

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 391 358**

51 Int. Cl.:
C07K 7/64 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
A61K 38/12 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **08801676 .1**
- 96 Fecha de presentación: **22.08.2008**
- 97 Número de publicación de la solicitud: **2197900**
- 97 Fecha de publicación de la solicitud: **23.06.2010**

54 Título: **Péptidos receptores ciclados dobles mutantes que inhiben anticuerpos de Beta 1-adrenoceptor**

30 Prioridad:
24.08.2007 EP 07016637

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
23.11.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.11.2012

73 Titular/es:
**JULIUS-MAXIMILIANS-UNIVERSITAT
WURZBURG (100.0%)
SANDERRING 2
97070 WURZBURG, DE**

72 Inventor/es:
**JAHNS, ROLAND;
JAHNS, VALÉRIE;
LOHSE, MARTIN y
NIKOLAEV, VIACHESLAV**

74 Agente/Representante:
ARIAS SANZ, Juan

ES 2 391 358 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

Péptidos receptores ciclados dobles mutantes que inhiben anticuerpos de β_1 -adrenoceptor.

La presente invención se refiere a mutantes de ciclopéptidos homólogos de β -AR que comprenden solamente dos residuos de cisteína capaces de formar un enlace intramolecular. También se divulgan en el presente documento péptidos lineales que pueden formar estos mutantes de ciclopéptidos y moléculas de ácidos nucleicos que codifican dichos ciclopéptidos y péptidos lineales. Además, se divulgan los vectores y las células huésped recombinantes que comprenden dicha molécula de ácido nucleico. Se proporciona un procedimiento para producir los mutantes de ciclopéptidos divulgados. Está adicionalmente proporcionada una composición que comprende los péptidos de la invención. La presente invención también se refiere a medios terapéuticos y de diagnóstico, a procedimientos y usos que toman ventaja de los péptidos de la invención y a medios, procedimientos y usos para detectar anticuerpos anti-receptores β -adrenérgicos como anticuerpos anti-receptores anti- β_1 adrenérgicos.

La dilatación cardíaca y la insuficiencia de bombeo progresivas de etiología desconocida se han llamado miocardiopatía dilatada "idiopática" (DCM) (Richardson 1996 *Circulation*, 93, 841-842). DCM representa una de las principales causas de insuficiencia cardíaca grave con una incidencia anual de hasta 100 pacientes y una prevalencia de 30-400 pacientes por millón (AHA report 2007). Las mutaciones en los genes que codifican proteínas estructurales miocíticas (Morita 2005) y varias cardiotoxinas, incluyendo alcohol, antraciclinas y más recientemente, los anticuerpos monoclonales usados terapéuticamente (por ejemplo, trastuzumab) dan cuenta de aproximadamente un tercio de casos de DCM (Chien 2000, Fabrizio y Regan 1994). La etiología de los dos tercios que quedan se entiende aún pobremente, sin embargo. Actualmente se piensa que la gran mayoría de DCM surgen a partir de una infección inicial (mayoritariamente vírica) que conduce a miocarditis aguda que tras activación del sistema inmune puede progresar a miocarditis autoinmune (crónica) que da como resultado dilatación cardíaca y fallo cardíaco congestivo grave; la última progresión ocurre particularmente, cuando están asociados (a) con el desarrollo de autoanticuerpos contra distintas proteínas de sarcolema miocíticas o de membrana que son esenciales para la función cardíaca (Freedman 2004, Jahns 2006), o (b) con inflamación crónica del miocardio y persistencia vírica (Kuhl 2005). Estos hallazgos recientes se refuerzan adicionalmente por el hecho, de que pacientes con DCM tienen a menudo alteraciones tanto en inmunidad celular como en inmunidad humoral (Jahns 2006, Limas 1997, Luppi 1998, Mahrholdt 2006). En tales condiciones una reacción inflamatoria aguda puede pasar a una clase de inflamación de bajo grado (MacLellan 2003) facilitando el desarrollo de respuestas inmunes anormales o erróneas a la activación infecciosa primordial (Freedman 2004, Kuhl 2005, MacLellan y Lusis 2003, Maekawa 2007, Smulski 2006).

En el contexto de su respuesta humoral se ha encontrado que un número sustancial de pacientes de DCM desarrollan anticuerpos de reacción cruzada y/o autoanticuerpos frente a diferentes antígenos cardíacos, incluyendo proteínas mitocondriales (por ejemplo, translocador de nucleótidos de adenina, lipoamida y piruvato deshidrogenasa (Pohlner 1997, Schultheiss 1985, Schultheiss 1988, Schulze 1999)), proteínas de sarcolema (por ejemplo, actina, laminina, miosina, troponina (Caforio 2002, Goser 2006, Li 2006, Neumann 1990, Okazaki 2003)) y proteínas de membrana (por ejemplo, receptores adrenérgicos o muscarinérgicos de superficie celular (Christ. 2006, Fu 1993, Jahns 1999b, Magnusson 1994)). A partir de estos, sólo unos pocos anticuerpos seleccionados parecen ser capaces de causar daño tisular miocárdico y de inducir fallo cardíaco congestivo grave por sí mismos, sin embargo. Además, la predisposición genética individual (incluyendo el fenotipo de antígeno de leucocitos humano respectivo (HLA) y el fenotipo de complejo principal de histocompatibilidad (MHC) (Limas 1996)) también puede contribuir notablemente a la susceptibilidad a reacciones inmunitarias dirigidas a uno mismo y a la expresión fenotípica de la enfermedad (Limas 2004, MacLellan 2003).

Homologías entre moléculas de superficie de miocitos tales como receptores de membrana y proteínas bacterianas o víricas se han propuesto como un mecanismo para la elaboración de autoanticuerpos cardíacos endógenos por mimetismo de antígenos (Hoebbeke 1996, Mobini 2004). La enfermedad del corazón de Chagas, una miocardiopatía inflamatoria que evoluciona lentamente, es uno de los ejemplos más prominentes para este mecanismo (Elies 1996, Smulski 2006). La enfermedad se origina a partir de una infección con el protozoo *Trypanosoma cruzi*, el mimetismo molecular entre la proteína ribosómica P2 β de *T. cruzi* y la mitad N-terminal del segundo bucle extracelular del receptor β_1 -adrenérgico (β_1 -AR) da como resultado la generación de anticuerpos reactivos de forma cruzada en aproximadamente el 30 % de los pacientes de la enfermedad de Chagas (Ferrari 1995). Debido a que autoanticuerpos del receptor de pacientes con DCM reconocen preferentemente la mitad C-terminal del mismo bucle (Wallukat 1995), se especulaba que estos anticuerpos podrían originarse a partir de mimetismo molecular entre el β_1 -AR y un patógeno vírico hasta ahora no identificado (Magnusson 1996). Otro mecanismo -probablemente más relevante- que conduce a la producción de autoanticuerpos cardíacos endógenos sería daño cardíaco primario seguido por liberación (repentina o crónica) de una "cantidad crónica" de determinantes antigénicos a partir de la membrana miocítica o del citoplasma miocítico, previamente oculta al sistema inmune. Tal daño aparece más probablemente tras una infección aguda (miocarditis), enfermedad cardíaca tóxica, o enfermedad cardíaca isquémica (infarto de miocardio) que da como resultado apoptosis o necrosis (Caforio 2002, Rose 2001). La presentación de antígenos propios miocárdicos al sistema inmune puede inducir después una respuesta autoinmune, que en el peor caso da como resultado la perpetuación de daños miocíticos mediados por el sistema inmune implicados bien en respuestas inmunes celulares (por ejemplo, de células T), o bien en respuestas inmunes humorales (por ejemplo, de células B), o bien en coactivación de tanto el sistema inmune innato como el sistema

5 inmune adaptativo (Eriksson 2003, Rose 2001). Desde un punto de vista patofisiológico, parece razonable vincular el potencial dañino (por ejemplo, inductor de miocardiopatía) de un autoanticuerpo específico de corazón a la *accesibilidad* y a la *importancia funcional* del objetivo correspondiente. Los receptores de superficie miocítica son fácilmente accesibles a anticuerpos (Okazaki 2005). Los dos candidatos más prometedores son el β_1 -AR (que representa el subtipo de adrenoceptor predominante en el corazón) y el receptor de acetilcolina M2-muscarínico, se han detectado autoanticuerpos contra ambos receptores en pacientes de DCM (Fu. 1993, Jahns 1999b, Matsui 1995). Mientras que los anticuerpos anti-muscarínicos (que presentan una acción similar a agonista sobre el receptor de acetilcolina cardíaco M2) se han asociado principalmente con efectos cronotrópicos negativos en el nivel sinuatrial (por ejemplo, disfunción del nódulo sinusal, fibrilación atrial (Baba 2004, Wang. 1996)), se han asociado anticuerpos anti- β_1 -AR tanto con la aparición de arritmias graves a nivel ventricular (Christ 2001, Iwata 2001a), como con el desarrollo de hipertrofia ventricular izquierda (maladaptiva), que cambia finalmente a agrandamiento ventricular externo y a fallo cardíaco progresivo (Iwata 2001b, Jahns 1999b, Khoynzhad 2007). Parece que ambos anticuerpos están dirigidos contra el segundo bucle extracelular de los respectivos receptores. Para generar una respuesta autoinmunitaria, las proteínas de membrana miocíticas (por ejemplo, receptores) deben degradarse a oligopéptidos normales capaces de formar un complejo con una molécula de MHC o HLA de clase II del huésped (Hoebeke 1996). En caso del adrenoceptor β_1 -AR humano el análisis basado en ordenadores para extensiones aminoacídicas inmunogénicas potenciales ha mostrado, que la única parte de la molécula receptora que contiene epítomos de células B y T y que está accesible a anticuerpos era de hecho el segundo bucle de receptor extracelular predecido (β_1 -EC_{II}) (Hoebeke 1996). Esto podría explicar el uso exitoso de péptidos de segundo bucle para la generación de anticuerpos específicos del receptor β_1 en diferentes modelos animales (Iwata 2001b, Jahns. 2000, Jahns 1996). Además, en la última década varios grupos han demostrado independientemente que anticuerpos de segundo bucle reconocen preferentemente β_1 -AR en diversos ensayos inmunológicos (ELISA de células completas, inmunoprecipitación, inmunofluorescencia), indicando que son "conformacionales" (Hoebeke 1996, Jahns 2006). La realización de pruebas funcionales reveló que los mismos anticuerpos afectaron también la función receptora, tal como actividad de producción de AMPc intracelular y/o actividad proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA), sugiriendo que pueden actuar como reguladores alostéricos de actividad β_1 -AR (Jahns 2000, Jahns 2006). La estructura de la β_1 -AR se analizó también por Warne (2008 Nature. DOI: 10. 1038).

30 Siguiendo los postulados de Witebsky (Witebsky 1957) la evidencia *indirecta* de la etiología autoinmune de una enfermedad requiere identificación del iniciador (por ejemplo, el antígeno propio responsable) e inducción de una respuesta autoinmune dirigida a antígeno en un animal experimental, que después debe desarrollar una enfermedad similar. La evidencia *directa*, sin embargo, requiere la reproducción de la enfermedad por transferencia de anticuerpos patógenos homólogos o de células T autorreactivas desde un animal hasta otro animal de la misma especie (Rose 1993).

35 Para analizar el potencial patógeno de anticuerpos anti- β_1 , Jahns y cols. han elegido un enfoque experimental *in vivo*, que cumplía los criterios de Witebsky para evidencia directa de enfermedades autoinmunes. DCM se indujo endogámicamente inmunizando ratas contra β_1 -EC_{II} (100% de homología de secuencia entre ser humano y rata; *evidencia indirecta*); después la enfermedad se reprodujo en animales sanos por transferencia isogénica de "autoanticuerpos" anti- β_1 (*evidencia directa*) (Jahns 2004). Los animales desarrollaron dilatación y disfunción progresiva del ventrículo izquierdo (LV), un decrecimiento relativo en grosor de las paredes del LV y una regulación a la baja selectiva de β_1 -AR, una característica que también se ve en DCM (Lohse 2003).

45 Estos resultados, junto con un efecto a corto plazo similar a agonista de los anticuerpos *in vivo* (Jahns 2004), sugieren que tanto los fenotipos cardiomiopáticos inducidos como los transferidos pueden atribuirse principalmente a la activación de receptor suave pero sostenida lograda por anticuerpos anti- β_1 -AR estimuladores. Esta hipótesis está respaldada por el gran conjunto de datos disponibles de los efectos cardiopáticos de activación de β_1 -AR excesiva y/o a largo plazo vistos después de manipulación genética o farmacológica (Engelhardt 1999, Woodiwiss 2001). Por lo tanto, la miocardiopatía inmune dilatada inducida por anti- β_1 -AR (DICM) puede considerarse ahora como una entidad de enfermedad patógena en sí misma, conjuntamente con otras enfermedades autoinmunes dirigidas a receptor establecidas tales como miastenia gravis o enfermedad de Graves (Freedman 2004, Hershko 2005, Jahns 2004, Jahns 2006).

