 <223> Forma mutante de Kalata B1

<400> 8

Gly Leu Pro Val Cys Gly Glu Lys Cys Val Gly Gly Thr Cys Asn Thr  
 1 5 10 15

Pro Gly Cys Thr Cys Ser Trp Pro Val Cys Thr Arg Asn  
 20 25

10

<210> 9  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15

<220>  
 <223> Forma mutante de Kalata B1

20

<400> 9

Gly Leu Pro Val Cys Gly Glu Thr Cys Ala Gly Gly Thr Cys Asn Thr  
 1 5 10 15

Pro Gly Cys Thr Cys Ser Trp Pro Val Cys Thr Arg Asn  
 20 25

25

<210> 10  
 <211> 29  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30

<220>  
 <223> Forma mutante de Kalata B1

<400> 10

Gly Leu Pro Val Cys Gly Glu Thr Cys Lys Gly Gly Thr Cys Asn Thr  
 1 5 10 15

Pro Gly Cys Thr Cys Ser Trp Pro Val Cys Thr Arg Asn  
 20 25

35

<210> 11  
 <211> 87  
 <212> ADN  
 <213> *Oldenlandia affinis*

40

<400> 11

ggacttccag tatgcggtga gacttqtgtt gggggaactt gcaacactcc aggctgcact 60  
 tgctcctggc ctgtttgcac acgcaat 87

45

<210> 12

ES 2 677 895 T3

<211> 87  
 <212> ADN  
 <213> *Oldenlandia affinis*

5 <400> 12

ggctctccag tatgcggcga gacttgcttt gggggaactt gcaacactcc aggctgctct 60

tgcacctggc ctatctgcac acgcgat 87

<210> 13  
 <211> 124  
 <212> PRT  
 <213> *Oldenlandia affinis*

10

<400> 13

15

Met Ala Lys Phe Thr Val Cys Leu Leu Leu Cys Leu Leu Leu Ala Ala  
 1 5 10 15

Phe Val Gly Ala Phe Gly Ser Glu Leu Ser Asp Ser His Lys Thr Thr  
 20 25 30

Leu Val Asn Glu Ile Ala Glu Lys Met Leu Gln Arg Lys Ile Leu Asp  
 35 40 45

Gly Val Glu Ala Thr Leu Val Thr Asp Val Ala Glu Lys Met Phe Leu  
 50 55 60

Arg Lys Met Lys Ala Glu Ala Lys Thr Ser Glu Thr Ala Asp Gln Val  
 65 70 75 80

Phe Leu Lys Gln Leu Gln Leu Lys Gly Leu Pro Val Cys Gly Glu Thr  
 85 90 95

Cys Val Gly Gly Thr Cys Asn Thr Pro Gly Cys Thr Cys Ser Trp Pro  
 100 105 110

Val Cys Thr Arg Asn Gly Leu Pro Ser Leu Ala Ala  
 115 120

<210> 14  
 <211> 210  
 <212> PRT  
 <213> *Oldenlandia affinis*

20

<400> 14

ES 2 677 895 T3

Met Ala Lys Phe Thr Asn Cys Leu Val Leu Ser Leu Leu Leu Ala Ala  
 1 5 10 15

Phe Val Gly Ala Phe Gly Ala Glu Phe Ser Glu Ala Asp Lys Ala Thr  
 20 25 30

Leu Val Asn Asp Ile Ala Glu Asn Ile Gln Lys Glu Ile Leu Gly Glu  
 35 40 45

Val Lys Thr Ser Glu Thr Val Leu Thr Met Phe Leu Lys Glu Met Gln  
 50 55 60

Leu Lys Gly Leu Pro Val Cys Gly Glu Thr Cys Phe Gly Gly Thr Cys  
 65 70 75 80

Asn Thr Pro Gly Cys Ser Cys Thr Trp Pro Ile Cys Thr Arg Asp Ser  
 85 90 95

Leu Pro Met Arg Ala Gly Gly Lys Thr Ser Glu Thr Thr Leu His Met  
 100 105 110

Phe Leu Lys Glu Met Gln Leu Lys Gly Leu Pro Val Cys Gly Glu Thr  
 115 120 125

Cys Phe Gly Gly Thr Cys Asn Thr Pro Gly Cys Ser Cys Thr Trp Pro  
 130 135 140

Ile Cys Thr Arg Asp Ser Leu Pro Met Ser Ala Gly Gly Lys Thr Ser  
 145 150 155 160

Glu Thr Thr Leu His Met Phe Leu Lys Glu Met Gln Leu Lys Gly Leu  
 165 170 175

Pro Val Cys Gly Glu Thr Cys Phe Gly Gly Thr Cys Asn Thr Pro Gly  
 180 185 190

Cys Ser Cys Thr Trp Pro Ile Cys Thr Arg Asp Ser Leu Pro Leu Val  
 195 200 205

Ala Ala  
 210

<210> 15  
 <211> 724  
 <212> ADN  
 <213> *Oldenlandia affinis*

5

<400> 15

ES 2 677 895 T3

ggcaccagca ctttcttaaa atttactgct ttttcttatt tottggtctg tgcttgettc 60  
 ttccatggct aagttcaccg tctgtctcct cctgtgcttg cttcttgcag catttggttg 120  
 ggcgtttga tctgagcttt ctgactcca caagaccacc ttggtcaatg aaatogctga 180  
 gaagatgcta caaagaaaga tattggatgg agtggaaagt actttggtca ctgatgtcgc 240  
 cgagaagatg ttcttaagaa agatgaaggc tgaagcgaaa acttctgaaa ccgccgatca 300  
 ggtgttcctg aaacagttgc agctcaaagg acttccagta tgcggtgaga cttgtgttgg 360  
 gggaaacttg aacactccag gctgcacttg ctctggcct gtttgcacac gcaatggcct 420  
 tcctagtttg gccgcataat ttgcttgatc aaactgcaaa aatgaatgag aaggccgaca 480  
 ccaataaagc tatcaatgta gttggctcct gtacttaatt tggttggctc caaacctatg 540  
 gtgctgctct tgtttttggt ttttctttt tcttctctct ttccgggcaact cttcaggaca 600  
 tgaagtgatg atcagtactc tttgctatca tgttttctgt gcacaccttc tattgtaggt 660  
 gttgttgtga tgttgatgcc caattggaat aaactgttgt cgttggttaa aaaaaaaaaa 720  
 aaaa 724

5 <210> 16  
 <211> 993  
 <212> ADN  
 <213> *Oldenlandia affinis*

10 <400> 16

ggcaccagat acaaccoctt tottataatt tattgctttt cttattcctt gaaaaaggag 60  
 aaataatatt ggatcttcca tggctaagtt caccaactgt ctctctctga gcttgcttct 120  
 agcagcattt gttggggctt tccggagctga gttttctgaa gccgacaagg ccaccttgg 180  
 caatgatatc gctgagaata tccaaaaaga gatactgggc gaagtgaaga cttctgaaac 240  
 cgtccttacg atgttcctga aagagatgca gctcaaaggt cttccagtat gcggcgagac 300  
 ttgctttggg ggaacttgca aactccagg ctgctcttgc acctggccta tctgcacacg 360  
 cgatagcctt octatgaggg ctggaggaaa aacatctgaa accaccttc atatgttctt 420  
 gaaagagatg cagctcaagg gtcttccagt ttgcggcgag acttgctttg ggggaacttg 480  
 caaactcca ggctgctcgt gcacctggcc tatctgcaca ccgatagcc ttctatgag 540  
 tgctggagga aaaacatctg aaaccacctc tcatatgttc ctgaaagaga tgcagctcaa 600  
 gggctctcca gtttgccggc agacttgctt tgggggaact tgcaaacctc caggctgctc 660  
 gtgcaoctgg octatatgca cacgtgatag ccttctctt gtggctgcat aattgcttc 720

```

atcaaactgc aaaatgaata agaagggaca ctaaattagc tatgaatfff gttggccctt      780
gtgtctggta atttggttcc cgccaaatta accatatgta tgcattgctc cttttttctt      840
tctttttttt cccctcatt tgggcactct tcattacatg aagagatcat gacgctttgt      900
tactctgagc acccctgtt ggtgttggtc acatgttgat gcccatggtg gaataaactc      960
ttgtttttgt taccaaaaaa aaaaaaaaaa aaa                                  993

```

```

5  <210> 17
   <211> 29
   <212> PRT
   <213> Secuencia artificial

10 <220>
   <223> Forma mutante de Kalata B1

15 <220>
   <221> variante
   <222> 1
   <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido

20 <220>
   <221> variante
   <222> 8
   <223> /reemplazar="Ala"
   /reemplazar="Cys"
   /reemplazar="Asp"
   /reemplazar="Glu"
   /reemplazar="Phe"
25 /reemplazar="Gly"
   /reemplazar="His"
   /reemplazar="Ile"
   /reemplazar="Leu"
   /reemplazar="Met"
30 /reemplazar="Asn"
   /reemplazar="Pro"
   /reemplazar="Gln"
   /reemplazar="Arg"
   /reemplazar="Ser"
35 /reemplazar="Thr"
   /reemplazar="Val"
   /reemplazar="Trp"
   /reemplazar="Tyr"

40 <220>
   <221> variante
   <222> 10
   <223> /reemplazar="Cys"
   /reemplazar="Asp"
45 /reemplazar="Glu"
   /reemplazar="Phe"
   /reemplazar="Gly"
   /reemplazar="His"
   /reemplazar="Ile"
50 /reemplazar="Leu"
   /reemplazar="Met"
   /reemplazar="Asn"
   /reemplazar="Pro"
   /reemplazar="Gln"
55 /reemplazar="Arg"
   /reemplazar="Ser"
   /reemplazar="Thr"

```

/reemplazar="Val"  
 /reemplazar="Trp"  
 /reemplazar="Tyr"

- 5 <220>  
 <221> variante  
 <222> 18  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
- 10 <220>  
 <221> variante  
 <222> 20  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
- 15 <220>  
 <221> variante  
 <222> 22  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
- 20 <220>  
 <221> variante  
 <222> 25  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
- 25 <220>  
 <221> variante  
 <222> 29  
 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido
- 30 <400> 17

Xaa Leu Pro Val Cys Gly Glu Xaa Cys Xaa Gly Gly Thr Cys Asn Thr  
 1 5 10 15

Pro Xaa Cys Xaa Cys Xaa Trp Pro Xaa Cys Thr Arg Xaa  
 20 25

## REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende un ciclótido de tipo kalata B no injertado, siendo dicho ciclótido un péptido ciclado de cabeza a cola cuya cadena ciclotídica incluye seis restos de cisteína conservados capaces de formar tres enlaces disulfuro dispuestos en un motivo de nudo de cistina cíclica (CCK), para su uso en el tratamiento o en la prevención de un trastorno autoinmune o una inflamación mediada por linfocitos mediante inmunosupresión.
2. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho ciclótido no incluye otro péptido terapéutico.
3. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que dicho ciclótido comprende el tramo de aminoácidos (fórmula II)
- Xxx<sub>1</sub>-Leu-Pro-Val-Cys-Gly-Glu-Xxx<sub>2</sub>-Cys-Xxx<sub>3</sub>-Gly-Gly-Thr-Cys-Asn-Thr-Pro-Xxx<sub>1</sub>-Cys-Xxx<sub>1</sub>-Cys-Xxx<sub>1</sub>-Trp-Pro-Xxx<sub>1</sub>-Cys-Thr-Arg-Xxx<sub>1</sub>, (SEQ ID NO: 17)
- en el que Xxx<sub>1</sub> es cualquier aminoácido, aminoácido no natural o peptidomimético; Xxx<sub>2</sub> es cualquier aminoácido, aminoácido no natural o peptidomimético, excepto Lys; y Xxx<sub>3</sub> es cualquier aminoácido, aminoácido no natural o peptidomimético, a excepción de Ala o Lys.
4. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que dicho ciclótido comprende el tramo de aminoácidos de fórmula II según lo definido en la reivindicación 3, que tiene
- (i) al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de los restos de aminoácidos ácidos reemplazados por uno o varios restos de aminoácidos diferentes seleccionados del grupo que consiste en restos de aminoácido ácidos;
  - (ii) al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de los restos de aminoácidos básicos reemplazados por uno o varios restos de aminoácidos diferentes seleccionados del grupo que consiste en restos de aminoácido básicos; y/o
  - (iii) al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de los restos de aminoácidos alifáticos reemplazados por uno o varios restos de aminoácidos diferentes seleccionados del grupo que consiste en restos de aminoácidos alifáticos.
5. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que dicho ciclótido tiene un efecto antiproliferativo sobre una o varias células inmunes, y/o suprime/reduce la/s función/es efectora/s de una o varias células inmunes.
6. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicho ciclótido comprende:
- (i) una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, 5, 1, 4, 6, 2 y 3;
  - (ii) una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 7, 5, 1, 4, 6, 2 y 3; o
  - (iii) una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a cualquier secuencia de aminoácidos de (i) a (ii).
7. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que dicho ciclótido consiste en una forma ciclada de cabeza a cola de la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 o 2 que tiene
- (i) al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de sus restos de aminoácidos ácidos reemplazados por uno o varios restos de aminoácidos diferentes seleccionados del grupo que consiste en restos de aminoácido ácidos;
  - (ii) al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de sus restos de aminoácidos básicos reemplazados por uno o varios restos de aminoácidos diferentes seleccionados del grupo que consiste en restos de aminoácido básicos; y/o
  - (iii) al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 de sus restos de aminoácidos alifáticos reemplazados por uno o varios restos de aminoácidos diferentes seleccionados del grupo que consiste en restos de aminoácidos alifáticos.
8. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que dicho ciclótido es kalata B1 o kalata B2.
9. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que dicho ciclótido se va a administrar de modo que se produzca actividad citostática, pero no citotóxica.
10. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que dicho ciclótido se va a administrar en una cantidad de modo que se alcance una concentración (en suero) en el intervalo de 1 a 50 µM, preferentemente, en el intervalo de 3 a 10 µM, más preferentemente, de 4 a 9 µM, y todavía más preferentemente en el intervalo de 5 a 9 µM.

11. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que dicha composición farmacéutica comprende además uno o más inmunosupresores adicionales.

5 12. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que dicho inmunosupresor adicional es uno o más inmunosupresores seleccionados del grupo que consiste en Ciclosporina A, Muromonab-CD3 y Basiliximab.

10 13. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que dicho trastorno autoinmune se selecciona del grupo que consiste en:

- (i) esclerosis múltiple;
- (ii) soriasis;
- (iii) lupus eritematoso sistémico;
- (iv) síndrome de Sjögren;
- 15 (v) artritis reumatoide;
- (vi) púrpura trombocitopénica idiopática;
- (vii) diabetes;
- (viii) vasculitis; y
- 20 (ix) enfermedad de Crohn.

14. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que dicha inflamación mediada por linfocitos es una inflamación mediada por linfocitos T.

25 15. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en la que dicha inflamación mediada por linfocitos es queratoconjuntivitis seca o síndrome del ojo seco (DES).

16. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en la que dicha secuencia de aminoácidos de dicho ciclótido está marcada (radiactivamente, fluorescentemente o con biotina).