50 La importancia clínica de autoanticuerpos cardíacos es difícil de valorar, dado que las valoraciones bajas de tales anticuerpos pueden detectarse también en la población sana como parte del repertorio inmunológico natural (Rose 2001). Sin embargo, con respecto a datos anteriores de anticuerpos anti- β_1 -AR de Jahns y cols. han demostrado que su prevalencia es casi insignificante en individuos sanos (< 1 %) a condición de que un procedimiento de examen en base a sistemas celulares que se presentan en el objetivo se use en su conformación natural (por ejemplo, el β_1 -AR) (Jahns 1999b). Empleando el último procedimiento de revisión, la aparición de autoanticuerpos anti- β_1 -AR podría también excluirse en pacientes con enfermedad valvular crónica o con enfermedad cardíaca de hipertensión (Jahns 1999a). En contraste, la prevalencia de estimular anti- β_1 -AR fue ~ 10 % en miocardiopatía isquémica (ICM) y ~30 % en miocardiopatía dilatada (DCM) (Jahns 1999b), que fue significativamente superior que en los controles sanos, pero estaba en el intervalo inferior de informes anteriores en colectivos de DCM (prevalencia del 33 % al 95 %) (Limas 1992, Magnusson 1994, Wallukat 1995). Parece concebible que las diferencias en procedimientos de rastreo que permitan detectar anticuerpos anti- β_1 -AR funcionalmente activos den cuenta más probablemente del amplio intervalo de prevalencias descritas en el pasado (Limas 1992). De hecho, solamente una fracción menor de autoanticuerpos anti- β_1 -AR definidos por ELISA humanos fue capaz de unirse al β_1 -AR nativo

5 localizado en la superficie celular. Solamente esta fracción reconoció (según se determina por inmunofluorescencia) y activó (según se determina por incrementos en AMPc celular y/o actividad de PKA) β_1 -AR humana expresada en la membrana de células eucariotas intactas (Jahns 2000, Jahns 1999b). Por lo tanto, los sistemas celulares que presentan el objetivo en su conformación natural representan una herramienta esencial en el examen en busca de autoanticuerpos anti- β -AR funcionalmente relevantes (Nikolaev 2007).

10 Clínicamente, la presencia de autoanticuerpos anti- β_1 -AR en DCM se ha mostrado que estaba asociada con una función cardíaca más gravemente deprimida (Jahns 1999b), la aparición de arritmia ventricular grave (Chiale 2001) y una incidencia superior de muerte cardíaca súbita (Iwata 2001a). Datos recientes comparando pacientes positivos en anticuerpos de DCM con pacientes negativos en anticuerpos de DCM durante un periodo de más de 10 años no solamente confirmaron una prevalencia superior de arritmia ventricular en presencia de anti- β_1 -AR activadora, sino que también revelaron que la positividad de anticuerpos predijo un riesgo de mortalidad cardiovascular incrementado casi tres veces (Stork 2006). Tomados conjuntamente, los datos clínicos disponibles subrayan la relevancia patofisiológica de los anticuerpos anti- β_1 -AR funcionalmente activos en DCM.

15 Una estrategia farmacológica aceptada generalmente hoy en día sería el uso de agentes beta-bloqueantes con el fin de atenuar o incluso abolir los efectos estimulantes mediados por anticuerpos, al menos si los β -bloqueantes pueden evitar independientemente la activación inducida por anticuerpos de β_1 -AR (Freedman 2004, Jahns 2000, Matsui 2001, Jahns 2006). Nuevas aproximaciones terapéuticas incluyen actualmente la eliminación de anti- β_1 -AR estimulante por inmunoadsorción selectiva o no selectiva (Hershko 2005, Wallukat 2002), o marcado como objetivo directamente de los anticuerpos anti- β_1 -EC_{II} y/o de las propias células B que producen anti- β_1 -EC_{II} (esto es, la inducción de inmunotolerancia) (Anderton 2001). La inmunoadsorción no selectiva, sin embargo, debido a un riesgo incrementado de infección después de la depleción de inmunoglobulinas, requiere la sustitución de la IgG humana por razones de seguridad (Felix 2000) con todos los posibles efectos secundarios de proteínas humanas sustituidas conocidas en la técnica que incluyen reacciones anafilácticas graves y muerte.

25 El documento WO 01/21660 divulga ciertos péptidos homólogos a epítopos del bucle 1° y del bucle 2° de β_1 -AR y propone aplicar estos péptidos para intervención médica de miocardiopatía dilatativa (DCM). Incluso si el documento WO 01/21660 menciona ligeramente que los péptidos pueden modificarse con el fin de protegerlos contra proteasas séricas, por ejemplo por ciclación, los ejemplos correspondientes y las realizaciones no se dan y no se muestra ningún efecto in vitro o in vivo de los péptidos propuestos en el curso de DCM o en el curso de las valoraciones de receptor-anticuerpo. Por otra parte, en el documento WO 01/21660 se tiene la intención de recurrir a los enfoques de inmunoadsorción no selectiva mencionados anteriormente, produciendo los riesgos correspondientes mencionados.

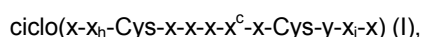
30 En contraste con ello, los ciclopéptidos homólogos a v recién desarrollados (por ejemplo β_1 -EC_{II}-CP) se emplearon seis semanas después de la inducción activa de anticuerpos anti- β_1 -EC_{II}-CP son ciclopéptidos que contienen 3 residuos de cisteína y así, pueden formar enlaces intramoleculares, en los que hay una opción potencial para formar dos enlaces intramoleculares (además de la ciclación entre los extremos N- y C-), individualmente. β_1 -EC_{II}-CP redujo significativamente la cantidad de anticuerpos anti- β_1 -EC_{II} circulantes y evitó eficazmente el desarrollo de dilatación y disfunción cardíaca (Boivin 2005). Los β_1 -EC_{II}-CP anteriormente mencionados se describen también en el documento WO 2006/103101.

35 En vista de la presente técnica, el problema técnico que subyace a la presente invención es la previsión de medios y procedimientos mejorados y fácilmente obtenibles para la intervención médica de enfermedades relacionadas con anticuerpos anti- β -AR, en particular con anticuerpos anti- β_1 -EC_{II}.

Este problema técnico se soluciona por suministro de las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones.

40 De acuerdo con ello, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a mutantes de ciclopéptidos homólogos a β -AR (también llamados en el presente documento como "péptidos cíclicos" o "ciclopéptidos" y similares), particularmente a mutantes de ciclopéptidos homólogos a β_1 -AR, a saber mutantes de ciclopéptidos homólogos a β_1 -EC_{II}. La estructura de estos péptidos mutantes de ciclopéptidos/péptidos cíclicos se caracteriza por que son capaces de formar solamente un enlace disulfuro intramolecular individual.

45 En particular, en el primer aspecto, la presente invención se refiere a un péptido cíclico de fórmula I:



en la que

- 50 a) x es un aminoácido distinto de Cys;
- b) n es cualquier número entero desde 1 hasta 15;
- c) i es cualquier número entero desde 0 hasta 14;
- d) x^c es Pro y
- e) y es un aminoácido distinto de Cys; y

en el que dicho péptido cíclico consta de al menos 16 y consta de como máximo 25 aminoácidos y comprende el tramo de aminoácidos

Asp-Xxx₁Xxx₄-Arg-Arg-Cys-Xxx₃-Asn-Asp-Pro-Lys (SEQ ID NO: 45); o Glu-Ser-Asp-Xxx₁-Xxx₄-Arg-Arg-Cys-Xxx₃-Asn-Asp-Pro-Lys (SEQ ID NO: 46),

5 en el que Xxx₁, Xxx₃ y Xxx₄ son aminoácidos distintos de Cys y en el que dicho péptido cíclico

- i) es capaz de reducir una activación mediada por anticuerpos de receptor β_1 -adrenérgico (β_1 -AR);
- ii) es capaz de unir (auto)anticuerpos frente al segundo bucle extracelular (EC_{II}) de β_1 -AR; y/o
- iii) es capaz de inhibir la interacción entre β -AR y (auto)anticuerpos contra la CE_{II} de β_1 -AR.

10 Realizaciones preferidas particulares, como se discute más adelante, son péptidos cíclicos específicos como se representan en fórmulas VII, IX, IX', VI y VIII.

15 La presente invención soluciona el problema técnico identificado anterior dado que, según se documenta más adelante en el presente documento y en los ejemplos adjuntos, se encuentra sorprendentemente que mutantes de péptidos cíclicos que contienen sólo dos cisteínas, que pueden formar un único enlace definido, disulfuro intramolecular individual, son también capaces de inhibir anticuerpos anti- β -AR y son útiles en inhibir anticuerpos anti- β_1 -AR estimuladores.

20 Se ha encontrado sorprendentemente además en el contexto de la presente invención que mutantes peptídicos con una estructura cíclica (es decir los péptidos cíclicos) según se describen y proporcionan en el presente documento son superiores a sus contrapartidas lineales en términos tanto del reconocimiento o retirada de anticuerpos anti- β -AR conformacionales como de su potencial neutralizante de anticuerpos (es decir, farmacéutico). Estos datos se obtienen por el empleo de ensayos de competición de ELISA y de ensayos FRET-funcionales (AMPc), respectivamente.

25 Además, los péptidos cíclicos de la invención que comprenden sólo dos cisteínas, que pueden formar un único enlace definido, disulfuro intramolecular individual, pueden obtenerse/elaborarse fácilmente, caracterizarse y purificarse bioquímicamente. Esto es particularmente cierto cuando se requieren las fracciones puras de los mismos isómeros de ciclopéptidos. En el contexto de esta invención, se evita una mezcla de isómeros de ciclopéptidos, es decir estereo-isómeros, que comprenda isómeros de ciclopéptidos con enlaces disulfuro intramoleculares diferentes. Como queda reflejado en el presente documento más adelante, debido a esta evitación se puede obtener un producto médico específico y limpio (que cumple con los estándares de GMP) que comprende isómeros todos con el mismo enlace disulfuro intramolecular.

30 Fue un hallazgo adicional, sorprendente en el contexto de la presente invención y según se ilustra en los ejemplos adjuntos, que la naturaleza exacta del intercambio de uno de los residuos de cisteína con un residuo de serina determinó marcadamente la potencia de neutralización del anticuerpo de péptidos cíclicos derivados de β_1 -EC_{II}.

35 En particular, un intercambio Cys→Ser como aquel en posición 18 del ciclopéptido 25-mérico divulgado ejemplarmente y preferentemente en el presente documento (fórmulas VII/IX), en la posición 17 ciclopéptido 22-mérico divulgado ejemplarmente y preferentemente en el presente documento (fórmula IX') o en la posición 14 del ciclopéptido 18-mérico divulgado ejemplarmente y preferentemente en el presente documento (fórmulas VI/VIII), respectivamente, proporciona péptidos cíclicos (péptidos Cys-Ser cíclicos) con efectos neutralizantes de anticuerpos y farmacológicos excelentes in vitro (Fig. 4-11 y 27), mientras que el intercambio Cys→Ser en posición 17, 16 o 13 del péptido cíclico 25-mérico, 22-mérico o 18-mérico divulgado ejemplarmente en el presente documento, respectivamente (péptidos cíclicos de Ser-Cys), no tuvo, sorprendentemente, casi ningún efecto inhibitorio. Este efecto inhibitorio no podría detectarse ni teniendo en cuenta sus propiedades como agentes de retirada de anticuerpos ni en términos de su capacidad de inhibir efectos de anticuerpos funcionales; como neutralización de estimulación de receptor in vitro como se muestra en, por ejemplo, Fig. 4-10).

45 Fue un hallazgo adicional en el contexto de la presente invención que una imitación estérica casi perfecta del dominio EC_{II}- β_1 -AR puede obtenerse por un segundo péptido ciclado homólogo de bucle que comprende 22 aminoácidos, por ejemplo 21 aminoácidos de la secuencia primordial original publicada del β_1 -AR humano, es decir aminoácidos 200 (R) a 221 (T) (numeración según Frielle y cols. 1987, PNAS 84, páginas 7920-7924), con un residuo ácido aminoacídico adicional (por ejemplo glicina (G)) para cerrar el ciclo de síntesis en posición 222 para formar un ciclopéptido de 22 AA.