30 17. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en la que

- (i) la proliferación de una o varias células inmunes;
- 35 (ii) la/s función/es efector/as de una o varias células inmunes;
- (iii) la desgranulación/citotoxicidad de una o varias células inmunes;
- (iv) la expresión de un receptor superficial de citocinas en una o varias células inmunes;
- (v) la proliferación de linfocitos activados (primarios);
- (vi) la proliferación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC);
- 40 (vii) la secreción/producción de IL-2, IFN-gamma y/o TNF-alfa;
- (viii) la desgranulación/citotoxicidad de PBMC CD107a<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>; y/o
- (ix) la expresión del receptor superficial de IL-2 CD25

se va/n a suprimir.

45 18. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, en la que dicho ciclótido

- (i) es capaz de suprimir/reducir la secreción/producción de IL-2, IFN-gamma y/o TNF-alfa;
- 50 (ii) es capaz de suprimir/reducir la desgranulación/citotoxicidad de PBMC CD107a<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>; y/o
- (iii) es capaz de suprimir/reducir la expresión del receptor superficial de IL-2 CD25.

55 19. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en la que el efecto antiproliferativo o la supresión/reducción están mediados de una manera dependiente de IL-2, IFN-gamma y/o TNF-alfa y/o pueden ser antagonizados por IL-2.

60 20. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 y 9 a 19, en la que dicho ciclótido de tipo kalata B no injertado es un ciclótido mutado que tiene la misma mutación que una cualquiera de SEQ ID NO: 4 a 7.

Figura 1

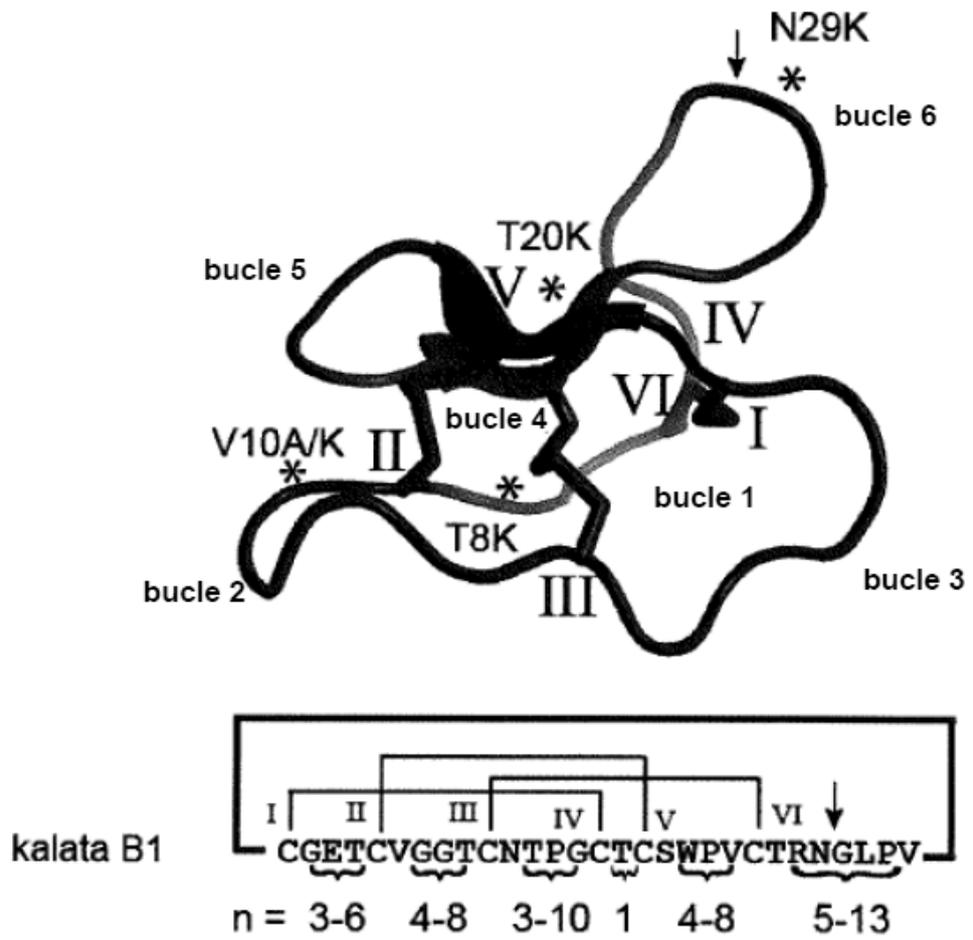


Figura 2

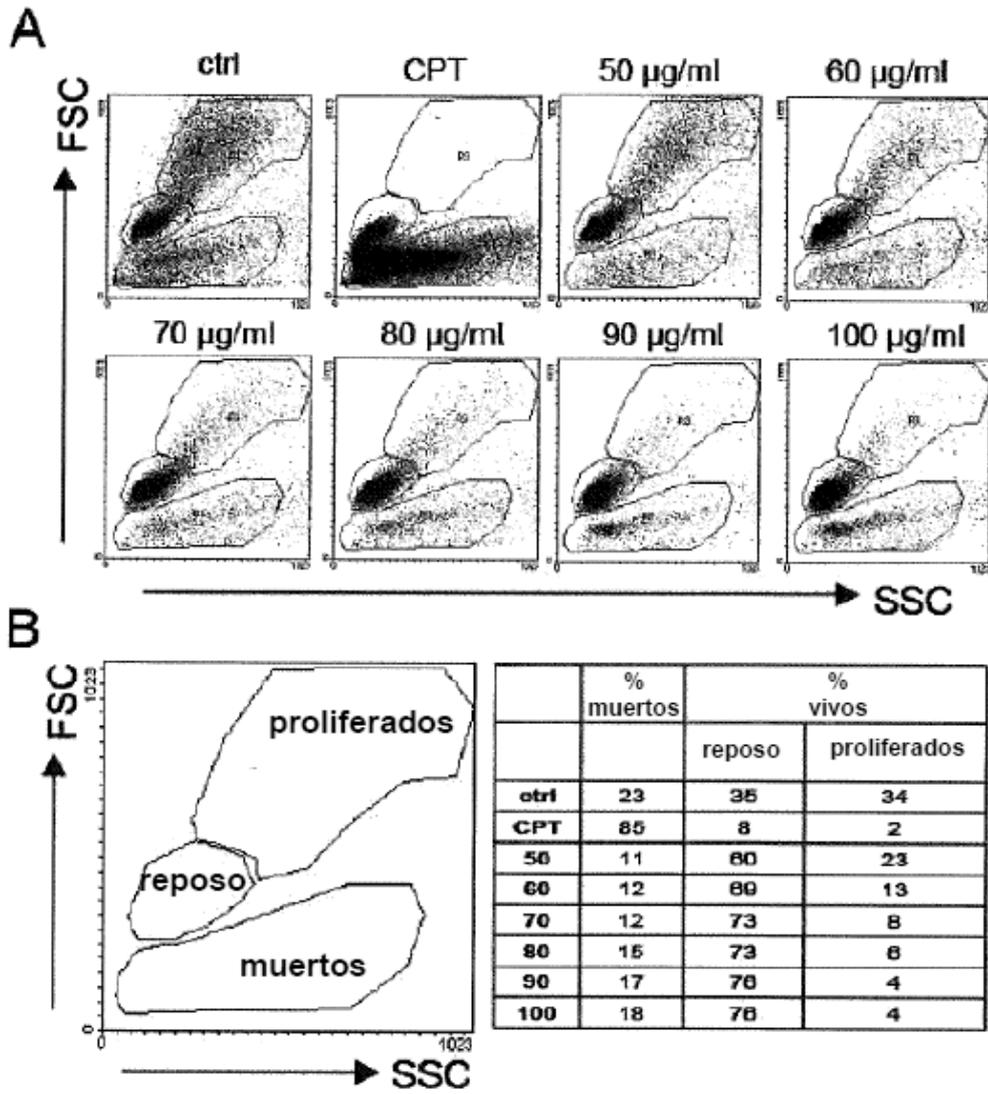


Figura 2 (continuación)

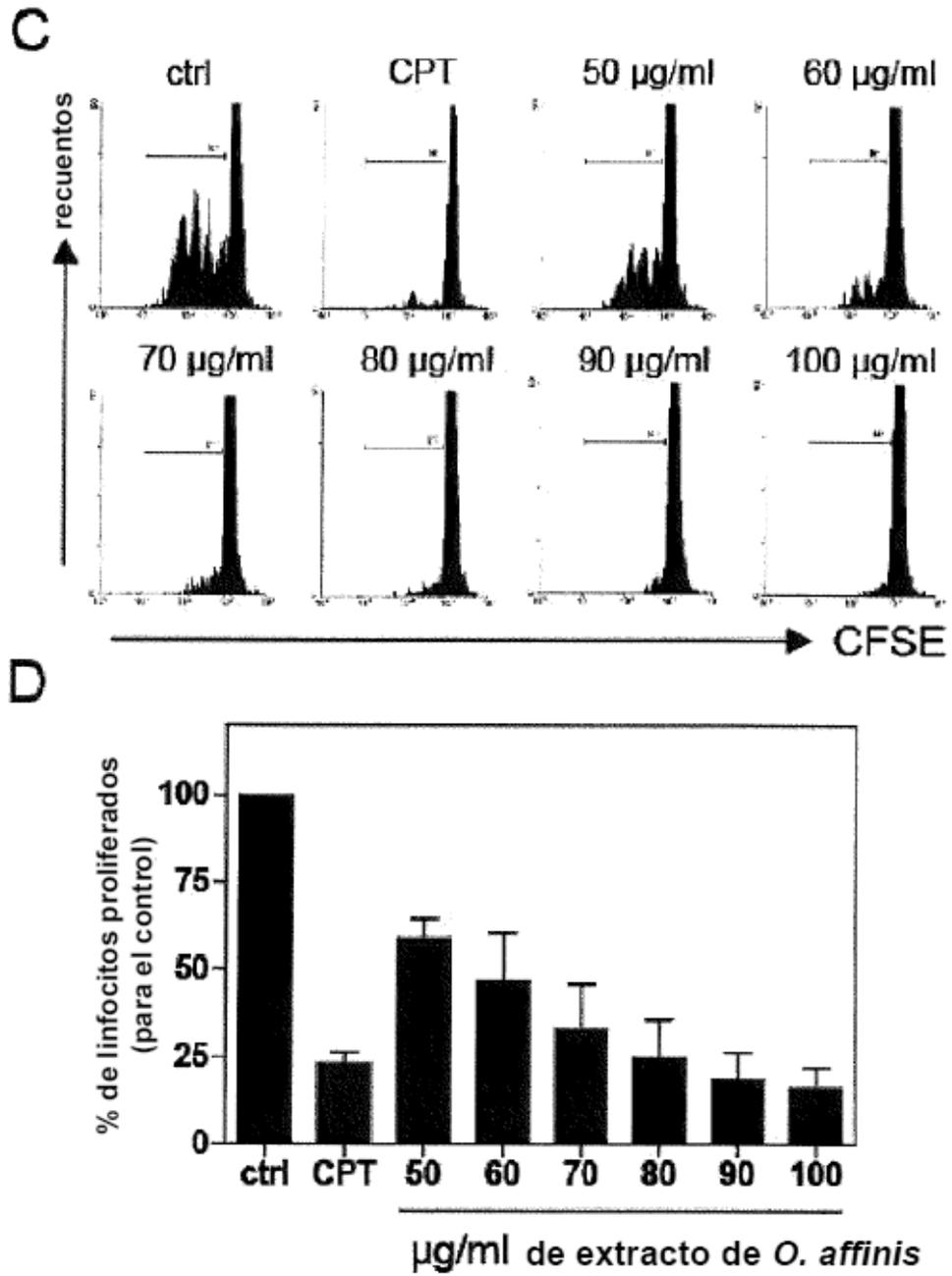


Figura 3

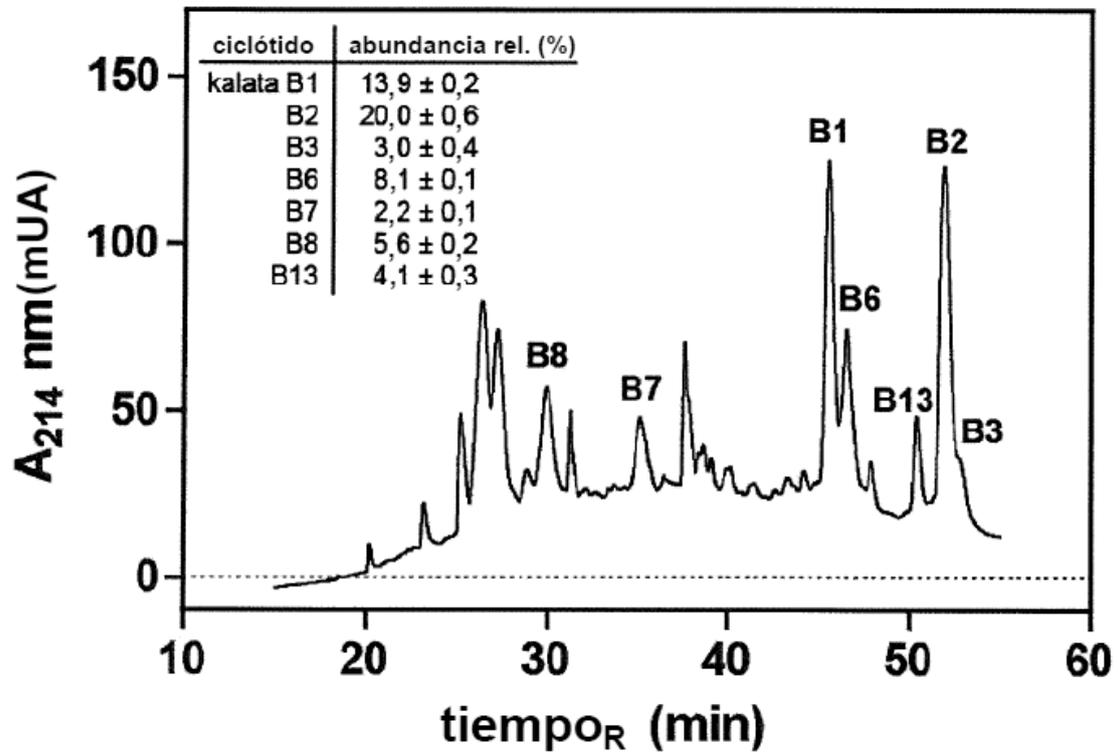


Figura 4

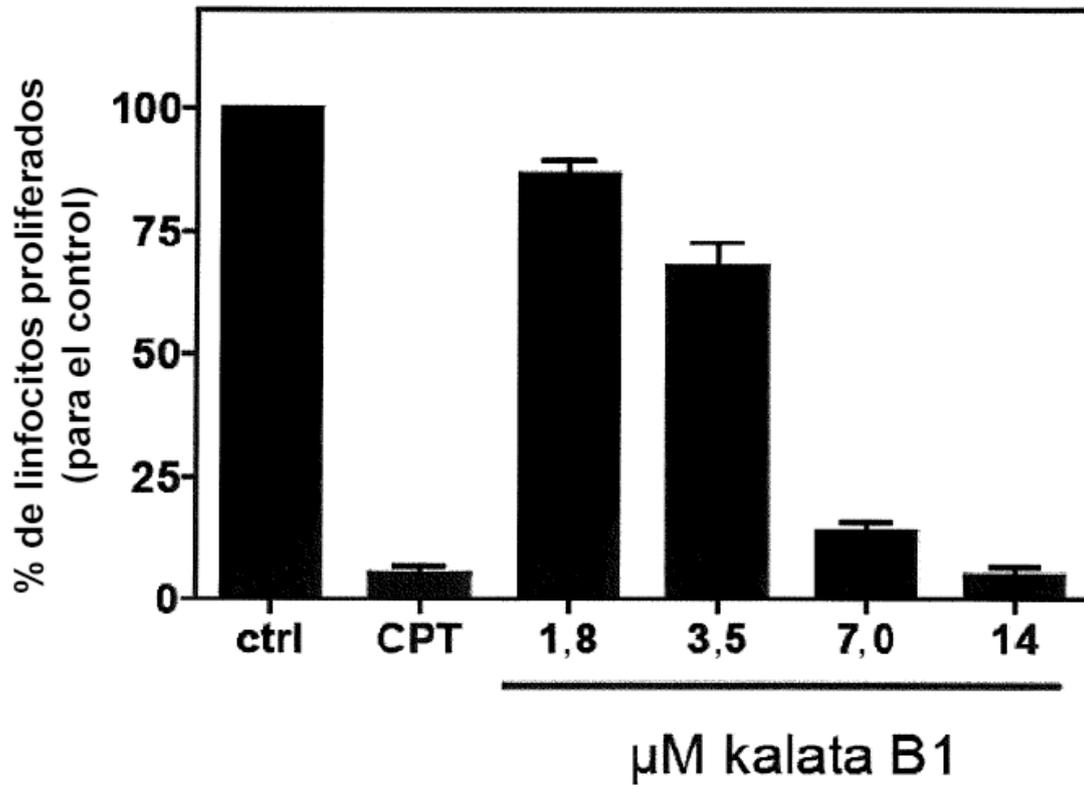


Figura 5

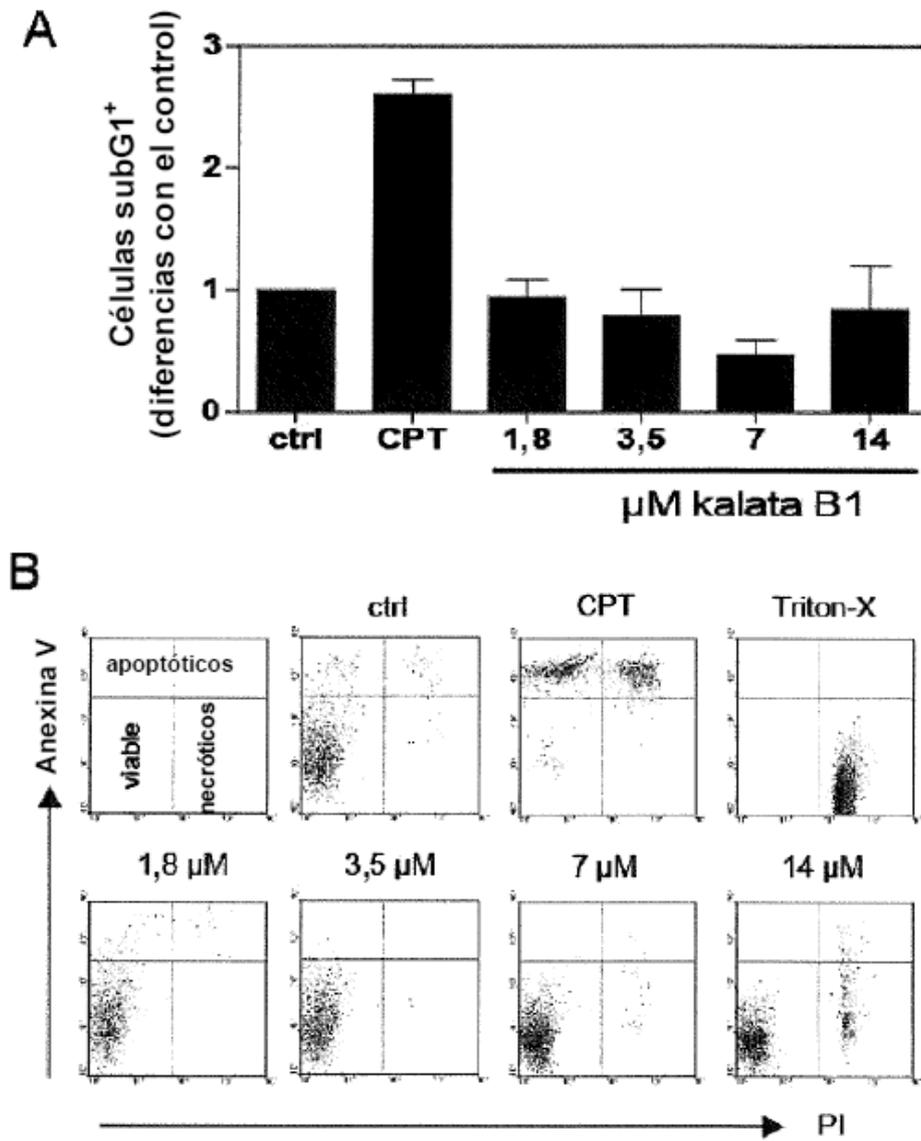


Figura 5 (continuación)

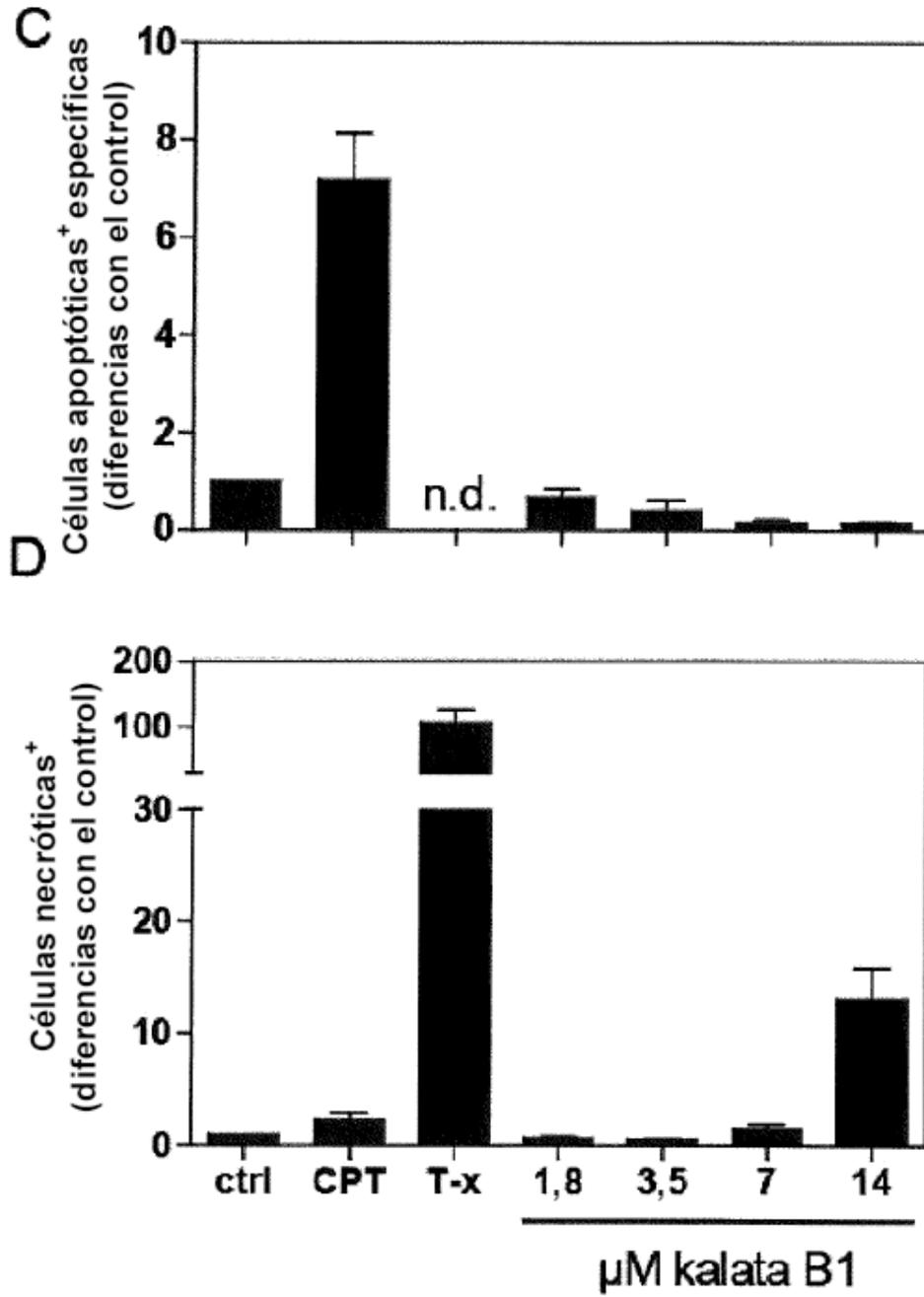


Figura 6

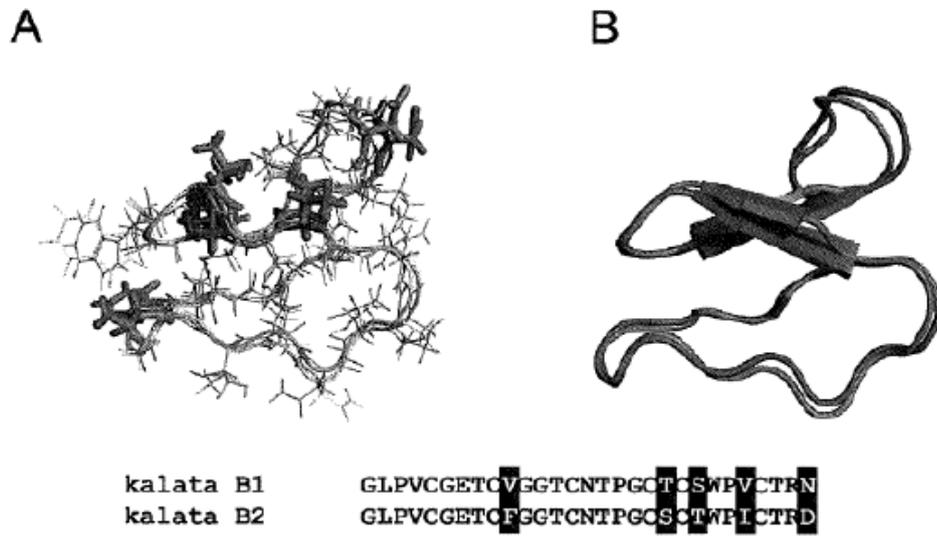


Figura 7

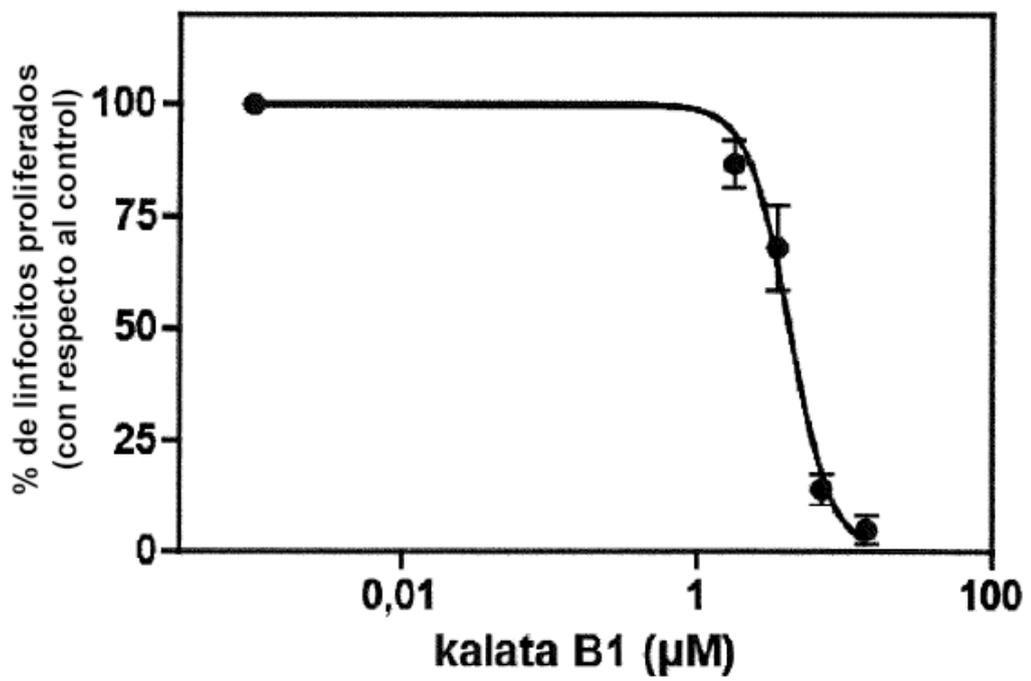


Figura 8

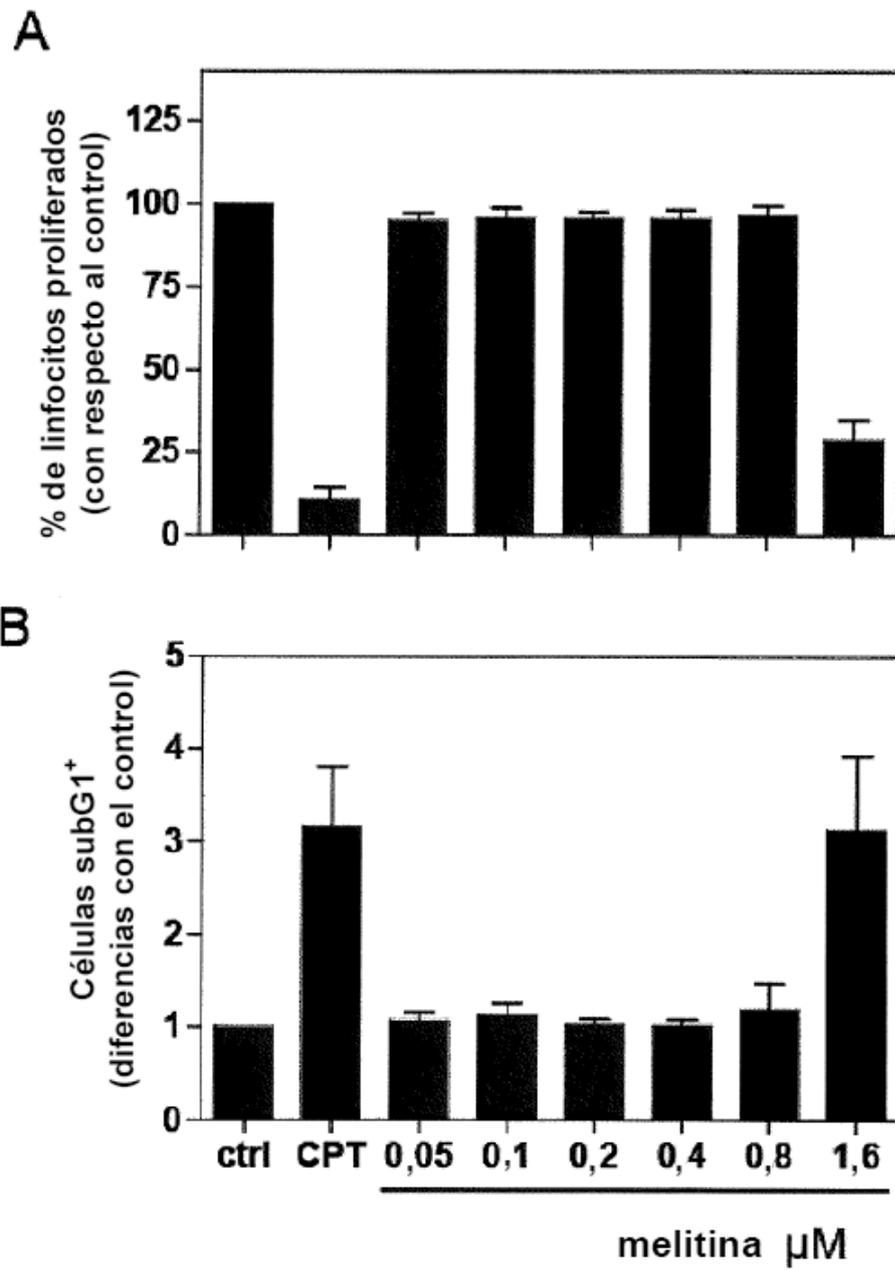


Figura 8 (continuación)