50 Sin comprometerse con ninguna teoría, la actividad cardioprotectora e inmunomoduladora de los péptidos cíclicos depende grandemente de su conformación. Se averiguó adicionalmente fuera del contexto de esta invención que una introducción del aminoácido más pequeño que se da en la naturaleza glicina en el sitio de cierre (predicho) de anillo (o en la posición correspondiente a ello) conduce a una unión potenciada de autoanticuerpos anti- β_1 AR, es decir aparentemente potencia la similitud del ciclopéptido de 22 AA con el dominio EC_{II}- β_1 -AR. En particular, las reivindicaciones adjuntas, entre otras cosas, indican que los ciclopéptidos cyc22AA tienen una eficiencia bloqueante

de anticuerpos significativamente más alta *in vivo* que otros ciclopeptidos que imitan EC_{II} mayores (es decir, péptidos cyc25AA) o menores (es decir, péptidos cyc18AA). Los estudios de modelización ayudados por computadora con dicho ciclopeptido de 22 AA confirmaron una excelente imitación de la segunda estructura de bucle extracelular con una diferencia calculada en tamaño de solamente 4,5 angstroms (4,5 Å) en la base del ciclopeptido (opuesto al sitio de unión de anticuerpos asumido), cuando se compara con la segunda hélice hacia atrás de bucle extracelular nativa predicha (véase también la Fig. 24 adjunta). Además, se demostró en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas que particularmente dicho ciclopeptido de 22 AA reduce la valoración de autoanticuerpos anti-β₁-AR con una eficiencia extraordinariamente alta.

Dado que la sustitución de una de las tres cisteínas que quedan en el péptido cíclico 22 AA permite la introducción de un puente disulfuro reforzado (como un segundo ciclo "interno" ciclo, generado por ciclación doble) entre las dos cisteínas que quedan, el ciclopeptido de 22 AA cíclico resultante también representa un producto definido no ambigüamente bioquímicamente (véanse también Fig. 25 y 26).

Se ha encontrado sorprendentemente que intercambio Gln↔D-Glu en posición 25 (mutantes de ciclopeptidos 25-méricos) o 18 (mutantes de ciclopeptidos 18-méricos) no influyen significativamente la capacidad bloqueante de los ciclopeptidos, independientemente de su longitud; es decir, 25 frente a 18 aminoácidos como se muestra en las Fig. 6, 7 y 9).

Los ejemplos más adelante documentan también que los péptidos cíclicos como se describen en el presente documento muestran características mejoradas, por ejemplo según se comparan con péptidos que comprenden tres residuos de Cys (por ejemplo los péptidos cíclicos Cys/Cys descritos en el documento WO 2006/103101). Ejemplos de características mejoradas de los péptidos cíclicos de esta invención son una capacidad extremadamente buena para bloquear anticuerpos anti-β₁-AR y su productibilidad avanzada de acuerdo con estándares de GMP.

En el contexto de la presente invención, los hallazgos *in vitro* se confirmaron generalmente en pruebas *in vivo* (Fig. 12-16 y 28/29). Interesantemente, la diferencia en la eficiencia de bloqueo de los ciclopeptidos Cys_{18, 17 o 14}→Ser_{18, 17 o 14} mutados comparados con aquella de los péptidos lineales fue incluso más pronunciada *in vivo* (Fig. 5, 7 y 14-16). El modelo de rata establecido de miocardiopatía autoinmune inducida por anticuerpos anti-beta1-adrenérgicos (Jahns, 2004) sirvió para valorar la eficacia de los mutantes ciclopeptídicos homólogos a beta1-ECII generados *in vivo*. Los datos *in vivo* indican, que la eficiencia de los ciclopeptidos mutados divulgados (por ejemplo ciclopeptido Cys/Ser de 18AA) podría depender igualmente de la dosis administrada (Fig. 14-16).

Además, los experimentos *in vivo* demostraron que la capacidad bloqueante de anticuerpos de ciclopeptidos mutantes no está aparentemente afectada por una reducción del número de los aminoácidos de un ciclopeptido 25-mérico a un ciclopeptido 18-mérico; tanto datos *in vitro* como datos *in vivo* demuestran una excelente comparabilidad de estos dos mutantes ciclopeptídicos Cys/Ser de 25 AA o Cys/Ser de 18 AA de enlace disulfuro individual que contienen dos cisteínas. Debería destacarse, sin embargo, que tanto 1,0 mg/kg de mutantes Cys/Ser 25AA-méricos como dosis alta (es decir, 4,0 mg/kg de peso corporal) de mutantes Cys/Ser 18AA-méricos condujeron a un incremento transitorio inicial en valoraciones de anticuerpos y así pospusieron una reducción significativa en valoraciones de receptor de anticuerpos a la tercera o cuarta aplicación ciclopeptídica (tercer o cuarto mes de terapia). Este fenómeno no ocurrió bien con dosis 1,0 o bien con dosis 2,0 mg/kg de peso corporal de mutantes ciclopeptídicos Cys/Ser de 18AA (Fig. 16B, C).

Los animales a los que se administró en particular el péptido cíclico 18-mérico o 25-mérico según se describe en el presente documento no mostraron ningún signo de anormalidades y solamente se detectó el efecto deseado del péptido administrado, a saber el bloqueo de anticuerpos anti-β₁AR. De acuerdo con ello, los péptidos como se proporcionan en el presente documento no presentan efectos secundarios no deseados o toxicidad en el régimen de dosificación aplicado. Esto se demostró adicionalmente en el presente documento mostrando que no se ejerció ninguna toxicidad sobre el riñón por los péptidos cíclicos de la invención (no se detectó ninguna obstrucción mecánica de membranas glomerulares; Fig. 23). Además, los parámetros de laboratorio rutinarios indicadores de la función renal permanecieron normales en 12 meses de aplicación CP y no difirieron de animales de control de laboratorio no tratados. (Fig. 22A, B).

La capacidad de bloqueo de anticuerpos de ciclopeptidos mutados de esta invención no está afectada por la longitud del péptido, en la medida en que el péptido no es más corto de 18 AA y no es más largo de 25 AA. Esto se demostró de forma ejemplar por la reducción del número de aminoácidos del péptido de 25 a 18. Dentro del intervalo de 18 a 25 aminoácidos, los péptidos cíclicos que tienen 22 aminoácidos son más efectivos de acuerdo con esta invención y de acuerdo con ello son una realización preferida particular. Un ejemplo de un péptido cíclico 22mero preferido particular tal se muestra en fórmula IX'.

Una ventaja de los mutantes ciclopeptídicos de la presente invención es -mutando una cisteína particular (preferentemente la Cys correspondiente a Cys 216 de la secuencia de aminoácidos de β-AR) a un residuo de serina y reforzando la formación del único puente S-S intramolecular posible por segundo un procedimiento de ciclación específico S-S- que su restricción conformacional se incrementa. En comparación con péptidos conocidos en la técnica, esta restricción incrementada de los péptidos de la invención conduce a una molécula que mimetiza mejor el epítipo presentado en la conformación nativa del segundo bucle de β₁-EC_{II} sobre la superficie celular.

Beta-bloqueantes, tales como bisoprolol, que se usan en la técnica para el tratamiento de DCM y otras enfermedades que son causadas por anticuerpos anti- β_1 -AR estimulantes, reducen significativamente tanto el ritmo cardiaco como la presión sanguínea. En contraste a esto, una aplicación *in vivo* de los ciclopéptidos mutantes de la presente invención no tienen ningún impacto negativo sobre la función pulmonar, la frecuencia cardiaca o la presión arterial (Fig. 20 y 21). Además, un número de parámetros de laboratorio importantes para valorar la función de hígado y riñones no estaban influenciados por las inyecciones de ciclopéptidos repetidas (Fig. 22a/b y 23). Por lo tanto, los péptidos cíclicos de la presente invención son, *entre otras cosas*, particularmente adecuados para el tratamiento de grupos de pacientes distintos que no podrían tratarse de otro modo usando un beta-bloqueante, es decir, pacientes quienes, por ejemplo, ya sufren de bradicardia o para quienes el uso de beta bloqueantes no es posible debido a contraindicaciones (como aquellos que sufren de enfermedad obstructiva pulmonar o hipotensión).

Como se menciona, una ventaja adicional de los medios y procedimientos de la presente invención, en particular sobre medios y procedimientos que toman ventaja de péptidos cíclicos derivados de β_1 -EC_{II} teniendo aún 3 cisteínas (como, por ejemplo se desvela en el documento WO 2006/103101), es que la formación de mezclas de isómeros ciclopeptídicos puede evitarse.

La caracterización bioquímica de una mezcla de isómeros ciclopeptídicos diferente, formados durante ciclación de péptidos que comprenden tres o más residuos de Cys, es laboriosa. De acuerdo con ello, la producción de fracciones de péptidos cíclicos puras que contienen sólo un tipo de un isómero ciclopeptídico es intensiva en tiempo y coste, cuando toman ventaja de péptidos que comprenden tres o más residuos de Cys. Esto es particularmente cierto, cuando los péptidos cíclicos se producen con estándares de GMP.

En contraste con esto, los péptidos cíclicos de la presente invención se pueden caracterizar y producir fácilmente como fracciones puras del mismo isómero. Esto conduce a una reproducibilidad alta. La ventaja particular de los péptidos de la presente invención es que las mezclas de isómeros, que tienen que separarse y deben caracterizarse en realización de pruebas laboriosas, se evitan, y que al menos una etapa de producción adicional se omite finalmente (separación y/o caracterización bioquímica) (véase también Sewald 2002).

La presente invención se basa, *entre otras cosas*, en los experimentos descritos en los ejemplos adjuntos.

En el contexto de estos ejemplos, una de las cisteínas bien en la posición 17 o bien en la posición 18 del ciclopéptido de 25 AA β_1 -EC_{II} se reemplazó por un residuo de serina (mutación Cys₁₇ o 18→Ser₁₇ o 18), de modo que solamente se puede un enlace disulfuro intramolecular (S-S), individual (Fig. 1). Medidas como esta proporcionan el potencial para reducir efectos secundarios y para mantener o para incrementar la eficacia biológica de las construcciones de la presente invención. Los péptidos cíclicos de esta invención se pueden obtener, en contraste con los péptidos de la técnica anterior que forman mezclas de isómeros, por procedimientos de elaboración simples, robustos y altamente reproducibles. Estos pueden aumentarse de escala eficientemente. Además estos procedimientos permiten separación de mezclas de isómeros y son adecuados para estándares de GMP. Las reivindicaciones adjuntas estipulan procedimientos de elaboración/producción correspondientes.

En las reivindicaciones adjuntas, la ciclación de péptidos de la invención se obtuvo, entre otras cosas, por la introducción de una mutación de "DGLu", por ejemplo en el sitio de cierre (de anillo) del péptido cíclico; mutación Gln↔DGLu como se muestra en Fig. 2).

Además, el número de aminoácidos (AA) se redujo desde 25AA hasta 22AA y adicionalmente hasta 18AA en otros conjuntos adicionales mutantes ciclopeptídicos de la presente invención. Esta medida proporciona el potencial para minimizar los efectos inmunológicos secundarios de las construcciones. Los mutantes ciclopeptídicos de 18AA contenían un intercambio serina→cisteína en la posición 14 o en la posición 13 (18AA conteniendo ciclopéptidos mutantes Cys₁₃-Ser₁₄ o Ser₁₃-Cys₁₄, respectivamente), o bien con un intercambio de glutamina-ácido D-glutámico (adicional), por ejemplo en el sitio de cierre de anillo del péptido cíclico (mutación Gl↔D-Glu), o no (Fig. 2). Los mutantes ciclopeptídicos de 22AA contenían un intercambio de cisteína→serina en la posición 17 (22AA conteniendo Cys₁₆-Ser₁₇), opcionalmente combinado con la introducción de un residuo de Gly en la posición 22 (un posible sitio de cierre de anillo del péptido cíclico; Fig. 24).

Tomados conjuntamente, los datos *in vitro* así como los datos *in vivo* experimentales proporcionados en el presente documento demuestran claramente que la capacidad bloqueante de anticuerpos de los ciclopéptidos mutantes desvelados no está afectada por la reducción del número de aminoácidos de un ciclopéptido 25-mérico a un ciclopéptido 18-mérico cuando se usa una dosis que varía desde 0,25 hasta 5,0 mg/kg de peso corporal (Pc) y en particular desde 1,0 hasta 2,0 mg/kg de peso corporal. Los datos *in vitro* e *in vivo* demuestran una excelente comparabilidad de los dos mutantes ciclopeptídicos de 25 AA Cys/Ser o de 18 AA Cys/Ser de enlace disulfuro individual que contienen 2 cisteínas a una dosis de 1,0 mg/kg de peso corporal; Fig. 16 a 21. Sin embargo, péptidos cíclicos "intermedios" de 19 a 24 AA muestran una actividad incrementada de acuerdo con esta invención. En particular, los péptidos cíclicos de 22 AA mostraron una actividad incrementada de acuerdo con esta invención. Un ejemplo preferido de un péptido cíclico "intermedio" tal es un péptido cíclico que comprende o constituido por los residuos aminoácidos como se muestran en la fórmula IX'.