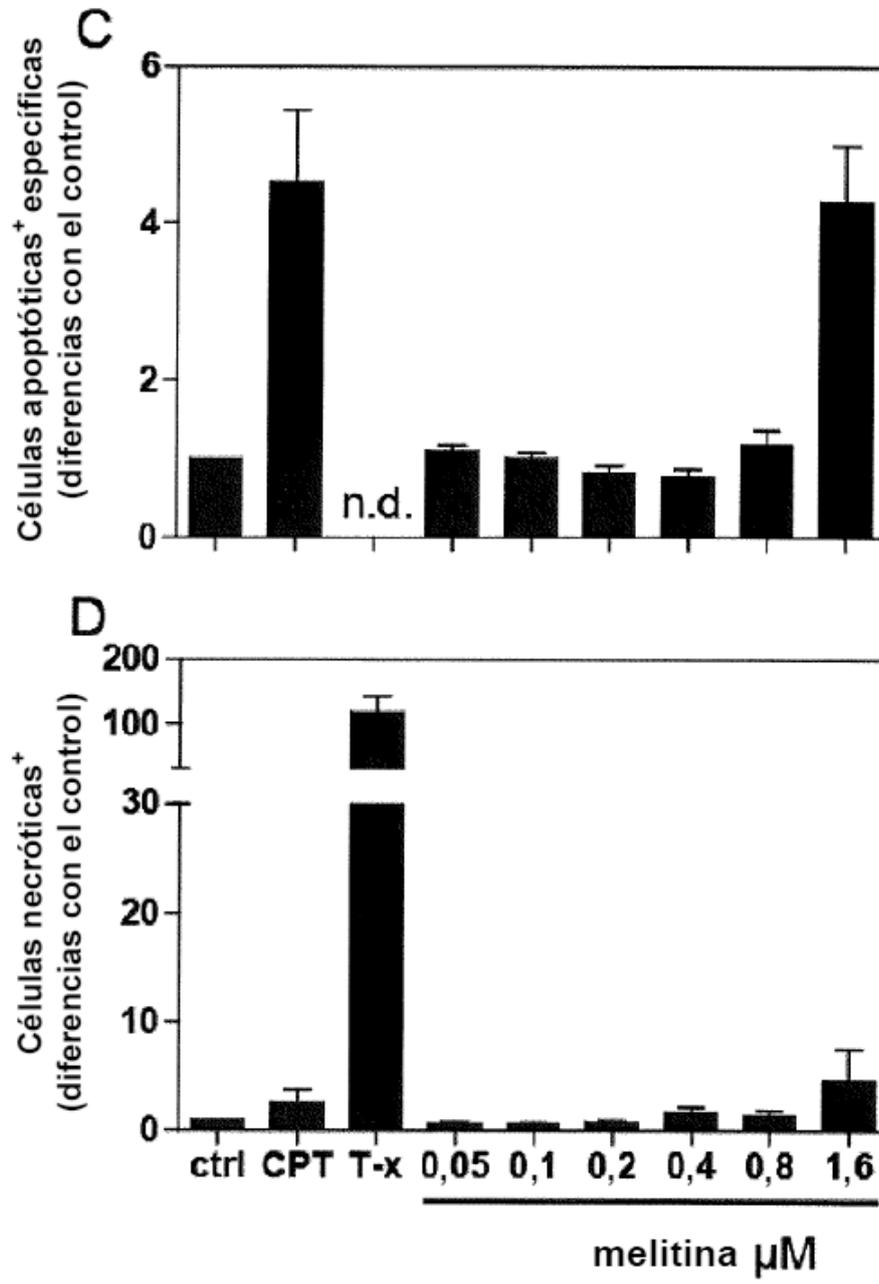


Figura 9

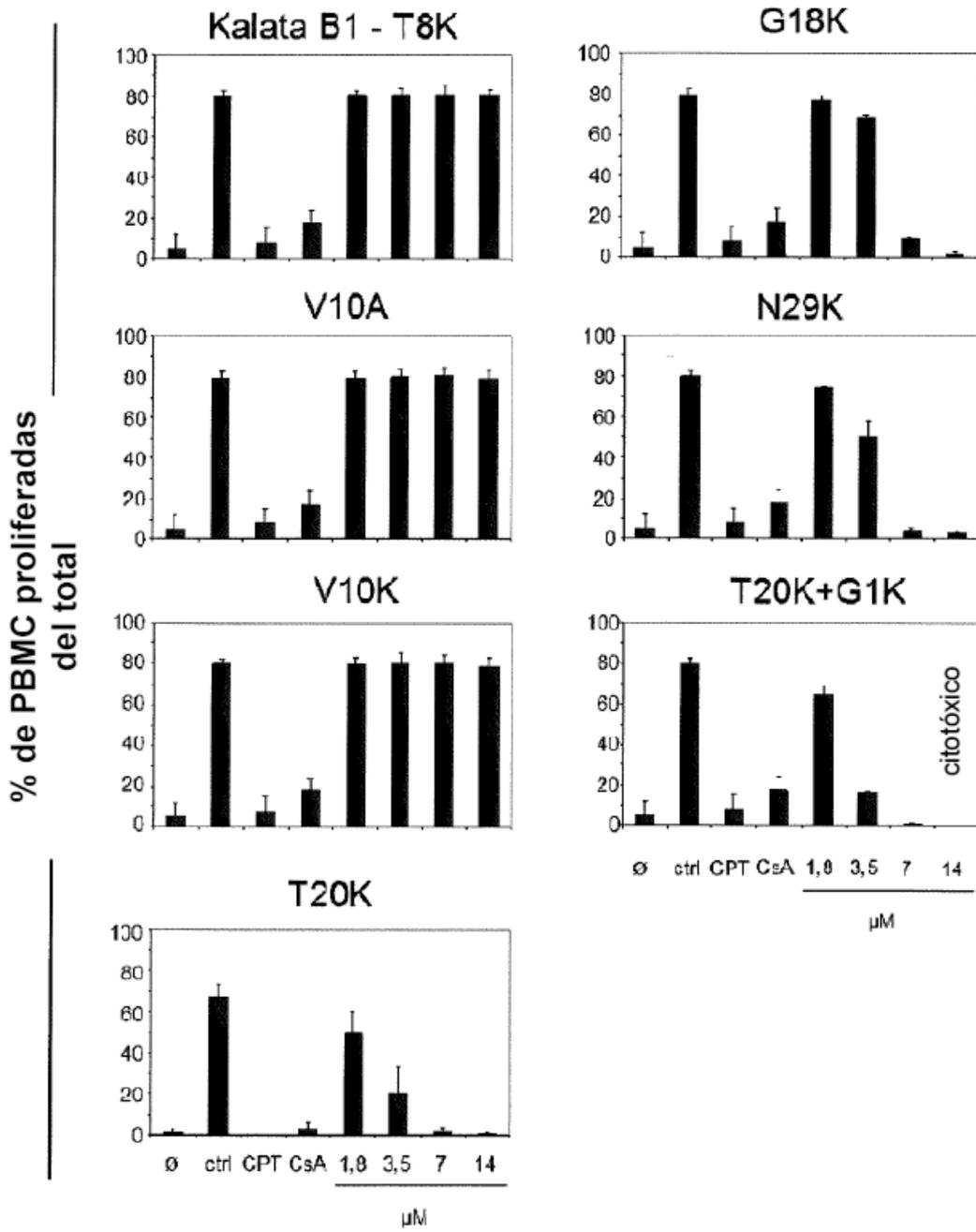
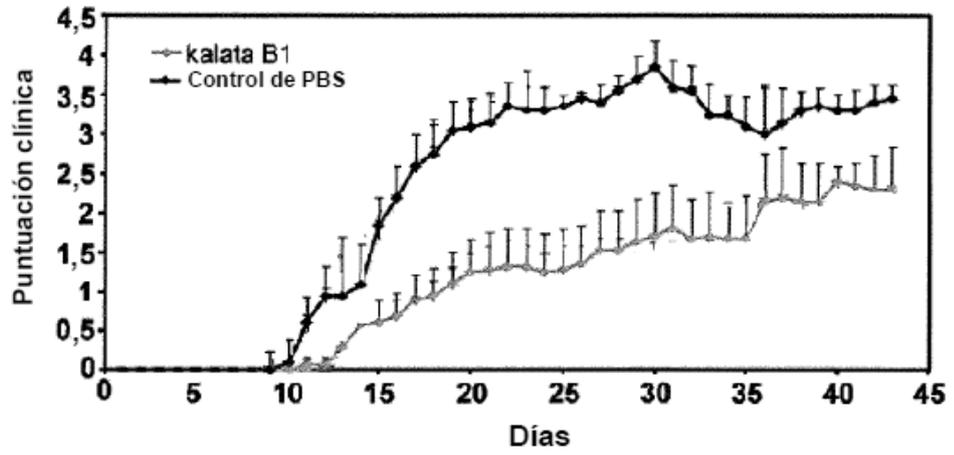


Figura 10

A



B

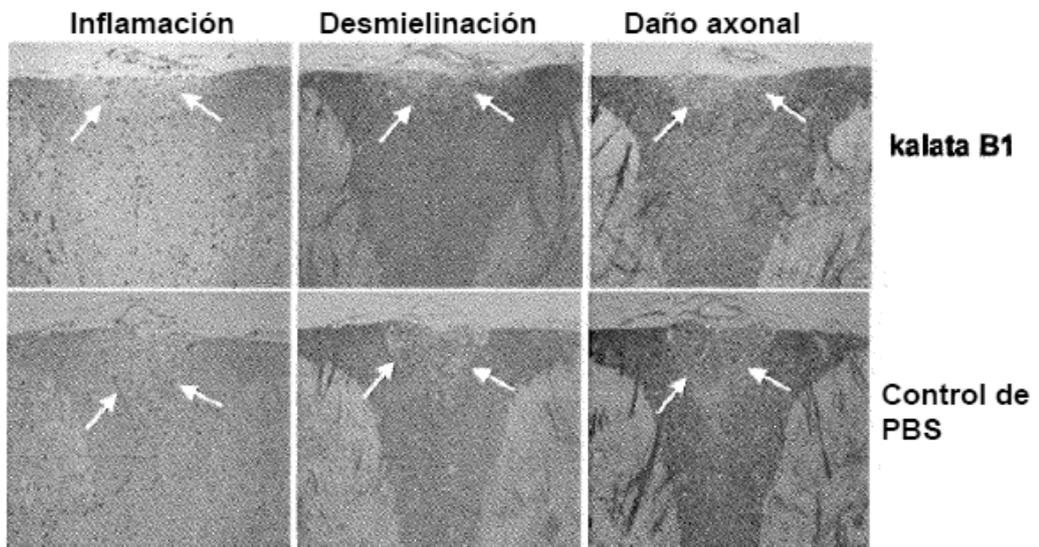


Figura 10 (continuación)

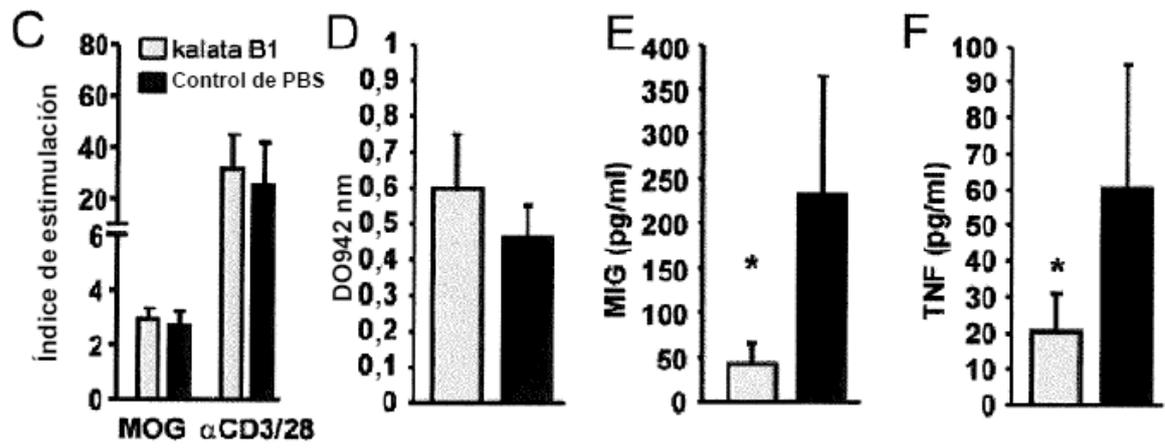


Figura 11

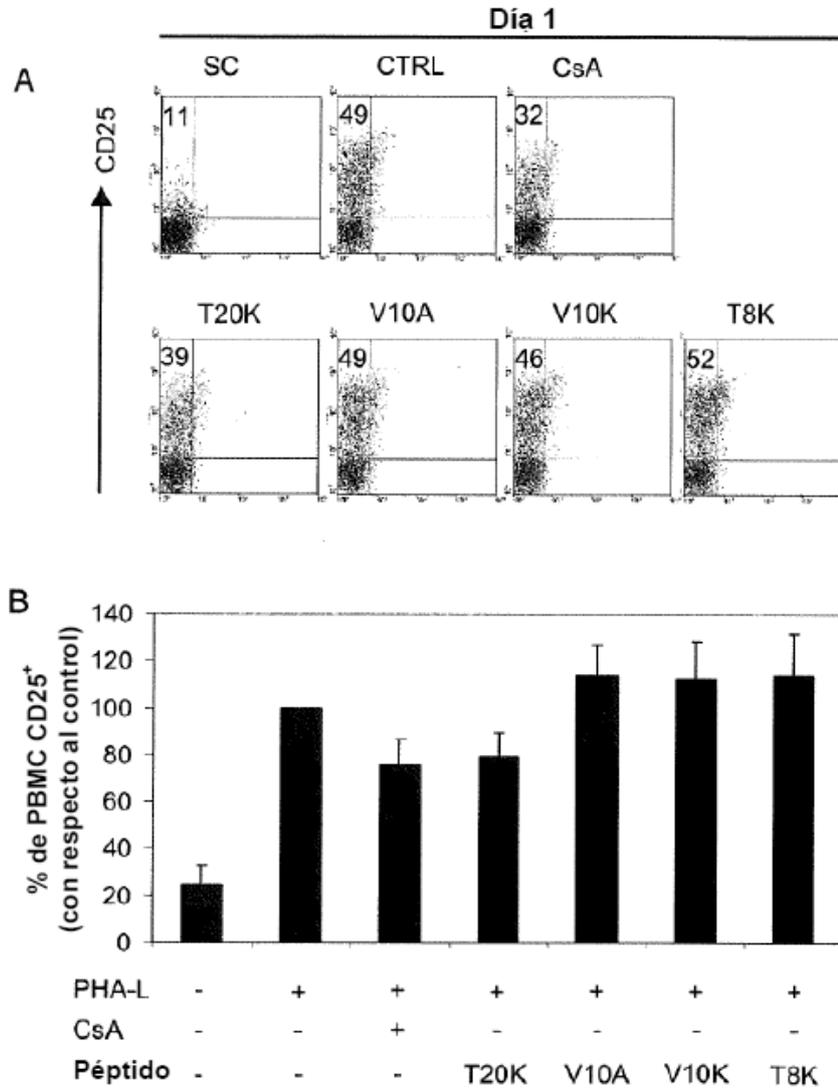


Figura 11 (continuación)

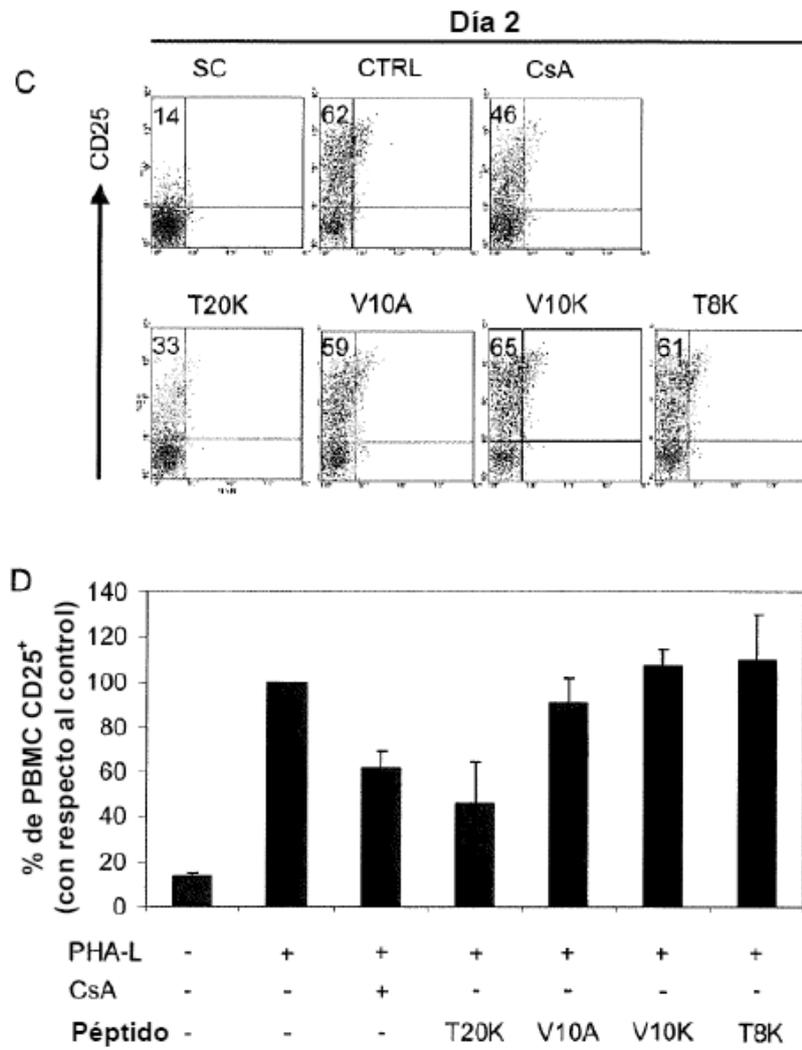
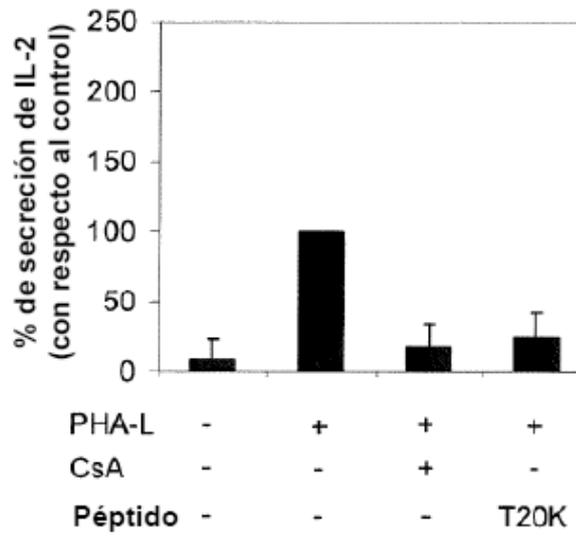


Figura 12

A



B

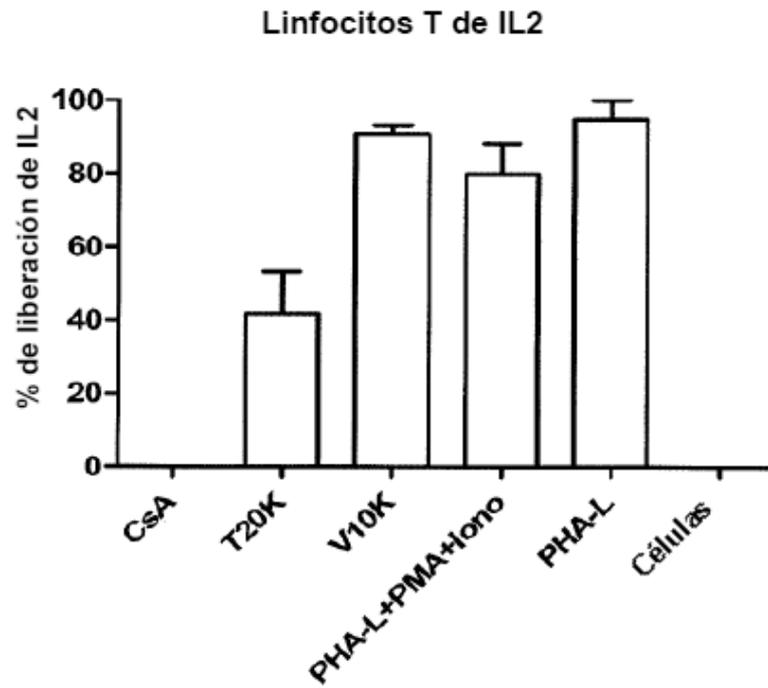


Figura 12 (continuación)

C

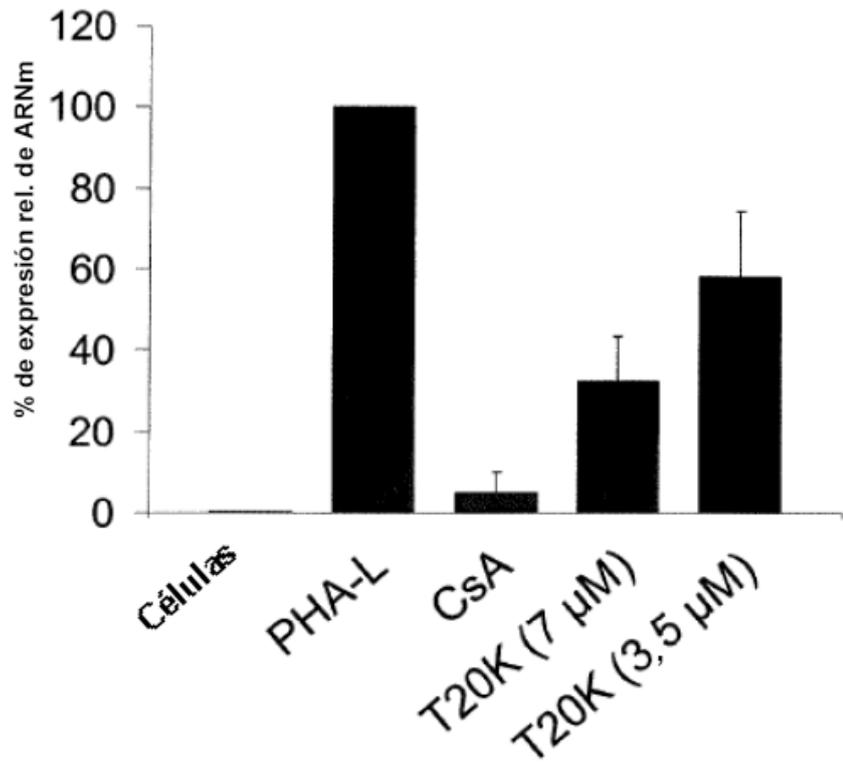


Figura 13

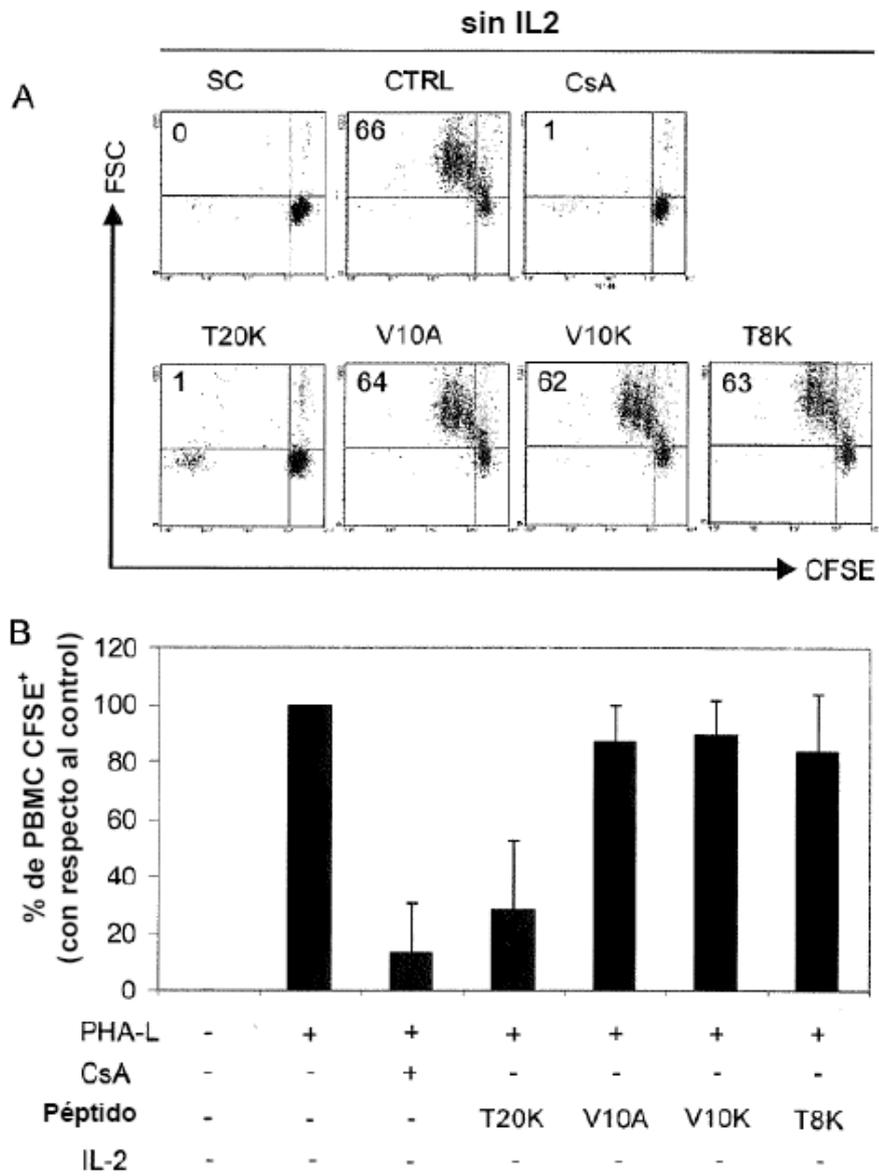


Figura 13 (continuación)

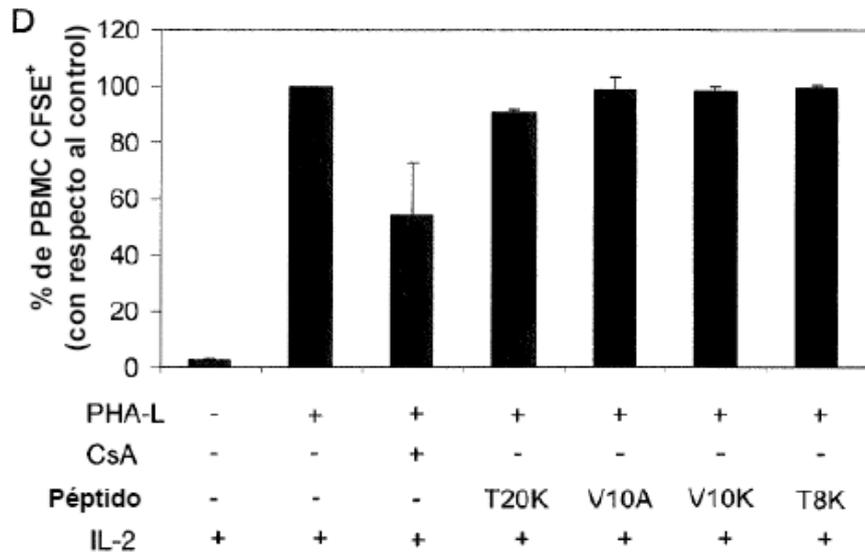
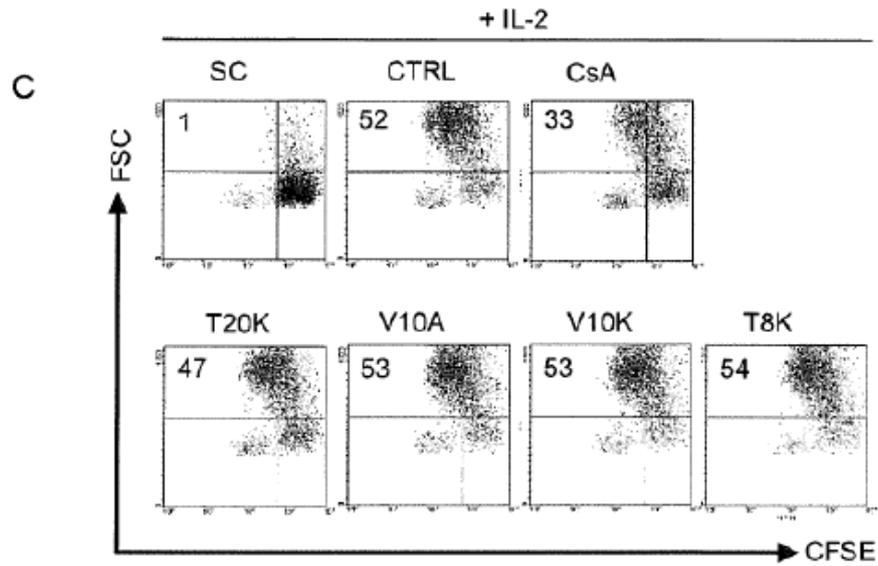
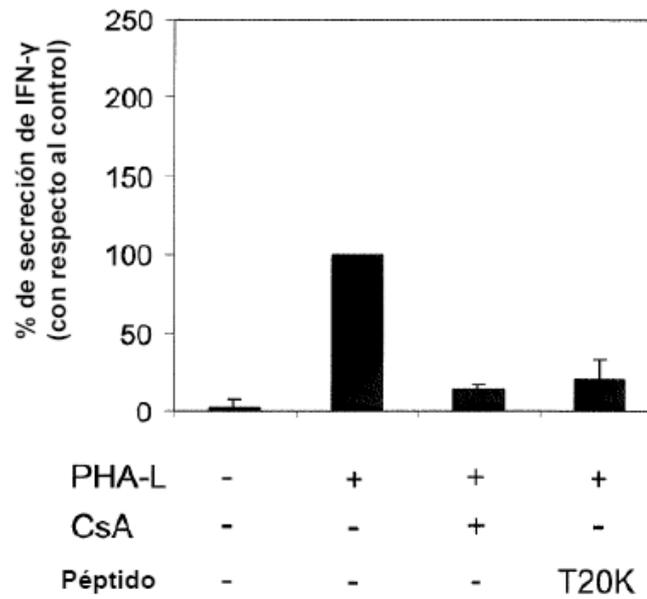