Además, la naturaleza exacta del intercambio de uno de los residuos de cisteína con un residuo de serina (es decir,

mutación Cys/Ser o Ser/Cys) determinó marcadamente la potencia de los péptidos cíclicos descritos *in vitro* y también *in vivo* (Fig. 6-10 y 14-16).

Los receptores β -adrenérgicos (β -AR), particularmente los receptores β_1 -adrenérgicos (β_1 -AR), se conocen bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, la secuencia nucleotídica y aminoacídica (SEQ ID NO: 40) de la β_1 -AR humana (también conocida como receptor β_1 -adrenérgico (ADRB1)) puede obtenerse a partir de la entrada de banco de datos NM_000684 o NP_000675. β -AR se conocen por formar dos dominios extracelulares llamados en el presente documento como EC_I y EC_{II} o $\beta_{(1)}$ -EC_I y $\beta_{(1)}$ -EC_{II}. Como se menciona anteriormente, los péptidos cíclicos de la presente invención comparten similitud de secuencia con β_1 -EC_{II}, particularmente con el tramo de aminoácidos DEARRCYNDPKCCDFV (SEQ ID NO: 33) o RAESDEARRCYNDPKCCDFVTNR (SEQ ID NO: 34) del β_1 -AR humanos (posiciones aminoacídicas 204 a 219 o 200 a 222, respectivamente) o, en particular, con el tramo de aminoácidos DEARRCYNDPK (SEQ ID NO: 45) o ESDEARRCYNDPK (SEQ ID NO: 46) del β_1 -AR humano. El término " β -AR" como se usa en el presente documento se refiere preferentemente a un receptor β_1 -adrenérgico (β_1 -AR), más preferentemente al β_1 -AR humano como se describe anteriormente.

Un péptido cíclico proporcionado en el presente documento tiene como mínimo una de las características seleccionadas del grupo constituido por:

- a) ser capaz de unir (auto-)anticuerpos contra el bucle de EC_{II} de receptor β_1 -adrenérgico (β_1 -AR);
- b) ser capaz de inhibir la interacción entre β_1 -AR y (auto)anticuerpos contra el bucle de EC_{II} de β_1 -AR; y
- c) ser capaz de reducir una activación mediada por anticuerpos de β_1 -AR.

La estructura de β_1 -AR se analizó, entre otras cosas, por Warne (2008 Nature. DOI: 10. 1038).

Como se menciona anteriormente, el péptido cíclico de la presente invención se define por la fórmula general ciclo(x-x_n-Cys-x-x-x-x^c-x-Cys-y-x_i-x) (fórmula I). En esta fórmula, "y" puede ser cualquier residuo aminoacídico menos Cys, preferentemente "y" puede ser un residuo aminoacídico salvo Pro y salvo Cys. En general, "y" puede ser cualquier aminoácido, en la medida en que este aminoácido no forma un enlace intramolecular (por ejemplo un enlace disulfuro) con otro aminoácido del péptido cíclico proporcionado en el presente documento (por ejemplo con otra Cys del péptido cíclico proporcionado en el presente documento). Preferentemente, "y" puede ser cualquier aminoácido a Cys (es decir, que tiene una estructura química y/o un comportamiento similar dentro de una estructura peptídica tridimensional), con la excepción de que no forman un enlace intramolecular (por ejemplo un enlace disulfuro) con otro aminoácido del péptido cíclico proporcionado en el presente documento (por ejemplo con otra Cys del péptido cíclico proporcionado en el presente documento). Más preferentemente, "y" puede ser cualquier aminoácidos polar menos Cys, como Thr o Ser. Lo más preferentemente, en el péptido cíclico proporcionado en el presente documento, "y" es Ser o un análogo de Ser. "Análogo de Ser" en este contexto quiere decir un residuo, particularmente un residuo aminoacídico, que tiene un carácter estructural similar a aquel de Ser. "Análogo de Ser" se refiere a, por ejemplo, un residuo aminoacídico que tiene una estructura química como aquella de Ser y/o un comportamiento similar dentro de una estructura peptídica tridimensional como aquella de Ser. Como un ejemplo adicional, "y" también puede ser selenocisteína o un análogo de la misma.

En general, el significado de términos como "cualquier aminoácido (residuo) menos Cys" o "aminoácido (residuo) distinto de Cys" está claro para la persona experta. En particular, según se usan en esta invención, estos términos se refieren a cualquier aminoácido, en la medida en que este aminoácido no forme una unión intramolecular (por ejemplo un enlace disulfuro) con otro aminoácido del péptido cíclico proporcionado en el presente documento (por ejemplo con otra Cys del péptido cíclico proporcionado en el presente documento).

Como se ha mencionado, una característica principal de los péptidos cíclicos de esta invención es que comprenden solamente dos Cys capaces de formar un enlace intramolecular. Tales péptidos cíclicos pueden, por ejemplo, obtenerse sustituyendo una tercera Cys de un péptido homólogo al β_1 -EC_{II} por un aminoácido diferente. Por lo tanto, la Cys a sustituirse es la correspondiente a la 2^a o, lo que se prefiere, a la 3^a Cys de la β_1 -EC_{II} que se encuentran en proximidad directa una respecto a otra (posición aminoacídica 215 y 216 de β_1 -AR humano (véanse también NP_000675 y SEQ ID NO: 40)). Estos dos restos de Cys, se refieren en el presente documento como "Cys-Cys", "Cys/Cys", "Cys₂₁₅-Cys₂₁₆" o "Cys₂₁₅/Cys₂₁₆" y similares.

Los péptidos mutantes o las mutaciones resultantes como se divulga en el presente documento se llaman de acuerdo con ello como péptidos mutantes o mutaciones "Cys-Ser", "Cys/Ser", "Cys_{13, 16 o 17}-Ser_{14, 17 o 18}", o "Cys_{13, 16 o 17}/Ser_{14, 17 o 18}" o péptidos mutantes o mutaciones "Ser-Cys", "Ser/Cys", "Ser_{13 o 17}-Cys_{14 o 18}" o "Ser_{13 o 17}/Cys_{14 o 18}", dependiendo de cual de las Cys esté reemplazada y de cuantos aminoácidos comprenda el péptido mutante.

Alternativamente, los péptidos mutantes como se divulgan en el presente documento se definen por referencia a los intercambios de aminoácidos particulares en una posición determinada. Después, los péptidos mutantes/mutaciones se llaman, por ejemplo péptidos mutantes/mutaciones "Cys_{14, 17 o 18}→Ser^{14, 17 o 18}" o péptidos mutantes/mutaciones "Cys_{13 o 17}→Ser_{13 o 17}", dependiendo de si la Cys correspondiente a Cys₂₁₆ o la Cys correspondiente a la Cys₂₁₅, respectivamente, de β_1 -AR está sustituida por un aminoácido diferente. Los índices "14, 17 o 18" o "13 o 17" se refieren a la posición en el péptido cíclico de ejemplo de la invención, como resultado de lo que la posición 1

corresponde a la primera "x" según se define en la fórmula I, es decir ciclo(\underline{x} - x_h -Cys-x-x-x^c-x-Cys-y-x_i-x).

De acuerdo con ello, términos como péptidos mutantes/mutaciones "Cys₁₃-Ser₁₄" o "Cys₁₃/Ser₁₄" se usan en el mismo sentido que péptidos mutantes/mutaciones "Cys₁₄→Ser₁₄" y en este ejemplo particular, se refieren a péptidos 18meros divulgados en el presente documento. Términos como péptidos mutantes/mutaciones "Cys₁₆-Ser₁₇" o "Cys₁₆/Ser₁₇" se usan en el mismo sentido que péptidos mutantes/mutaciones "Cys₁₇→Ser₁₇" y en este ejemplo particular se refieren a péptidos 22meros divulgados en el presente documento. Términos como péptidos mutantes/mutaciones "Cys₁₇-Ser₁₈" o "Cys₁₇/Ser₁₈" se usan en el mismo sentido que péptidos mutantes/mutaciones "Cys₁₇→Ser₁₇" y en este ejemplo particular se refieren a péptidos 25meros divulgados en el presente documento.

Análogamente, términos como péptidos mutantes/mutaciones "Ser₁₃-Cys₁₄" o "Ser₁₃/Cys₁₄" se usan en el mismo sentido que péptidos mutantes/mutaciones "Cys₁₇→Ser₁₇" y en este ejemplo particular se refieren a péptidos 25meros divulgados en el presente documento.

Los índices ejemplarmente indicados dados anteriormente se refieren a la posición del aminoácido indicado dentro del péptido 18mero, 22mero, o 25mero divulgado en el presente documento, respectivamente. En el contexto de esta invención, el punto de partida con respecto a una posición aminoacídica indicada dada para un péptido cíclico divulgado en el presente documento es el aminoácido N-terminal del armazón linealizado del péptido cíclico (como la primera "x" en la fórmula I, véase anteriormente). El punto de partida con respecto a una posición aminoacídica indicada dada para un péptido lineal divulgado en el presente documento está en su aminoácido N-terminal.

Los hallazgos como se proporcionan en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas demuestran una comparabilidad de ciclopéptidos 25AA, 22 y AA sin ninguna mutación de Cys con los mutantes (Cys-Ser) Cys_{18, 17} o 14→Ser_{18, 17} o 14 de 25AA, 22AA o 18AA cíclicos, pero no con los mutantes (Ser-Cys) Cys₁₇ o 13→Ser₁₇ o 13 de 25AA, 22AA o 18AA cíclicos..

Como se menciona también anteriormente, en las fórmulas del péptido cíclico de la presente invención, h puede ser cualquier número entero de 1 a 15, preferentemente de 5 a 9, y/o i puede ser cualquier número entero de 0 a 14, preferentemente de 1 a 14, más preferentemente de 0 a 6 e incluso más preferentemente de 1 a 6. De acuerdo con ello, h puede ser 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 y/o i puede ser 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14. Preferentemente, h es 5, 8 o 9 y/o i es 3, 4 o 6. Más preferentemente, h es 8 y/o i es 4. En realizaciones particularmente preferidas de esta invención, x_h representa los tramos de aminoácidos particulares DEARR (SEQ ID NO: 35), AESDEARR (SEQ ID NO: 47) o RAESDEARR (SEQ ID NO: 36) y/o x_i representa los tramos de aminoácidos particulares DFV (SEQ ID NO: 37), DFVT (SEQ ID NO: 48) o DFVTNR ((SEQ ID NO: 38). En realizaciones particulares más preferidas de esta invención, x_h representa el tramo de aminoácidos particular AESDEARR (SEQ ID NO: 47) y/o X_i representa el tramo de aminoácidos particular DFVT (SEQ ID NO: 48).

El péptido cíclico de la presente invención (o la parte cíclica del mismo) puede constar de al menos 18 aminoácidos y de como máximo 25 aminoácidos. De acuerdo con ello, el péptido cíclico de la presente invención puede constar de 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos, por lo que se prefieren particularmente 18 o 25 aminoácidos y se prefieren lo más particularmente 22 aminoácidos. En una realización menos preferida, también péptidos más pequeños, es decir péptidos que comprenden 16 o 17 aminoácidos están previstos.

Un péptido cíclico particularmente preferido en el contexto de esta invención es uno de longitud de (21+1 =) 22AA, que tiene un tamaño máximo y mínimo de la molécula cíclica dependiente de la composición aminoacídica respectiva, constituido por 21 aminoácidos a partir de la secuencia primaria original del receptor beta1-adrenérgico humano (es decir, aminoácidos 200 a 221; Frielle 1987, PNAS 84, 7920-7924) con una glicina adicional como aminoácido 22º en el sitio de cierre de anillo asumido (posición 222).

Sin comprometerse con ninguna teoría, el número de aminoácidos y así la longitud de la estructura primaria (es decir, el armazón de aminoácidos) de péptidos cíclicos que unen anticuerpos anti-β₁-AR es crucial para sus efectos biológicos y/o elaboración exitosa/efectiva.

Una longitud peptídica igual o por encima de 26 aminoácidos (estructura primaria) puede estar estimulando directamente (es decir, sin el uso de proteínas transportadoras) células T inmunocompetentes y puede provocar así un efecto paradójico indeseado de producción de anticuerpo anti-β₁-receptor por estimulación de células B mediada por células T. Una longitud peptídica por debajo de 10 aminoácidos (estructura primaria) condujo a cristalización indeseada durante el procedimiento de producción y a problemas en disolver los productos sintetizados en una solución acuosa, por ejemplo para propósitos de inyecciones i.v. o s.c.

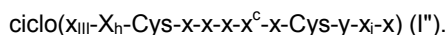
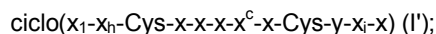
En una realización menos preferida de esta invención se proporcionan también los péptidos cíclicos que caen en las definiciones dadas anteriormente a) a e) de fórmula I y constituidos por solamente 16 aminoácidos o, incluso menos preferida, constituidos por solamente 17 aminoácidos. Un ejemplo no limitante de un péptido cíclico menos preferido tal es el péptido ciclo(Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-Tyr-Gln/DGlu) (formable por un armazón de aminoácidos según se describe en la SEQ ID NO: 39).