Figura 14

24 h



36 h

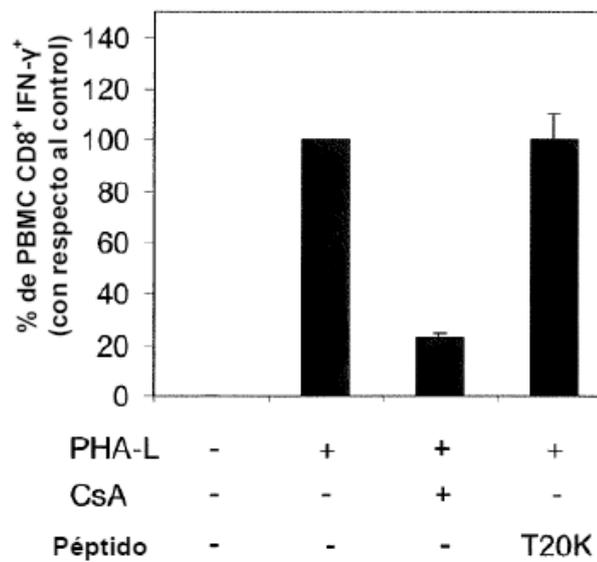
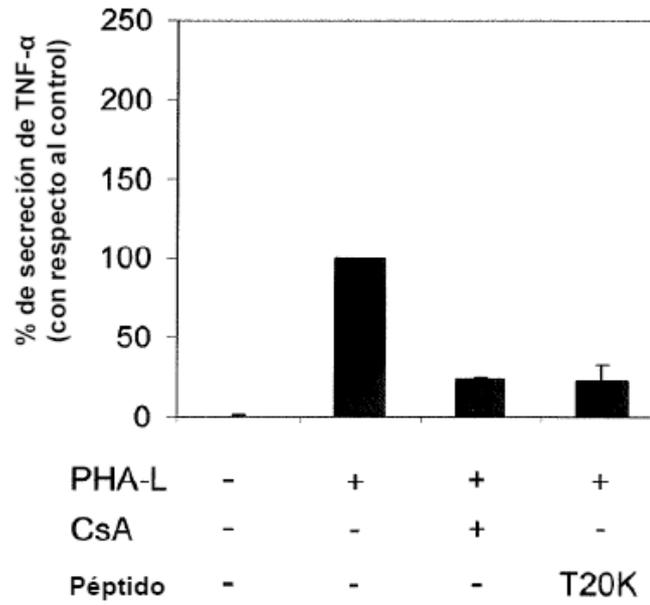


Figura 15

24 h



36 h

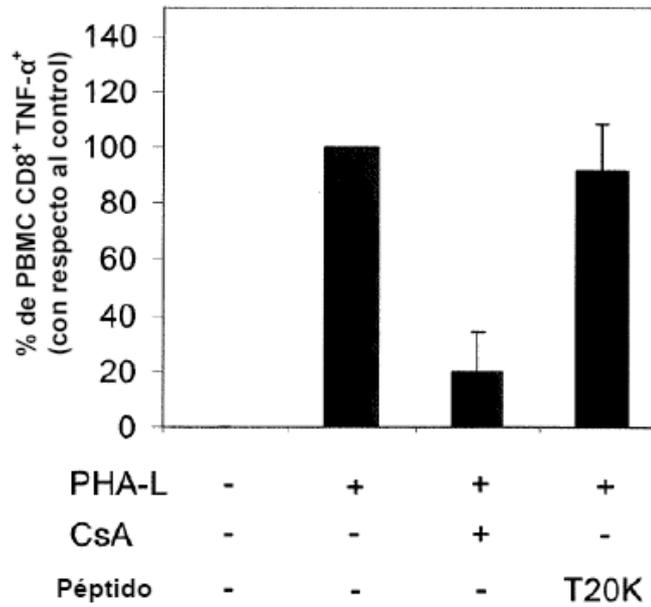


Figura 16

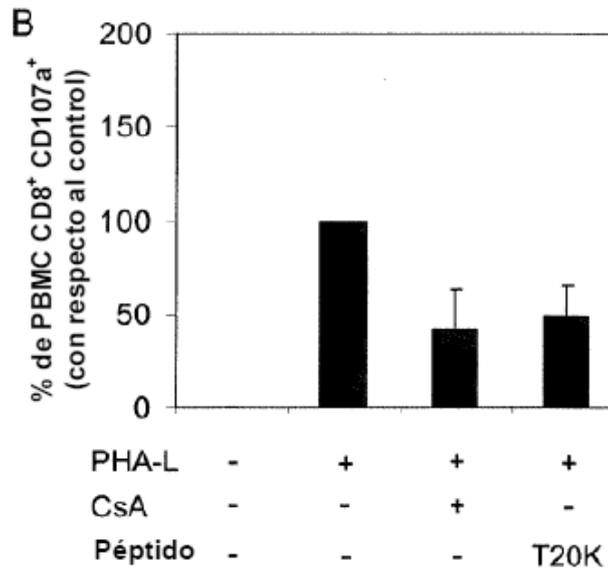
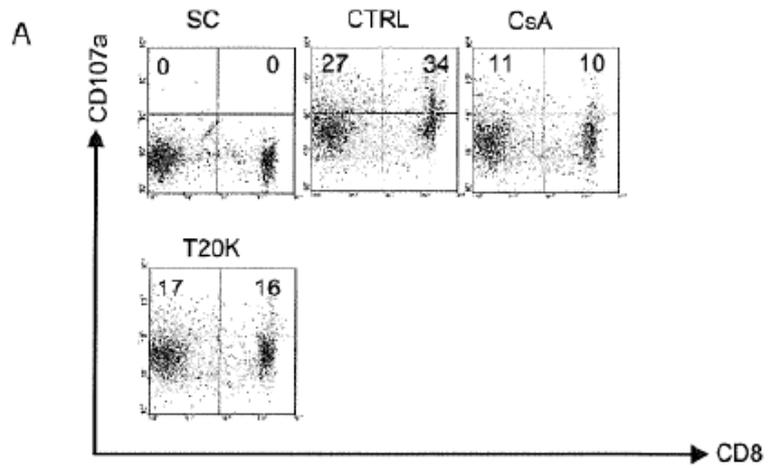
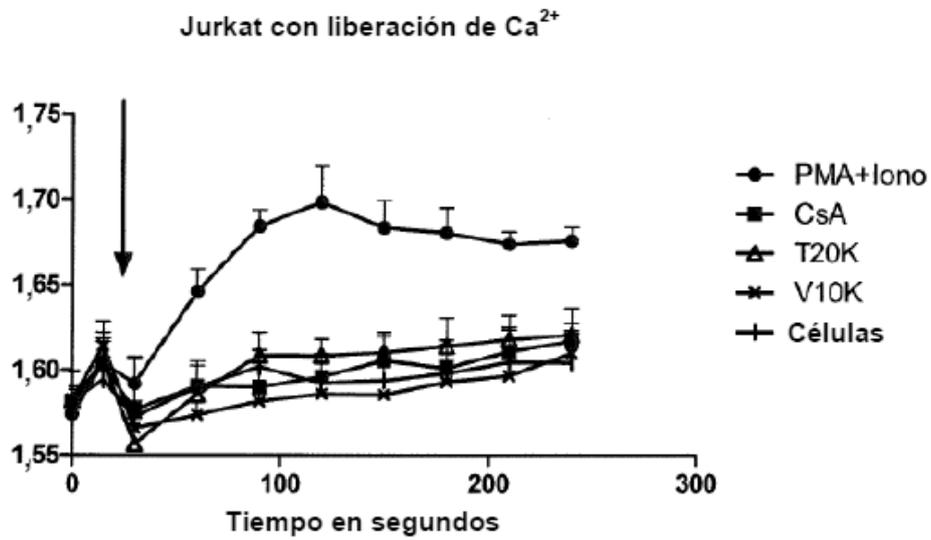


Figura 17

A



B

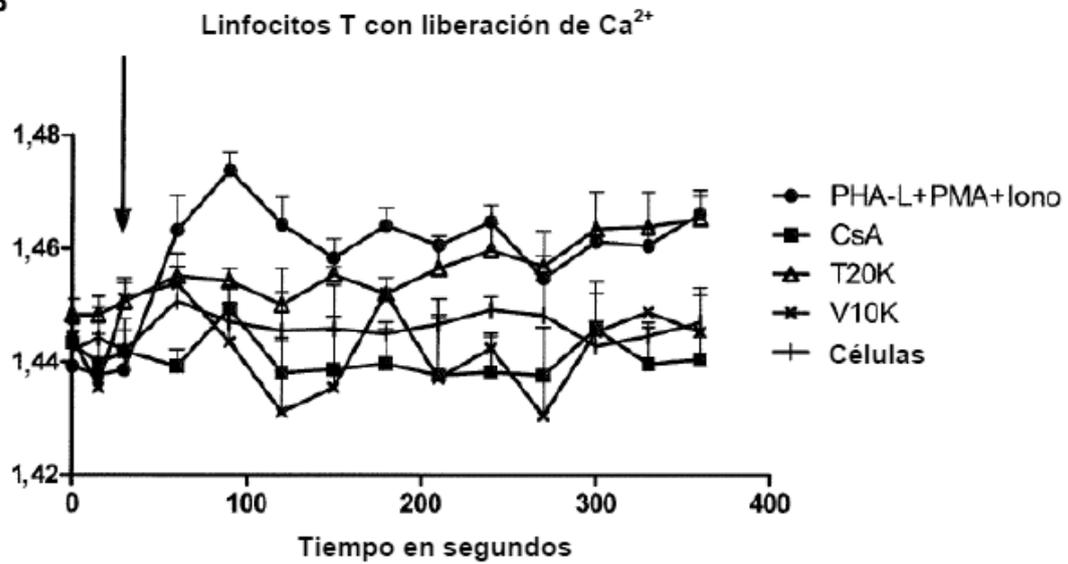
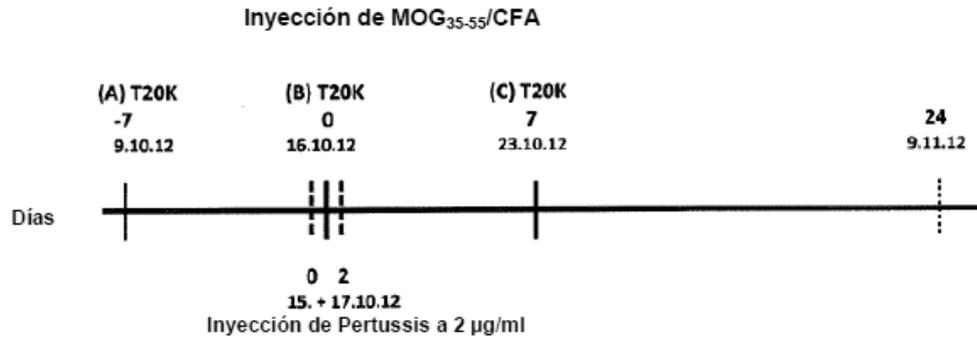


Figura 18



A. T20K	10 mg/kg T20K	PBS	i.p. n=10
B. T20K	10 mg/kg T20K	PBS	i.p. n=10
C. T20K	10 mg/kg T20K	PBS	i.p. n=10
D. No tratado previamente			n=10

Figura 19

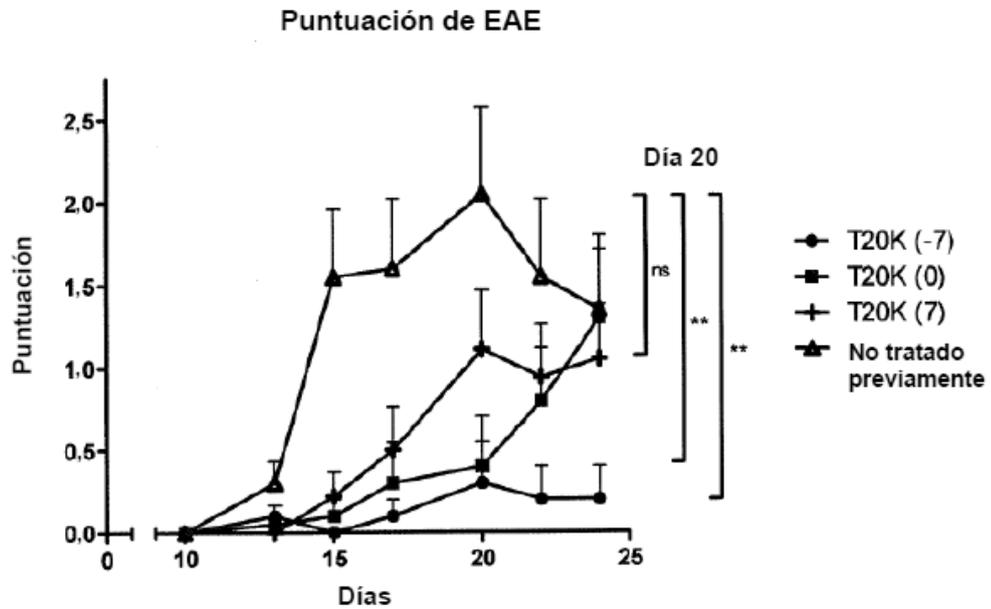


Figura 20

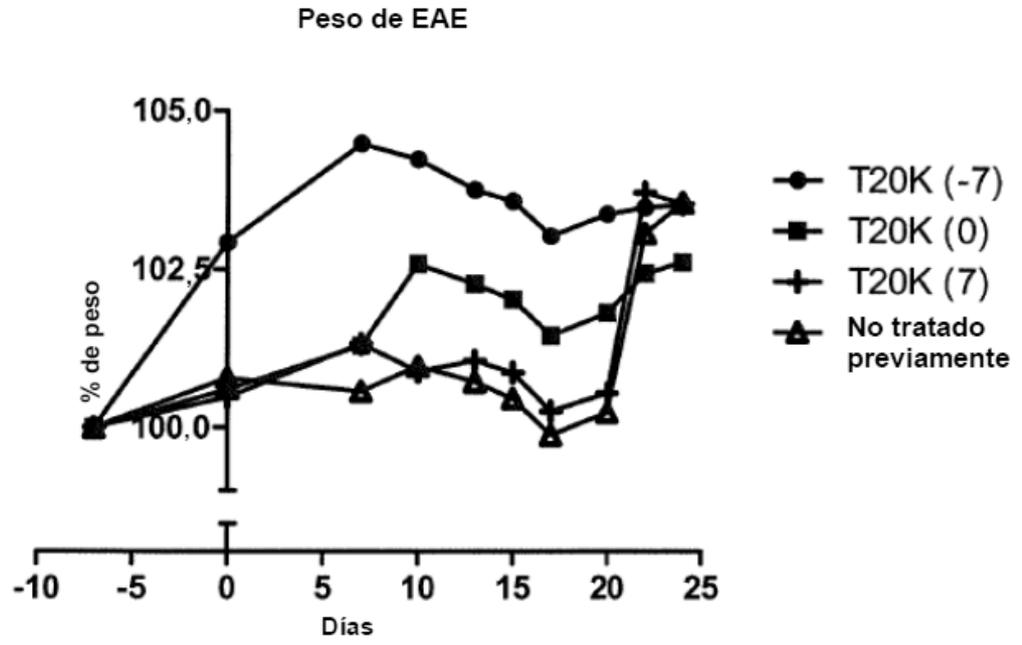
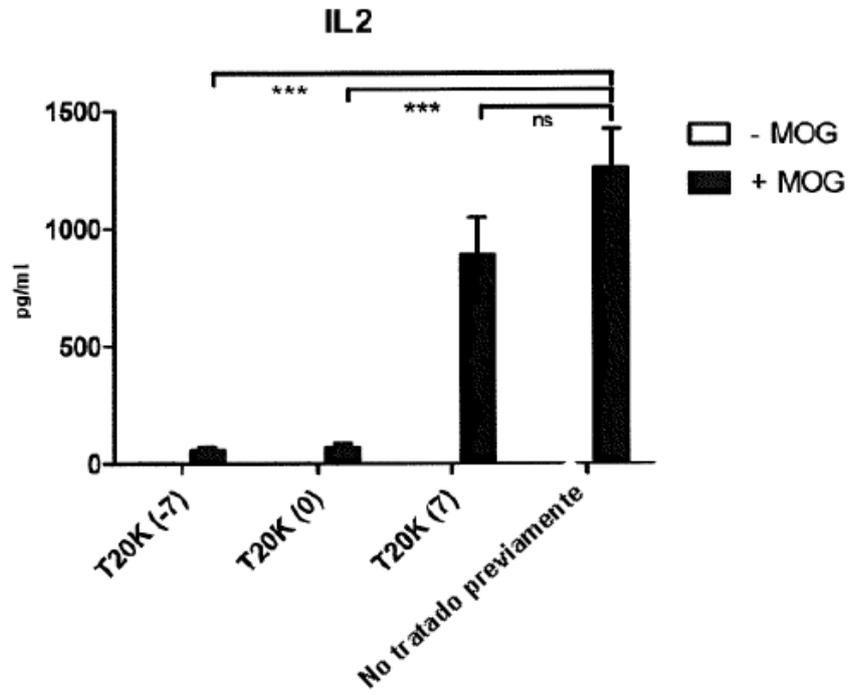


Figura 21

A



B

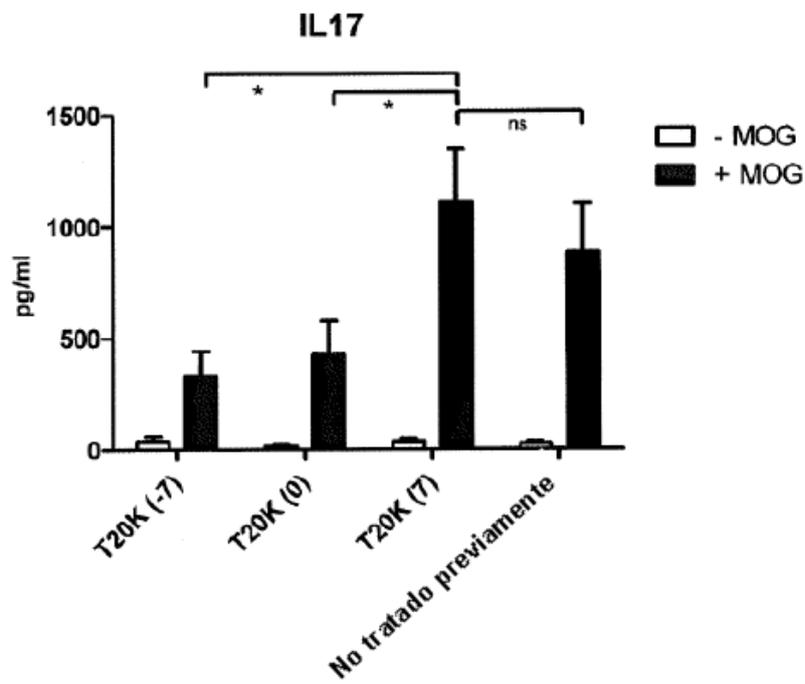
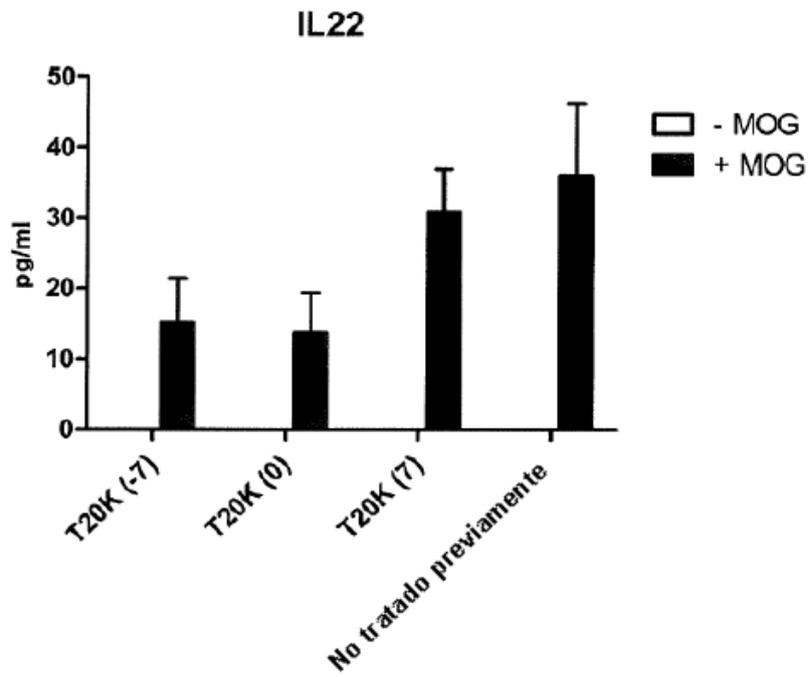


Figura 21 (continuación)

C



D

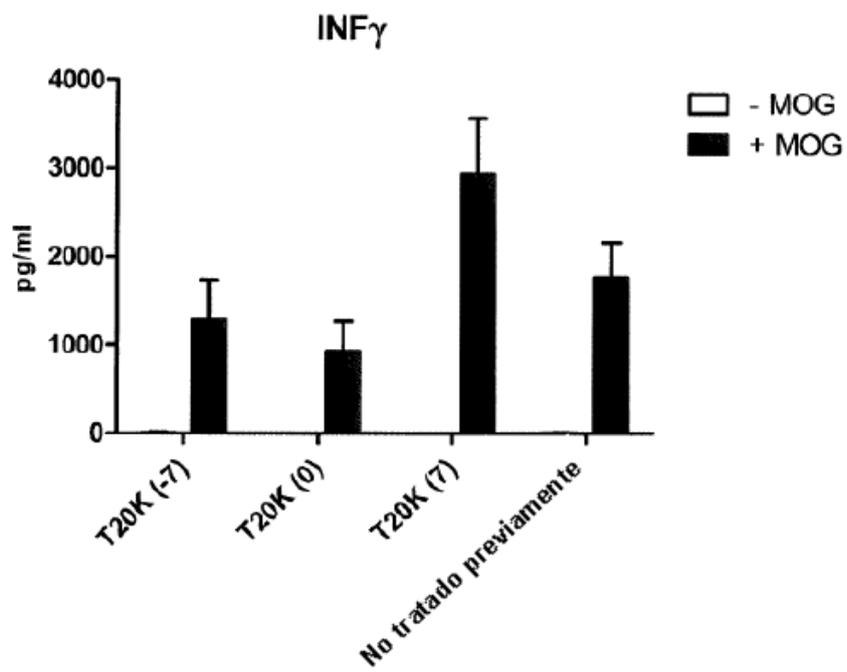


Figura 21 (continuación)

E

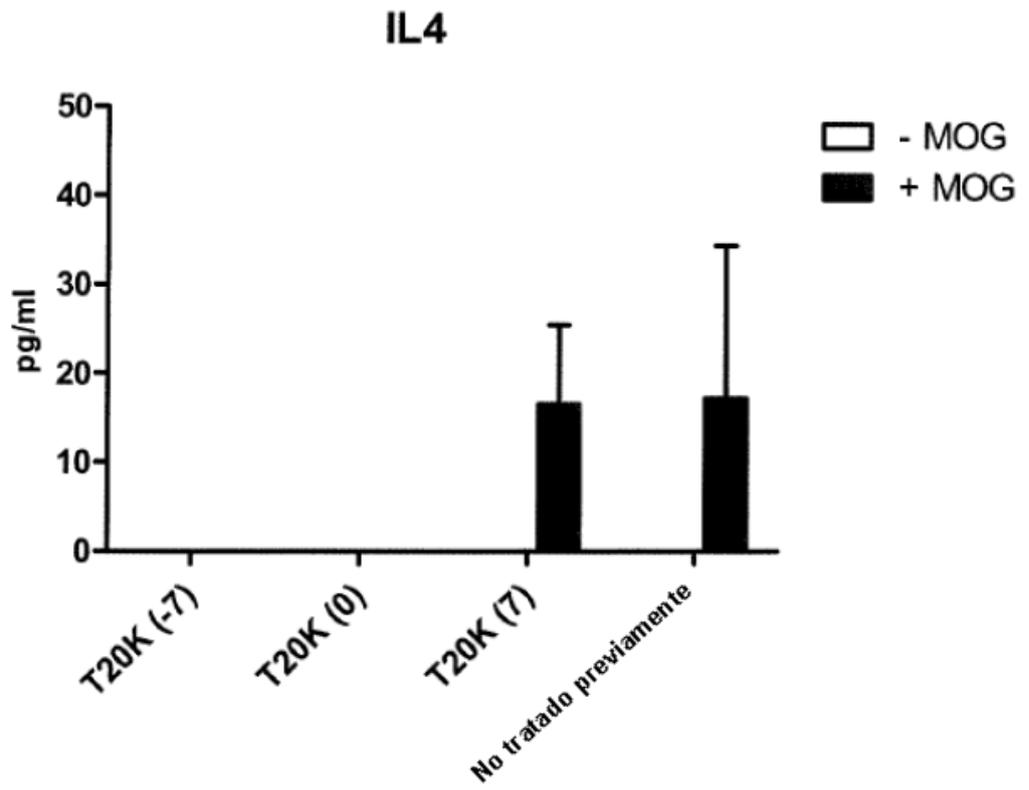
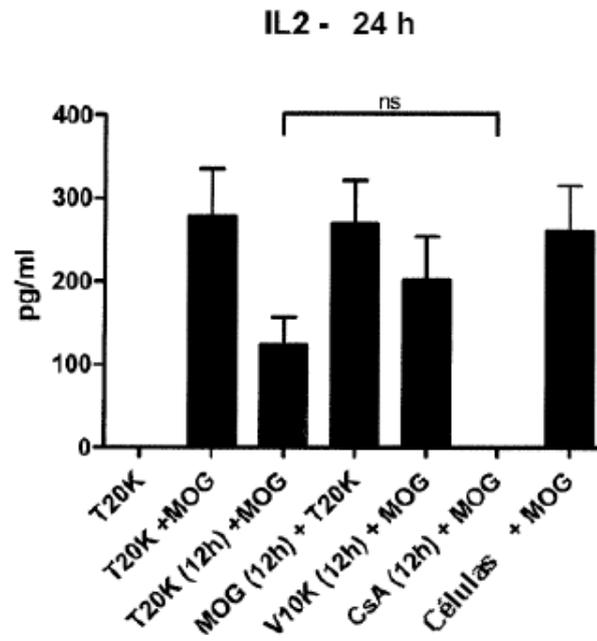


Figura 22

A



B

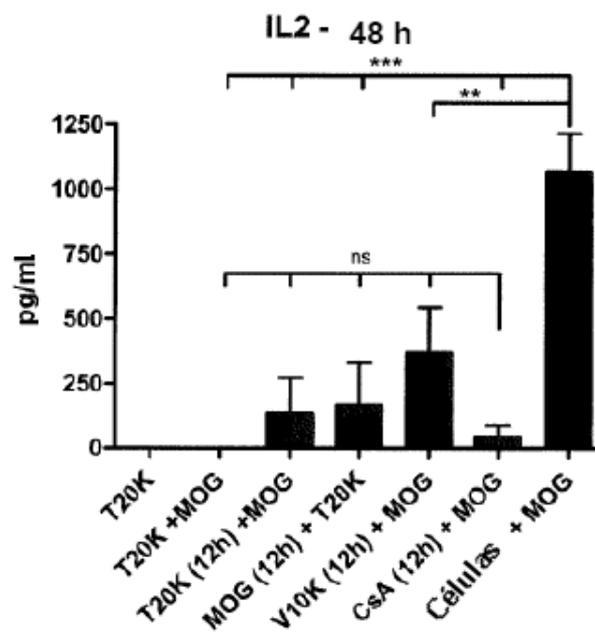
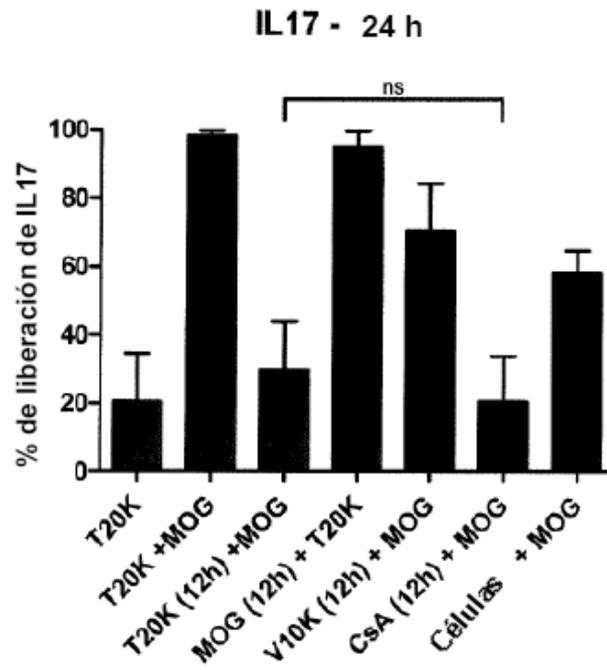


Figura 22 (continuación)