Se prefiere particularmente en el presente documento que el péptido cíclico divulgado contenga solamente una Pro. De acuerdo con ello, se prefiere particularmente que ni la y ni la x de las fórmulas representadas en el presente

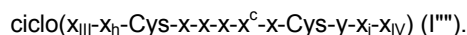
documento, a excepción de x^c sea Pro. Dentro del tramo de aminoácidos, x^c como se representa en la fórmula I (u otras fórmulas) es Pro.

5 Está particularmente previsto en el presente documento que el aminoácido ácido Asp preceda a la Pro contenida en el péptido cíclico de la invención. De acuerdo con ello, se prefiere que x como se describe en la fórmula I (u otra fórmula) que precede a x^c sea el aminoácido ácido Asp.

Más específicamente, el péptido cíclico de la presente invención pueden estar definidos por fórmula I' o I'':



Incluso más específicamente, el péptido cíclico de la presente invención puede estar definido por la fórmula I''' o I''':



En general, x_i y x_{ii} como se representan en la fórmula I' y I''' (y en las otras fórmulas representadas en el presente documento) pueden, según se menciona, ser cualquier aminoácido menos Cys. Sin embargo, en particular cuando el cierre de anillo de los péptidos cíclicos de la invención se produce entre x_i y x_{ii} , está particularmente previsto que X_i e X_{ii} sean dos aminoácidos capaces de formar un enlace peptídico, o similar, con cada uno de ellos en condiciones de una ciclación "cabeza a cola". Las ciclaciones "cabeza a cola" se conocen en la técnica (por ejemplo Kates y Albericio: Solid phase synthesis, CRC-Press, 2000; Williams, Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides, CRC-Press 1997; Benoiton: Chemistry of Peptide Synthesis. CRC-Press, 2005) y se dan ejemplos de los mismos en la parte experimental. Los posibles ejemplos de aminoácidos que pueden ser x_i son Gly, Val, Thr, Ser y preferentemente, Ala. Posibles ejemplos de aminoácidos que pueden ser x_{ii} son Glu y preferentemente, Gln. Menos preferido, x_{ii} también puede ser Asp o Asn. Lo más preferido, x_i es Ala y x_{ii} es Gln o Glu (preferentemente DGlu).

De acuerdo con ello, en los péptidos cíclicos de esta invención x_{ii} como se refiere en la fórmula I' y V'' puede ser Gln o Glu, en los que Glu también pueden ser DGlu (D-Glu; ácido D-glutámico). Sin embargo, los aminoácidos naturales se prefieren en el presente documento. Por lo tanto, se prefiere más que x_{ii} sea Gln.

25 La persona experta es capaz de elegir residuos de aminoácidos apropiados para ser x_i y/o x_{ii} de fórmula I y I''' de acuerdo con esta invención sobre la base de la enseñanza proporcionada en el presente documento y de su conocimiento de la técnica (por ejemplo Williams, Chemical Approaches to The Synthesis of Peptides, CRC-Press 1997; Benoiton: Chemistry of Peptide Synthesis. CRC-Press, 2005).

30 x_{III} y x_{IV} como se representan en la fórmula I'' y I'''' (y en las otras fórmulas representadas en el presente documento) pueden ser, como se menciona, cualquier aminoácido menos Cys. Sin embargo, en particular cuando el cierre de anillo de los péptidos cíclicos de la invención tiene lugar entre x_{III} y x_{IV} , está particularmente previsto que x_{III} y x_{IV} sean aminoácidos capaces de formar un enlace peptídico, con cada uno de ellos en condiciones de una ciclación "cabeza a cola". Un ejemplo de un aminoácido que pueden ser x_{III} es Arg. Un ejemplo posible y el más preferido, de un aminoácido que puede ser x_{IV} es un análogo de Gly o Gly. "Análogo de Gly" en este contexto quiere decir un residuo, particularmente un residuo aminoacídico, que tiene un carácter estructural similar a aquel de Gly. Particularmente, "análogo de Gly" se refiere a, por ejemplo, un residuo (aminoácido) que tiene el mismo tamaño (o incluso uno menor) que un residuo de Gly. Se ha encontrado sorprendentemente en el contexto de esta invención que particularmente un residuo (de aminoácido) pequeño como Gly en la posición " x_{IV} " conduce a un mimetismo mejorado del EC_{II} de β_1 -AR por los péptidos cíclicos correspondientes de la invención. LA PERSONA EXPERTA ES CAPAZ DE ELEGIR RESIDUOS DE AMINOÁCIDOS APROPIADOS PARA SER x_{III} Y/O x_{IV} de fórmula I'' y de acuerdo con esta invención en base a la enseñanza proporcionada en el presente documento y de su conocimiento de la técnica (por ejemplo Williams, Chemical Approaches to The Synthesis of Peptides, CRC-Press 1997; Benoiton: Chemistry of Peptide Synthesis. CRC-Press, 2005).

45 Se prefiere adicionalmente particularmente que los péptidos cíclicos de esta invención carezcan de Trp y/o de His. De acuerdo con ello, está particularmente previsto en el contexto de la invención, que ni una x ni una y como se representan en cualquiera de las Fórmulas I a I'''' sea Trp o His. Además, se prefiere que los péptidos cíclicos proporcionados carezcan de sitios susceptibles a proteasas de hidrólisis o de escisión, como, por ejemplo, proteasas séricas. El significado de los términos "hidrólisis" y "proteasas (séricas)" se conoce bien en la técnica.

50 Un péptido como se proporciona en el presente documento también se puede describir como un péptido constituido por o que comprende una secuencia homóloga a SEQ ID NO: 33 (representando tramo aminoacídico de tipo silvestre que comprende epítomos de β_1 -EC_{II}), en la que (a) el ácido amino correspondiente a la posición 13 (o, menos preferido, correspondiente a la posición 12) de la SEQ ID NO: 33 no es Cys y el aminoácido correspondiente a las posiciones 6 y 12 (o, menos preferido, correspondiente a la posición 6 y 13) de la SEQ ID NO: 33 es Cys, (b) en el que dicha secuencia de aminoácidos no contienen ninguna Cys adicional capaz de formar un enlace intramolecular dentro del péptido, es decir dentro de esa parte del péptido que es homóloga a SEQ ID NO: 33 y en la

que el péptido puede funcionar como un péptido cíclico de acuerdo con esta invención, por ejemplo es capaz de bloquear anticuerpos anti-β-AR, o en la que el péptido puede formarse como un péptido cíclico. Opcionalmente, las nuevas especificaciones dadas en el presente documento con respecto a la estructura de los péptidos lineales y/o cíclicos divulgados se aplican aquí, cambiando lo que haya que cambiar. El péptido así definido consta de un tramo de 16 aminoácidos que son homólogos a la SEQ ID NO: 33 flanqueada en el extremo N y C-terminal por uno o más aminoácidos, preferentemente aminoácidos que se dan en la naturaleza, como el "x_I/x_{III}" en la posición 1 y el "x_{III}/x_{IV}" en la última posición de fórmulas I' a I''' que se da en el presente documento.

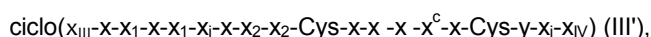
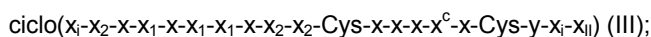
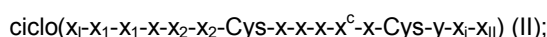
En el contexto de la invención y en particular en el contexto del (tipo silvestre) SEQ ID NO: 33, "homólogo" quiere decir idéntico en nivel de aminoácidos durante al menos el 18,75 %, al menos el 37,5 %, al menos el 50 %, al menos el 56,25 %, al menos el 62,5 %, al menos el 68,75 %, al menos el 75 %, al menos el 81,25 %, al menos el 87,5 % o el 93,75 %, en lo que se prefieren los valores más altos.

En general, el significado del término "aminoácido" o "residuo de aminoácidos" se conoce en la técnica y se usa en el presente documento de acuerdo con ello. Por lo tanto, es de destacar que cuando un "aminoácido" es un componente de un péptido/proteína el término "aminoácido" se usa en el presente documento en el mismo sentido que el de "residuo aminoacídico".

En particular, un "aminoácido" o "residuo aminoacídico" como se refiere en el presente documento se prevé preferentemente que sea aminoácido que se da en la naturaleza, más preferentemente un L-aminoácido que se da en la naturaleza (salvo el DGLu anteriormente mencionado). Sin embargo, aunque menos preferido, un "aminoácido" o "residuo de aminoácido" en el contexto de esta invención también puede ser un aminoácido que no se da en la naturaleza (es decir, uno sintético), como, por ejemplo, norleucina o B-alanina, o, particularmente en el caso de "y" de las fórmulas representadas en el presente documento, selenocisteína o un análogo de la misma.

También se conoce en la técnica el significado de los términos "aminoácido(s) ácido(s)", "aminoácido(s) básico(s)", "aminoácido(s) alifático(s)" y "aminoácido(s) polares(s)" (por ejemplo, Stryer, Biochemie, Spectrum Akad. Verlag, 1991, Artículo I. 2.). Estos términos se usan de forma correspondiente a lo largo de esta invención. Por lo tanto, se aplican también las salvedades particulares dadas en el presente documento con respecto a los péptidos cíclicos. En particular, el término "aminoácido(s) ácido(s)" como se usa en el presente documento se desea para querer decir un aminoácido seleccionado del grupo que comprende Asp, Asn, Glu, y Gln, preferentemente Asp y Glu; el término "aminoácido(s) básico(s)" como se usa en el presente documento se desea para querer decir un aminoácido seleccionado del grupo que comprende Arg, Lys e His, preferentemente Arg y Lys; el término "aminoácido(s) alifático(s)" como se usa en el presente documento se desea para querer decir cualquier aminoácido seleccionado del grupo que comprende Gly, Ala, Ser, Thr, Val, Leu, Ile, Asp, Asn, Glu, Gln, Arg, Lys, Cys y Met; y el término "aminoácido(s) polar(es)" como se usa en el presente documento se desea para querer decir cualquier aminoácido seleccionado del grupo que comprende Cys, Met, Ser, Tyr, Gln, Asn y menos preferido, Trp.

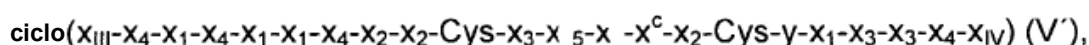
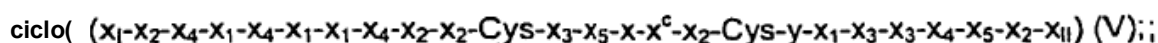
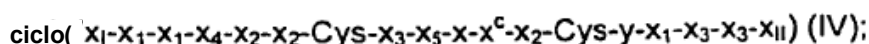
En un aspecto más general, el péptido cíclico como se divulga en el presente documento puede ser un péptido cíclico de fórmula II, III o III':



en las que

- a) x_1 está individualmente e independientemente seleccionado del grupo constituido por los aminoácidos ácidos; y/o
- b) x_2 está individualmente e independientemente seleccionado del grupo constituido por aminoácidos básicos.

En un aspecto más específico, el péptido cíclico según se divulga en el presente documento puede ser un péptido cíclico de fórmula IV, V o V':



en las que

- a) x_1 está individualmente e independientemente seleccionado del grupo constituido por los aminoácidos ácidos;
- 5 b) x_2 está individualmente e independientemente seleccionado del grupo constituido por aminoácidos básicos;
- c) x_3 está individualmente e independientemente seleccionado del grupo constituido por Leu, Ile, Val, Met, Trp, Tyr y Phe;
- d) x_4 está individualmente e independientemente seleccionado del grupo constituido por Ser, Thr, Ala y Gly; y/o
- e) x_5 está individualmente e independientemente seleccionado del grupo constituido por Gln y Asn.
- 10 En un aspecto adicional, los péptidos cíclicos comprenden un tramo aminoacídico según se define por posición aminoacídica 2-12 o 2-14 de fórmula II o IV, un tramo aminoacídico según se define por la posición aminoacídica 4-16 o 4-18 de fórmula II o V o un tramo aminoacídico según se define por la posición aminoacídica 3-15 o 3-17 de fórmula III' o V'. En un aspecto más general, el péptido cíclico como se describe en el presente documento puede ser un péptido cíclico de fórmula II, III o III'.
- 15 En un aspecto particular adicional, el péptido cíclico según se divulga en el presente documento puede comprender tramo de aminoácidos

aci-Glu-Ala-bas-bas-Cys-Tyr-neu-aci-neu-bas;

aci-neu-aci-Glu-Ala-bas-bas-Cys-Tyr-neu-aci-neu-bas;

aci-Glu-Ala-bas-bas-Cys-Tyr-neu-aci-neu-bas-Cys-Ser; o

- 20 aci-neu-aci-Glu-Ala-bas-bas-Cys-Tyr-neu-aci-neu-bas-Cys-Ser,

en el que "aci" representa aminoácido ácido; "neu" representa aminoácido neutro y "bas" representa aminoácido básico. Cada residuo de aminoácido de los dos tramos de aminoácidos anteriores puede definirse también independientemente como el residuo de aminoácido correspondiente de una cualquiera de las fórmulas I, II, III, III', IV, V, y V' como se proporcionan en el presente documento.

- 25 Los péptidos cíclicos como se proporcionan en el presente documento comprenden el tramo de aminoácidos

Asp-Xxx₁-Xxx₄-Arg-Arg-Cys-Xxx₃-Asn-Asp-Pro-Lys (SEQ ID NO: 45) o

Glu-Ser-Asp-Xxx₁-Xxx₄-Arg-Arg-Cys-Xxx₃-Asn-Asp-Pro-Lys (SEQ ID NO: 46),

- 30 en el que Xxx₁ se define como "x" o "x₁", Xxx₃ se define como "x" o "x₃" y/o Xxx₄ se define como "x" o "X₄" como se menciona en las fórmulas anteriormente representadas. Por ejemplo, el tramo de aminoácidos mencionado anteriormente puede ser

Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys (SEQ ID NO: 45) o

Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys (SEQ ID NO: 46).

- 35 Está especialmente previsto en el presente documento que los péptidos cíclicos de esta invención comprendan uno o más epítomos llevados por β_1 -EC_{II}, como, por ejemplo, epítomos llevados por cualquiera de los tramos de aminoácidos anteriormente mencionados (o por partes de los péptidos cíclicos divulgados que comprenden estos tramos de aminoácidos). En este contexto, el término "epítomo", se refiere en particular a un tramo de aminoácidos al que se une un (auto)anticuerpo anti- β_1 -AR. En particular, un epítomo en el contexto de esta invención consta de al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 6, al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11, al menos 12, al menos 13 o al menos 14 aminoácidos. La persona experta en la técnica está en la posición para
- 40 deducir que residuo(s) aminoacídico(s) particular(es) de β_1 -EC_{II} contribuye a (un) epítomo(s) al que se unen (auto)anticuerpos β_1 -AR. Así, él puede deducir que los residuos aminoacídicos particulares tienen al menos que estar comprendidos en los péptidos cíclicos de esta invención con el fin de asegurar que estos péptidos unen (auto)anticuerpos β_1 -AR. Para este propósito, varios medios y procedimientos conocidos en la técnica se pueden emplear (por ejemplo, los medios y procedimientos para el mapeo de epítomos (como PepSpots™, Biacore, rastreos
- 45 de aminoácidos (como rastreos de alanina)).

Ejemplos no limitantes de un péptido cíclico de acuerdo con esta invención son péptidos cíclicos seleccionados del grupo constituido por:

- a) péptidos cíclicos formables o formados por la secuencia aminoacídica como se representa en una cualquiera

de SEQ ID NO: 41, 43, 1 a 4 y 17 a 20;

- b) péptidos cíclicos formables o formados por una secuencia de aminoácidos como se codifica por una secuencia de nucleótidos como se describe en una cualquiera de SEQ ID NO: 42, 44, 9 a 12, 25 a 28, 49, 50, 53 y 54; y
- 5 c) péptidos cíclicos formables o formados por una secuencia de aminoácidos según se codifican por una secuencia de nucleótidos que difiere de la secuencia de nucleótidos como se describe en una cualquiera de SEQ ID NO: 42, 44, 9 a 12, 25 a 28, 49, 50, 53 y 54 debido a la degeneración del código genético.

De acuerdo con esta invención, aquellos péptidos cíclicos que son péptidos mutantes Cys-Ser, es decir, que tienen la Cys correspondiente a la tercera Cys del β_1 -EC_{II} (la Cys en posición 216 de β_1 -AR) intercambiada por Ser, se prefieren particularmente. Los ejemplos dados anteriormente se refieren a tales péptidos cíclicos particularmente preferidos. Como se demuestra en los ejemplos adjuntos, tales péptidos cíclicos son particularmente útiles para inhibir o diagnosticar anticuerpos anti- β_1 -AR.

La estructura particular de los péptidos cíclicos particularmente preferidos ejemplificados se da por una cualquiera de las siguientes fórmulas VI a IX':

15 ciclo(Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-Thr-Gly) (IX');

ciclo(Ala-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-Gln) (VI);

20 ciclo(Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Ser-Asp-Asp-Phe-Val-Thr-Asn-Arg-Gln) (VII);

ciclo(Ala-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-DGlu) (VIII); y

ciclo(Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Ser-Asp-Asp-Phe-Val-Thr-Asn-Arg-DGlu) (IX).

25 Ejemplos no limitantes de péptidos cíclicos menos preferidos son péptidos cíclicos seleccionados del grupo constituido por:

- a) los péptidos cíclicos formables o formados por la secuencia aminoacídica como se representan en una cualquiera de las SEQ ID NO: 5 a 8 y 21 a 24;
- 30 b) los péptidos cíclicos formables o formados por una secuencia aminoacídica según se codifica por una secuencia de nucleótidos como se representa en una cualquiera de SEQ ID NO: 13 a 16 y 29 a 32; y
- c) los péptidos cíclicos formables o formados por una secuencia de aminoácidos según se codifica por una secuencia de nucleótidos según se representa en una cualquiera de SEQ ID NO: 29 a 32 debido a la degeneración del código genético.

35 La estructura particular de los péptidos cíclicos menos preferidos ejemplificados se da por una cualquiera de las siguientes fórmulas X a XIII:

ciclo(Ala-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Ser-Cys-Asp-Phe-Val-Gln) (X);

ciclo(Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-Thr-Asn-Arg-Gln) (XI);

40 ciclo(Ala-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Ser-Cys-Asp-Phe-Val-DGlu) (XII);

ciclo(Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-Thr-Asn-Arg-DGlu) (XIII).

Los péptidos anteriores son menos preferidos ya que péptidos como los péptidos mutantes "Cys-Ser" (péptidos cíclicos "Cys-Ser") son, entre otras cosas, más funcionales in vivo que los péptidos mutantes "Ser-Cys" menos preferidos definidos en el presente documento (péptidos cíclicos "Ser-Cys").

5 En este contexto es de destacar que la mayoría de los ejemplos preferidos de los péptidos cíclicos de acuerdo con esta invención son particularmente aquellos péptidos cíclicos, la función farmacológica y/o diagnóstica de los cuales se ha demostrado en los ejemplo adjuntos (por ejemplo aquellos caracterizados por una cualquiera de fórmula VI a IX').

10 Se entenderá que para los diversos péptidos de la presente invención es posible una cierta flexibilidad y variabilidad en la secuencia primaria, es decir, el esqueleto de la secuencia aminoacídica, en la medida en que la estructura secundaria y terciaria general de los péptidos respectivos, que se define en al menos algunos residuos aminoacídicos fijos y por su disposición espacial, está asegurada (véase, por ejemplo, fórmula I, supra). En base a la enseñanza proporcionada en el presente documento, la persona experta está, por una parte fácilmente en la posición para encontrar variantes correspondientes de los péptidos de la invención. Por otra parte, la persona experta es capaz de probar si una variante dada de péptidos de la presente invención tiene todavía la función deseada, por ejemplo la capacidad para unir específicamente a anticuerpos β -AR y por lo tanto tiene el potencial para una intervención médica correspondiente, como las aplicaciones terapéuticas y diagnósticas descritas y proporcionadas en el presente documento. La directriz general correspondiente para tales pruebas, es decir ensayos respectivos, se proporciona ejemplarmente como se describe en el presente documento, particularmente en las reivindicaciones adjuntas.

20 De acuerdo con ello, también se describen en el presente documento variantes de los péptidos divulgados y descritos en el presente documento, dado que,

25 primero, estas variantes son aún funcionalmente activas de acuerdo con esta invención, es decir, funcionalmente activas como compañeros de unión para anticuerpos anti- β ₁-AR, particularmente para anticuerpos anti- β ₁-AR contra el β ₁-EC_{II}, más particularmente funcionalmente activos como inhibidores de β ₁-AR e incluso más preferentemente activos en inhibir la interacción entre β ₁-AR y anticuerpos anti- β ₁-AR contra el β ₁-EC_{II}, más preferentemente autoanticuerpos anti- β ₁-AR contra el β ₁-EC_{II}; y segundo, que estas variantes no están presentes en forma de mezclas de isómeros o no forman mezclas de isómeros cuando se ciclan de acuerdo con un procedimiento de producción como se describe en el presente documento. Estas variantes están previstas para tener sólo dos residuos de Cys que forman o que son capaces de formar solamente un enlace intramolecular individual (por ejemplo puente disulfuro).

30 Dentro de las variantes de los péptidos de la presente invención está, por ejemplo, previsto que uno o más aminoácidos de dichos péptidos se reemplacen por otros uno o más aminoácidos que se dan en la naturaleza o sintéticos. En este contexto, se prefiere que este/estos intercambio(s) aminoacídico(s) sea(n) (un) intercambio(s) aminoacídico(s) conservadores; *es decir* que el aminoácido de sustitución pertenezca a la misma categoría de aminoácidos que el aminoácido a reemplazarse. Por ejemplo, un aminoácido ácido puede reemplazarse por otro aminoácido ácido, un aminoácido básico puede reemplazarse por otro aminoácido básico, un aminoácido alifático puede reemplazarse por otro aminoácido alifático, y/o un aminoácido polar puede reemplazarse por otro aminoácido polar.

35 De acuerdo con ello, variantes particularmente preferidas y proporcionadas de los (ciclo)péptidos de la presente invención son variantes en que al menos uno de un aminoácido ácido se sustituirá por un aminoácido diferente seleccionado del grupo constituido por aminoácidos ácidos, al menos uno de los aminoácidos básicos está reemplazado por un aminoácido diferente seleccionado del grupo constituido por aminoácidos básicos, al menos uno de un aminoácido polar se reemplaza por un aminoácido diferente seleccionado del grupo constituido por aminoácidos polares y/o al menos uno de los aminoácidos alifáticos está reemplazado por un aminoácido diferente seleccionado del grupo constituido por aminoácidos alifáticos (dado que se satisfacen los requerimientos anteriormente mencionados).

Está especialmente previsto que los intercambios aminoacídicos que conducen a las variantes de los péptidos (cíclicos) revelados sean tales que el patrón de polaridad y carga dentro de la estructura terciaria de la variante resultante imita sustancialmente la estructura tridimensional del/de los epítopo(s) de EC_{II} de β ₁-AR.

40 Con respecto a las "Variantes" de los (ciclo)péptidos de la presente invención la Cys definida en el presente documento puede reemplazarse también por otros aminoácidos, en la medida en que el reemplazo aún conduzca a una unión intramolecular individual, como aquella de un enlace disulfuro, es decir a la evitación de formación de mezclas de isómeros durante la ciclación y/o a una imitación correcta del EC_{II} de β ₁-AR. Tal aminoácido puede, entre otras cosas, ser un aminoácido que no se da en la naturaleza, como un aminoácido que no se da en la naturaleza que tiene un grupo -SH capaz de formar un enlace disulfuro. Sin embargo, se prefiere en el presente documento que la Cys dada en fórmula I, anteriormente, sea de hecho un aminoácido que se dé en la naturaleza, preferentemente la propia Cys.

También será reconocido por alguien experto en la técnica que uno o varios de los aminoácidos que forman el

péptido cíclico de la presente invención se puedan modificar. De conformidad con lo mismo cualquier aminoácido como se usa en el presente documento puede representar también su forma modificada. Por ejemplo, un resto de alanina como se usa en el presente documento puede comprender un residuo modificado de alanina. Tales modificaciones pueden, entre otras, ser una metilación o acilación o similares, de modo que tal modificación o aminoácido modificado está comprendido preferentemente en la presente invención en la medida en que el aminoácido así modificado y más particularmente el péptido que contiene dicho aminoácido así modificado es aún funcionalmente activo según se define en el presente documento, como funcionalmente activo como un inhibidor de anticuerpos anti- β_1 -AR, preferentemente activo en inhibir la interacción entre β_1 -AR y anticuerpos y más preferentemente auto-anticuerpos dirigidos contra β_1 -AR. Los ensayos respectivos para determinar si un péptido tal, es decir un péptido que comprende uno o varios aminoácidos modificados satisface este requerimiento, se conocen por una persona experta en la técnica y, entre otros, también se describen en el presente documento, en particular en la parte de ejemplos de la presente memoria.