C



D

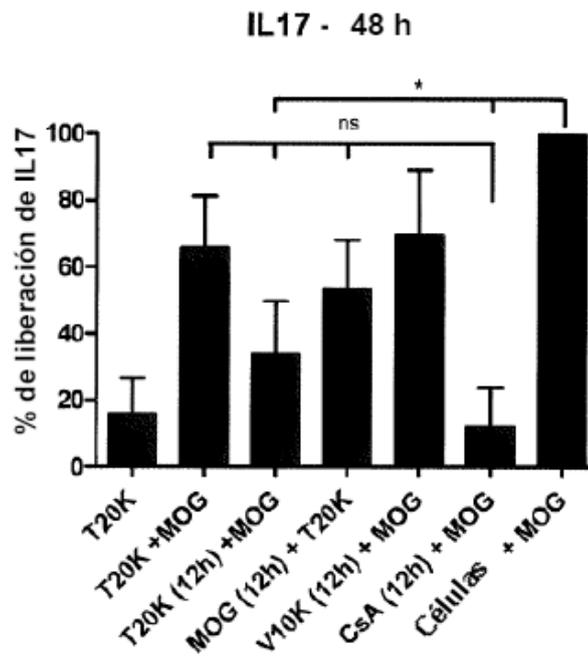
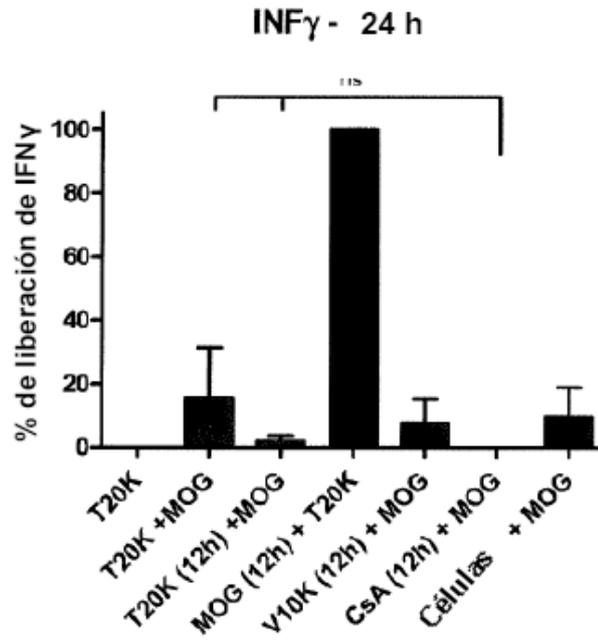


Figura 22 (continuación)

E



F

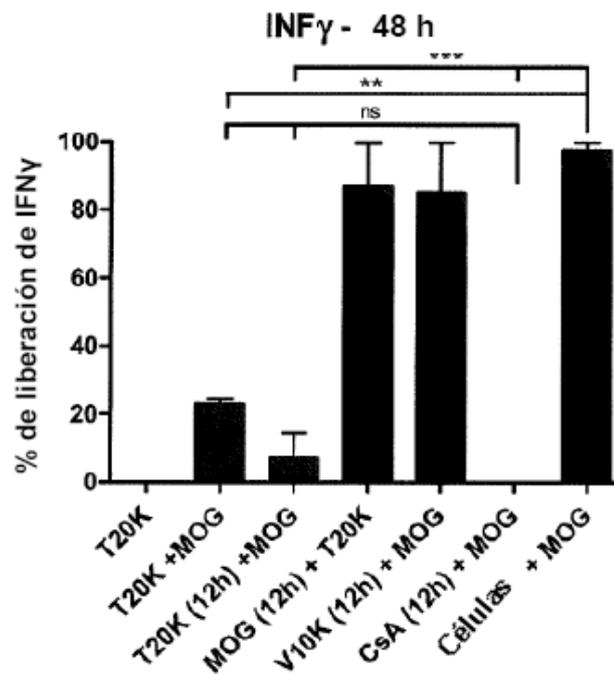
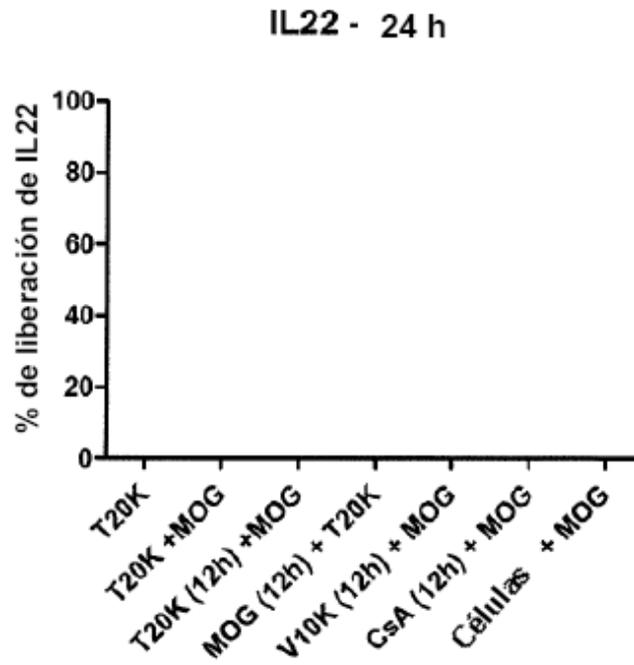


Figura 22 (continuación)

G



H

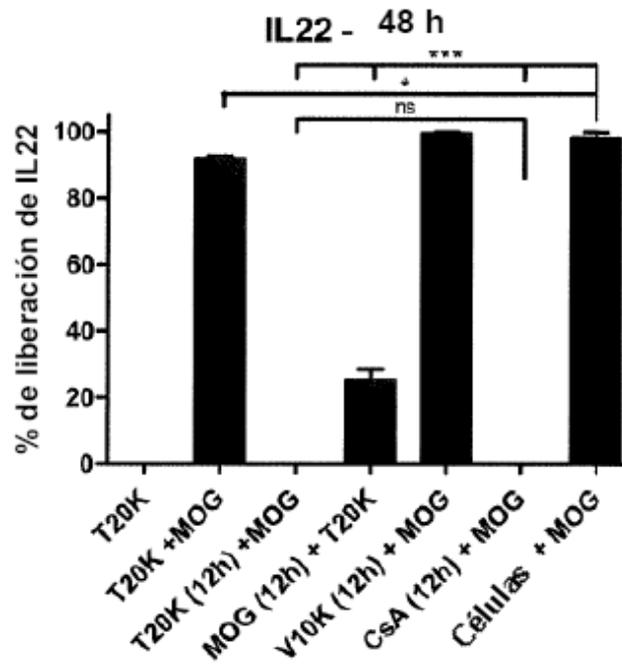
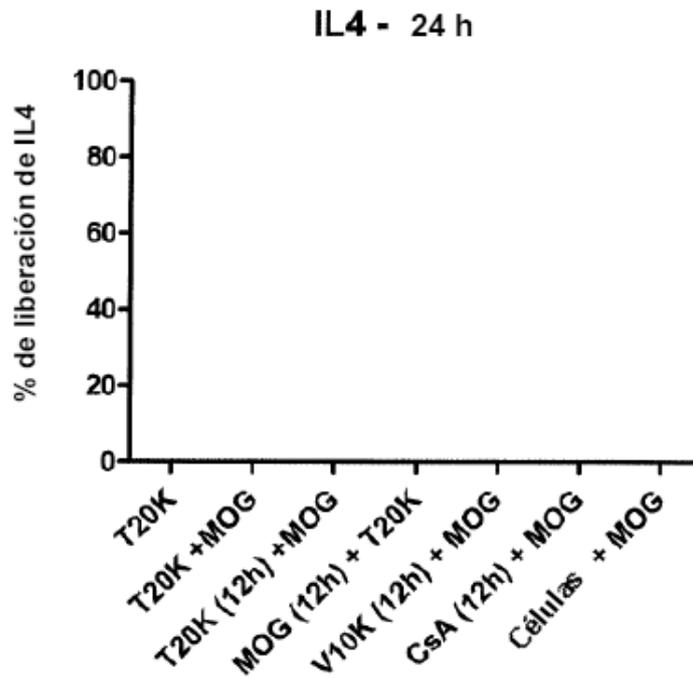


Figura 22 (continuación)

I



J

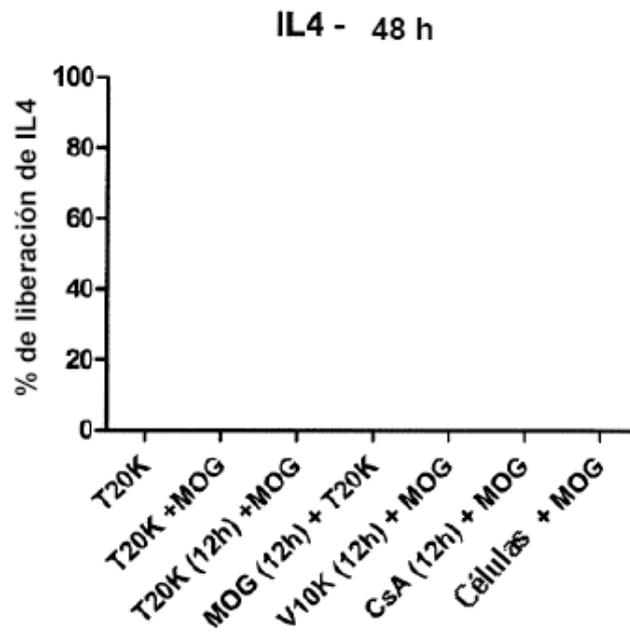
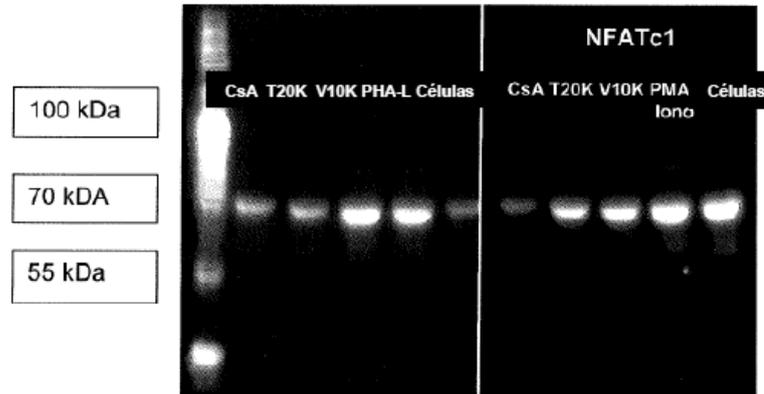


Figura 23

A

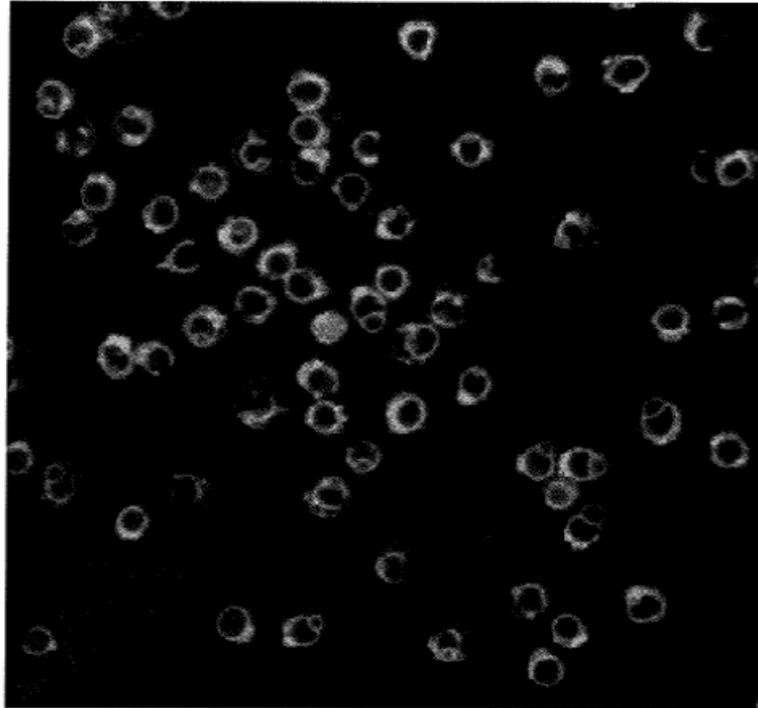


B



Figura 24

A



B

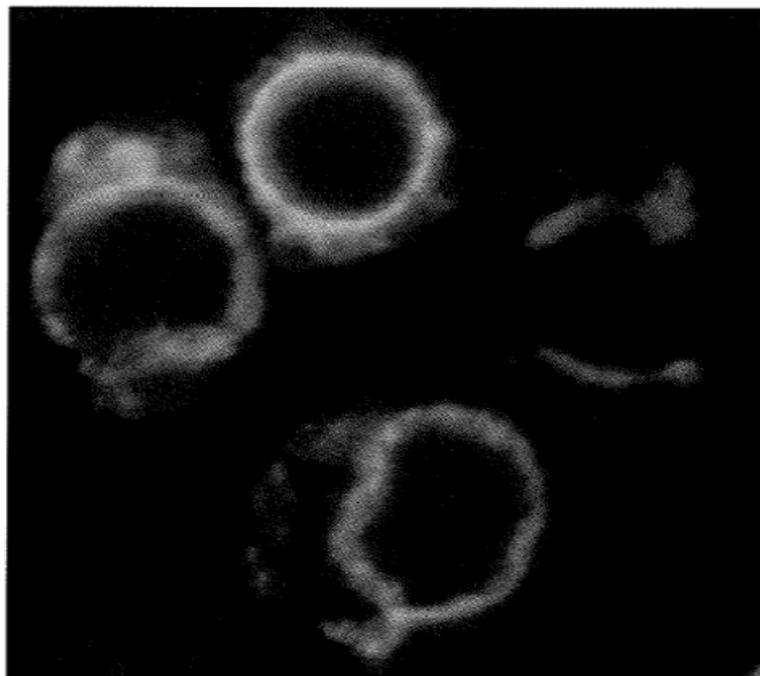
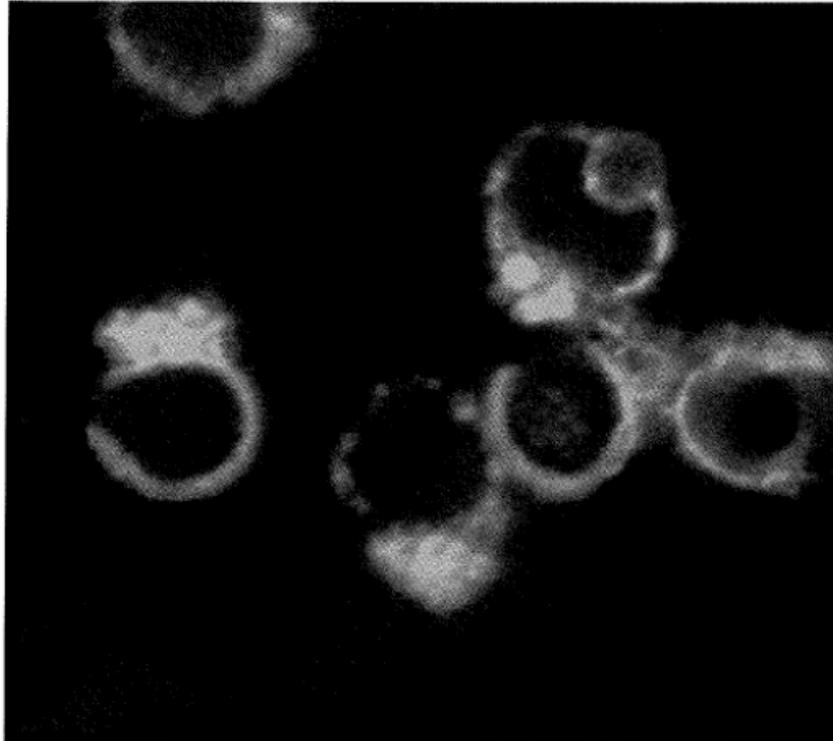


Figura 24 (continuación)

C



D