La invención también proporciona derivados de los péptidos (cíclicos) divulgados tales como sales con ácidos orgánicos e inorgánicos fisiológicos tales como HCl, H_2SO_4 , H_3PO_4 , ácido málico, ácido fumárico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido acético.

Como se usan en el presente documento, las secuencias de los péptidos divulgadas se indican desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, por lo que el extremo N-terminal está en el lado izquierdo y el extremo C-terminal está en el lado derecho de la secuencia de aminoácidos representada respectiva. Cuando nos referimos a péptidos cíclicos, las secuencias correspondientes se indican desde el lado correspondiente al lado izquierdo de la fórmula I hasta el lado correspondiente al lado derecho de la fórmula I.

Un "péptido cíclico" o "ciclopéptido" y similares de conformidad acuerdo con lo dispuesto en la presente invención es un péptido que forma intramolecularmente una estructura de anillo con su armazón de aminoácidos/secuencia de aminoácidos primordial por al menos una, preferentemente por al menos dos, más preferentemente por exactamente dos uniones intramoleculares, que tienen carácter covalente. La formación de esta estructura de anillo molecular se llama también "ciclación", en el contexto de esta invención.

En una realización particularmente preferida, el péptido cíclico de la presente invención tiene dos uniones covalentes intramoleculares que tienen carácter covalente, en el que una de estas uniones es una unión intramolecular entre los extremos N- y C-terminales de un péptido que es el armazón aminoácido/secuencia de aminoácidos primordial del péptido cíclico divulgado y la otra es una unión intramolecular entre dos aminoácidos no terminales de este péptido. Como se ha mencionado, estos dos aminoácidos no terminales pueden ser dos Cys.

Generalmente, "ciclación" de acuerdo con esta invención puede tener lugar por al menos una unión que es una unión covalente seleccionada del grupo constituido por uniones S-S, uniones peptídicas, enlaces de carbono tales como C-C o C=C, enlaces éster, enlaces éter, enlaces azo, uniones C-S, uniones C-N-C y uniones C=N-C. Particularmente, el enlace peptídico como se menciona por toda esta invención puede estar formado por el grupo NH_2 de un aminoácido N-terminal y el grupo COOH de un aminoácido C-terminal de un péptido que forma el armazón aminoácido/secuencia primordial de aminoácidos del péptido cíclico divulgado.

Preferentemente, una unión intramolecular entre los extremos N- y C-terminales de un péptido que forma el armazón aminoácido/secuencia primordial de aminoácidos del péptido cíclico divulgado es un enlace peptídico y una unión intramolecular entre dos aminoácidos no terminales de este péptido es una unión S-S (es decir, enlace disulfuro). En el contexto de esta invención, un enlace intramolecular S-S dentro del péptido cíclico proporcionado puede formarse entre dos residuos de Cys dentro del armazón aminoácido/secuencia de aminoácidos primordial de dicho péptido cíclico.

Dentro de los péptidos cíclicos de esta invención, no solamente se pueden formar las dos uniones covalentes intramoleculares particulares anteriormente mencionadas sino que también pueden tener lugar uniones intramoleculares adicionales, con la excepción de que la funcionalidad descrita en el presente documento del péptido cíclico se mantiene y los péptidos cíclicos pueden aún caracterizarse fácilmente bioquímicamente, lo que, por ejemplo, significa que no se forman mezclas de isómeros durante la ciclación del armazón aminoácido/secuencia de aminoácidos primordial correspondiente.

Por ejemplo, tales uniones intramoleculares adicionales intramoleculares son enlaces adicionales formados por una cadena lateral de grupos NH_2 y grupos COOH de los aminoácidos constituyentes.

Términos como "armazón aminoácido" o "secuencia de aminoácidos primordial" como se usan por toda la presente invención se refieren, por una parte, a ese componente estructural o a parte de un péptido cíclico que es formable o está formado por su secuencia aminoácida correspondiente. Por otro lado, estos términos se refieren a los péptidos lineales capaces de formar los péptidos cíclicos de esta invención por ciclación.

En un aspecto particular, se divulga un péptido cíclico, que es obtenible por el procedimiento para producir un péptido cíclico como se proporciona en el presente documento. Las definiciones dadas anteriormente también se aplican con respecto a este péptido cíclico divulgado especialmente.

En un aspecto, también se divulgan tales péptidos, por los que son formables o por los que están formados los péptidos cíclicos divulgados. Particularmente estos péptidos son los péptidos lineales que forman o que son capaces de formar los péptidos cíclicos divulgados en el presente documento, es decir el armazón aminoacídico/secuencia de aminoácidos primordial de los mismos.

5 En general, un péptido lineal tal puede ser cualquier péptido, el enlace covalente de los extremos N- y C-terminales del cual dé como resultado un péptido cíclico como se divulga de acuerdo con la presente invención. Por ejemplo, un péptido lineal tal puede ser alguna clase de un compuesto intermedio en un procedimiento de producir los péptidos cíclicos de esta invención, como el procedimiento para producir un péptido cíclico como se divulga en el presente documento.

10 En general, el extremo N- y C-terminal de un péptido lineal divulgado en el presente documento puede ser cualquier par de aminoácidos situados en proximidad directa entre sí dentro del armazón aminoacídico de un péptido cíclico descrito en el contexto de esta invención. En otras palabras, la ciclación (cierre de anillo) del péptido cíclico de esta invención puede aparecer generalmente entre cualesquiera de dichos pares de aminoácidos. La persona experta está fácilmente en la posición para encontrar tales pares de aminoácidos particulares que son efectivos/adecuados para actuar como extremos N- y C-terminales de un péptido lineal divulgado en el presente documento, es decir que son efectivos/adecuados para actuar como un par de aminoácidos que está implicado en el cierre de anillo/ciclación según se define en el contexto de esta invención.

En un ejemplo preferido pero no no limitante, la ciclación (cierre de anillo) de un péptido lineal de esta invención puede tener lugar entre Ala y Gln o Glu, es decir el aminoácido N-terminal de este péptido lineal sería Ala y el aminoácido C-terminal sería Gln o Glu. Ejemplos de tales péptidos lineales capaces de formar el péptido cíclico de la presente invención son las SEQ ID NO: 1 a 4 y las menos preferidas SEQ ID NO: 5 a 8. En otro ejemplo preferido pero no limitante, la ciclación (cierre de anillo) de un péptido lineal de esta invención puede aparecer entre Lys y Pro, es decir el aminoácido N-terminal de este péptido lineal sería Lys y el aminoácido C-terminal sería Pro. Ejemplos de tales péptidos lineales capaces de formar el péptido cíclico de la presente invención son SEQ ID NO: 17 a 20 y las menos preferidas SEQ ID NO: 21 a 24. En un ejemplo más preferido pero no limitante, particularmente cuando se proporciona un péptido cíclico 22mérico, la ciclación (el cierre de anillo) de un péptido lineal como se describe en el presente documento pueden aparecer entre Arg y Gly, es decir el aminoácido N-terminal de este péptido lineal sería Arg y el aminoácido C-terminal sería Gly. Un ejemplo de un péptido lineal tal capaz de formar el péptido cíclico de la presente invención es la SEQ ID NO: 41.

30 En otro ejemplo más preferidos pero no limitante, particularmente cuando se proporciona el péptido cíclico 22mérico, la ciclación (cierre de anillo) de un péptido lineal como se describe en el presente documento pueden aparecer entre Lys y Pro, es decir, el aminoácido N-terminal de este péptido lineal sería Lys y el aminoácido C-terminal sería Pro. Un ejemplo de un péptido lineal tal capaz de formar el péptido cíclico de la presente invención es SEQ ID NO: 43.

Además de su armazón aminoacídico, los péptidos cíclicos de la invención pueden comprender además (por ejemplo, haber unido covalentemente) (a) sustituyente(s) adicional(es), como marcas, anclajes (como anclajes de membrana proteicos), marcas (como marcas de HIS) y similares. Los sustituyentes adecuados y los procedimientos para añadirlos al péptido cíclico de esta invención se conocen por aquellos de habilidad ordinaria en la técnica.

Ejemplos de marcas en este contexto incluyen, entre otras cosas, fluorocromos (como fluoresceína, rodamina, Rojo Texas, etc.), enzimas (como peroxidasa de rábano picante, P-galactosidasa, fosfatasa alcalina), isótopos radiactivos (como ³²P, ³³P, ³⁵S, ¹²⁵I o ¹²³I, ¹³⁵I, ¹²⁴I, ¹¹C, ¹⁵O), biotina, digoxigenina, metales coloidales, compuestos quimioluminiscentes o bioluminiscentes (como dioxetanos, luminol o acridinios). Una marca prevista particular que puede estar unida al péptido de esta invención es un fluorocromo que pertenece a un par FRET de fluorocromos, por ejemplo una variante de GFP (por ejemplo GFP, eGFP, EYFP o ECFP).

Una diversidad de técnicas están disponibles para marcar biomoléculas, se conocen bien por la persona experta en la técnica y se consideran que están dentro del alcance de la presente invención y comprenden, entre otras cosas, acoplamiento covalente de enzimas o grupos biotínico, fosforilaciones, biotinizaciones, cebado al azar, reducción de mellas, prolongación (usando transferasas terminales). Tales técnicas están, por ejemplo, descritas en Tijssen, "Practice and theory of enzyme immunoassays", Burden y von Knippenburg (Eds), Volumen 15 (1985); "Basic methods in molecular biology", Davis LG, Diber MD, 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 procedimientos de detección comprenden, pero no se limitan a, autorradiografía, microscopía de fluorescencia, reacciones enzimáticas directas e indirectas, etcétera.

El/los sustituyente(s) puede(n) estar unido(s) (por ejemplo covalentemente) a los péptidos cíclicos de la invención directamente o por medio de engarces. La persona experta está fácilmente en la posición para encontrar engarces apropiados para emplearse en este contexto.

En un aspecto adicional, se describe en el presente documento una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica el armazón aminoacídico/secuencia de aminoácidos de un péptido cíclico como se describe en el contexto de esta invención.

Se describe adicionalmente en el presente documento una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica los péptidos lineales como se describen en el presente documento.

Por ejemplo, tal molécula de ácido nucleico puede comprender una secuencia de nucleótidos como se representa en una cualquiera de SEQ ID NO: 42, 44, 9 a 12, 25 a 28, 49, 50, 53 y 54 o, menos preferidas, SEQ ID NO: 13 a 16 y 29 a 32 o una secuencia de nucleótidos que difiere de las mismas debido a la degeneración del código genético.

El significado de los términos "molécula(s) de ácido nucleico", "secuencia(s) de ácido nucleico" y "secuencia(s) de nucleótidos" y similares se conocen bien en la técnica y se utilizan de acuerdo con ello en el contexto de la presente invención.

Por ejemplo, "cuando se usan por toda esta invención, estos términos se refieren a todas las formas de tipos de secuencias nucleotídicas y/o de secuencias/moléculas de ácidos nucleicos que se dan en la naturaleza o que se generan recombinantemente así como a secuencias nucleotídicas y/o a secuencias/moléculas de ácidos nucleicos químicamente sintetizadas. Estos términos también abarcan análogos de ácidos nucleicos y derivados de ácidos nucleicos tales como por ejemplo ADN bloqueado, PNA, oligonucleótido tiofosfatos y ribo-oligonucleótidos sustituidos. Además, estos términos se refieren también a cualquier molécula que comprenda nucleótidos o análogos de nucleótidos.

Preferentemente, los términos "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). Las "molécula(s) de ácido nucleico", "secuencia(s) de ácido nucleico" y "secuencia(s) de nucleótidos" pueden elaborarse por metodología química sintética conocida para alguen de habilidad ordinaria en la técnica, o por el uso de tecnología recombinante, o pueden aislarse a partir de fuentes naturales, o por una combinación de las mismas. El ADN y el ARN pueden comprender opcionalmente nucleótidos no naturales y pueden ser de cadena simple o de cadena doble. "Molécula(s) de ácido nucleico", "secuencia(s) de ácido nucleico" y "secuencia(s) de nucleótidos" también se refieren a ADN y ARN en sentido correcto y antisentido, es decir, una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos específica en ADN y/o ARN.

Además, los términos "molécula(s) de ácido nucleico", "secuencia(s) de ácido nucleico" y "secuencia(s) de nucleótidos" y similares pueden referirse a ADN o ARN o a híbridos de los mismos o a cualquier modificación de los mismos que se conozca en el estado de la técnica (véase, por ejemplo, documentos US 5525711, US 4711955, US 5792608 o EP 302175 para ejemplos de modificaciones). Estas moléculas pueden ser de cadena simple o doble, lineales o circulares, naturales o sintéticas y sin ninguna limitación de tamaño. Por ejemplo, las "molécula(s) de ácido nucleico", "secuencia(s) de ácido nucleico" y "secuencia(s) de nucleótidos" pueden ser ADN genómico, ADNc, ARNm, ARN antisentido, ribozimal o un ADN que codifique tales ARN o quimeroplastos (Cole-Strauss Science 1996 273 (5280) 1386-9). Pueden estar en forma de un plásmido o de ADN o ARN vírico. "Molécula(s) de ácido nucleico", "secuencia(s) de ácido nucleico" y "secuencia(s) de nucleótidos" y similares pueden referirse también a (un) oligonucleótido(s), en el/los que cualquiera de las modificaciones del estado de la técnica tales como fosforotioatos o ácidos nucleicos peptídicos (PNA) están incluidas.

Las moléculas de ácido nucleico según se describen en el presente documento son particularmente útiles para producir un péptido cíclico de la invención, por ejemplo por el correspondiente procedimiento divulgado en el presente documento.

En otro aspecto, también está descrito en el presente documento un vector que comprende la molécula de ácido nucleico como se divulga en el presente documento y se describe anteriormente. 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 replicación o defectivos en replicación. En el último caso, la propagación vírica ocurrirá generalmente solamente en huésped/células que se complementan. La molécula de ácidos nucleicos divulgada en el presente documento puede estar unida a un vector particular que contiene marcadores seleccionables para propagación en un huésped. Generalmente, un vector plasmídico se introduce en un precipitado, tal como un precipitado de fosfato de calcio o de fosfato de rubidio, precipitado de cloruro, o en un complejo con un lípido cargado o en racimos basados en carbono, tales como fullereno. El vector debería ser un virus, se puede empaquetar in vitro usando una línea celular de empaquetamiento apropiada antes de aplicación a células huésped.

Preferentemente, la molécula de ácido nucleico como se divulga en el presente documento está operativamente unida a secuencias de control de expresión (por ejemplo, dentro del vector divulgado en el presente documento) permitiendo la expresión en células procariotas o eucariotas o en fracciones aisladas de las mismas. La expresión de dicho polinucleótido comprende la transcripción de la molécula de ácido nucleico, preferentemente en un ARNm trasladable. Los elementos reguladores que aseguran la expresión en células eucariotas, preferentemente células de mamífero, se conocen bien por aquellos expertos en la técnica. Comprenden usualmente secuencias reguladoras que garantizan el inicio de transcripción y opcionalmente señales de poli-A que aseguran la terminación de la transcripción y la estabilización del transcrito. Los elementos reguladores adicionales pueden incluir potenciadores transcripcionales así como potenciadores traduccionales. Los posibles elementos reguladores que permiten expresión en células huésped procariotas comprenden, p. ej., el promotor *lac*, *trp* o *tac* en *E. coli* y son ejemplos de

elementos reguladores que permiten la expresión en células huésped eucariotas los promotores *AOX1* o *GAL1* en levadura o el promotor del CMV, SV40 o VSR (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 de la iniciación de la transcripción, tales elementos reguladores también pueden comprender señales de terminación de la transcripción, tales como el sitio SV40-poli-A o el sitio tk-poli-A, corriente abajo del polinucleótido. En este contexto, los vectores de expresión adecuados se conocen en la técnica tales como vector de expresión pcDV1 de ADNc Okayama-Berg (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (Invitrogen), pSPORT1 (GIBCO BRL). Preferentemente, dicho vector es un vector de expresión y/o un vector de transferencia génica. Los vectores de expresión derivados de virus tales como retrovirus, adenovirus, virus vaccinia, virus adenoasociados, herpesvirus, o virus del papiloma bovino, se pueden usar para la administración de los polinucleótidos o el vector como se divulga en el presente documento en una población celular marcada como objetivo. Procedimientos que se conocen bien por aquellos expertos en la técnica pueden usarse para construir un vector según se divulga en el presente documento; véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. y Ausubel y cols., Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994). De forma alternativa, los polinucleótidos y vectores según se divulgan en la presente invención se pueden reconstituir en liposomas para administración a células objetivo.

El término "fracciones aisladas de los mismos" se refiere a fracciones de células eucariotas o procariotas o de tejidos que son capaces de transcripción o transcripción y traducción del ARN a partir del vector divulgado en el presente documento. Dichas fracciones comprenden proteínas que se requieren para transcripción de ARN o para transcripción de ARN y traducción de ARN en un polipéptido. Dichas fracciones aisladas pueden ser, por ejemplo, fracciones nucleares y citoplásmicas de células eucariotas, tales como de reticulocitos. Kits para transcribir y traducir ARN que comprenden las fracciones aisladas citadas de células o tejidos están comercialmente disponibles, por ejemplo, como reticulolisado de TNT (Promega).

De nuevo, como las moléculas de ácido nucleico divulgadas, también los vectores como se describen en el presente documento son particularmente útiles para producir un péptido cíclico de la invención, por ejemplo por el procedimiento correspondiente divulgado en el presente documento.

En un aspecto adicional, se divulga en el presente documento una célula huésped recombinante que comprende la molécula de ácido nucleico y/o el vector como se divulga en el presente documento. En el contexto de este aspecto, el ácido nucleico de molécula y/o el vector como se divulga en el presente documento pueden, entre otras cosas, usarse para manipulación genética de las células, por ejemplo, con el fin de expresar y aislar el armazón aminoacídico/secuencia primordial de aminoácidos del péptido cíclico divulgado en el presente documento y así, el péptido lineal se divulga en el presente documento.

Dicha célula huésped puede ser una célula procariota o eucariota; véase supra. La molécula o vector de ácido nucleico que está presente en la célula huésped puede bien integrarse en el genoma de la célula huésped o bien puede mantenerse extracromosómicamente.

La célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota, tal como una célula bacteriana, de insecto, fúngica, vegetal, animal, de mamífero o, preferentemente, célula humana. Las células fúngicas preferidas son, por ejemplo, aquellas del género *Saccharomyces*, en particular aquellas de la especie *S. cerevisiae*, o aquellas pertenecientes al grupo de hongos hifales, por ejemplo varias cepas de especies de *Penicillium* o *Aspergillus*. El término "procariotas" se desea para incluir todas las bacterias que se pueden transformar o transfectar con una molécula de ácido nucleico para la expresión de un armazón aminoacídico/secuencia primordial de aminoácidos del péptido cíclico divulgado en el presente documento y así, del péptido lineal revelado en el presente documento. Los huéspedes procariotas pueden incluir bacterias gram-negativas, así como bacterias gram-positivas tales como, por ejemplo, *E. coli*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens* y *Bacillus subtilis*. Una molécula de ácido nucleico que codifica para un armazón aminoacídico/secuencia primordial de aminoácidos del péptido cíclico divulgado en el presente documento y así, para el péptido lineal divulgado en el presente documento se puede usar para transformar o transfectar un huésped usando cualquiera de las técnicas comúnmente conocidas por aquellos de habilidad ordinaria en la técnica. Los procedimientos para preparar genes fusionados, unidos operativamente y para expresarlos en bacterias o en células animales se conocen bien en la técnica (Sambrook, supra). Las construcciones y procedimientos genéticos descritos en ella se pueden utilizar para expresión del armazón aminoacídico/secuencia primordial de aminoácidos y del péptido lineal anteriormente mencionados en, por ejemplo, huéspedes procariotas.

En general, los vectores de expresión que contienen secuencias promotoras que facilitan la transcripción eficiente del polinucleótido insertado se usan en conexión con el huésped. El vector de expresión contiene típicamente un origen de replicación, un promotor y un terminador, así como genes específicos que son capaces de proporcionar la selección fenotípica de las células transformadas. Los huéspedes procariotas transformados pueden cultivarse en fermentadores y cultivarse de acuerdo con técnicas conocidas en la técnica para lograr crecimiento celular óptimo. Los péptidos expresados se pueden aislar del medio de cultivo, los lisados celulares, o las fracciones de membranas celulares. El aislamiento y purificación de los péptidos expresados microbianamente o de otro modo pueden ser por medios convencionales tales como, por ejemplo, separaciones cromatográficas preparativas y separaciones inmunológicas tales como aquellas que implican el uso de anticuerpos monoclonales y policlonales (Ausubel,

Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates y Wiley Interscience, N.Y. (1994)).

De nuevo, como las moléculas de ácidos nucleicos y los vectores según se describen en el presente documento, también las células correspondientes son particularmente útiles para producir un péptido cíclico de la invención, por ejemplo por el procedimiento correspondiente descrito en el presente documento.

5 En aún otro aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para producir un péptido cíclico de la presente invención, que comprende las etapas de

a) (i) cultivar una célula huésped recombinante como se divulga en el presente documento en condiciones tales que el armazón aminoacídico del péptido cíclico divulgado en el presente documento (o el péptido lineal divulgado en el presente documento) se exprese y recuperar dicho armazón aminoacídico (o dicho péptido lineal); o

10 (ii) sintetizar químicamente el armazón aminoacídico del péptido cíclico divulgado en el presente documento (o el péptido lineal divulgado en el presente documento); y

b) ciclación de dicho armazón aminoacídico (o de dicho péptido lineal) para formar el péptido cíclico divulgado en el presente documento.

15 Las definiciones dadas anteriormente con respecto al término "ciclación" se aplican aquí, cambiando lo que haya que cambiar. En el contexto particular del procedimiento anterior, el significado del término "ciclación" comprende tanto, la formación del puente intramolecular (enlace disulfuro) como el cierre de anillo conectando covalentemente los extremos N- y C-terminales de los armazones de los péptidos cíclicos a producirse.

20 Las definiciones dadas en el presente documento con respecto al péptido cíclico, su armazón aminoacídico o el péptido lineal correspondiente de acuerdo con esta invención, así como con respecto a la célula huésped divulgada en el presente documento, se aplican aquí, cambiando lo que haya que cambiar.

25 Como ya se ha mencionado anteriormente con respecto a los péptidos cíclicos y lineales divulgados; en una realización preferida de este aspecto adicional de la invención, el aminoácido N-terminal del armazón aminoacídico/péptido lineal que se cicla con el fin de producir un péptido cíclico de esta invención es Ala, Arg o Lys y el correspondiente aminoácido C-terminal es Gln, Gly o Glu (también es posible D_{Glu}) o Pro. Sin embargo, como se menciona anteriormente, también se prevén otros aminoácidos N- y C-terminales, es decir también se pueden emplear otros sitios de ciclación (cierre de anillo) en el contexto del procedimiento divulgado.

30 La persona experta en la técnica es fácilmente capaz de poner el procedimiento divulgado en el presente documento para producir un péptido cíclico en la práctica, en base a su conocimiento general común y a la técnica anterior como el documento WO 2006/103101, que divulga una metodología general como para sintetizar péptidos y particularmente péptidos cíclicos. Además, las enseñanzas de la invención, por ejemplo en la parte experimental adjunta (ejemplo 1), prevén permitir la directriz técnica.

35 En el ejemplo 1 no limitante de la invención, los mutantes ciclopeptídicos se sintetizaron primero en forma de sus péptidos lineales/armazones aminoacídicos (por ejemplo aplicando un enfoque de síntesis química, como la estrategia Fmoc/terc-butilo (como se describe en el documento WO 2006/103101; Chen W.C. y White P.D.: Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Oxford University Press 2003)) y se ciclaron después covalentemente en el armazón por condensación del grupo carboxilo C-terminal con el grupo amino del aminoácido N-terminal (ciclación "cabeza a cola"; Kates S. y Albericio F.: Solid phase synthesis, CRC-Press, 2000).

40 Posteriormente, se ha establecido un enlace disulfuro entre esos dos restos de cisteína de los péptidos lineales que son capaces de formar un enlace disulfuro (por ejemplo entre Cys₇ y Cys₁₃ del péptido 18mérico, entre Cys₁₀ y Cys₁₆ del péptido 22mérico o entre Cys₁₁ y Cys₁₇ del péptido 25mérico) por interacción química conocida en la técnica (por ejemplo Benoiton N.L.: Chemistry of Peptide Synthesis. CRC-Press, 2005).

45 En general, en el contexto de la etapa de "ciclación" del procedimiento descrito anteriormente, el cierre de anillo del armazón lineal de los péptidos cíclicos a producirse se puede llevar a cabo antes o después de la formación del puente S-S. En otras palabras, el puente S-S entre los dos residuos de Cys de la cadena de AA de los péptidos puede ser el primer paso en el procedimiento de "ciclación" del proceso de producción descrito y el cierre de anillo puede ser la segunda etapa, o viceversa. La persona experta es capaz de hallar cual de estas aproximaciones particulares es apropiada para un sistema dado de las precondiciones de producción.

50 Como se menciona anteriormente, los péptidos lineales/armazones aminoacídicos de los péptidos cíclicos a producirse se pueden producir también por técnicas de manipulación recombinantes. Tales técnicas se conocen bien en la técnica (por ejemplo Sambrook, supra). Como también se menciona anteriormente, por esta clase de producción de dichos péptidos lineales/armazones aminoacídicos se puede tomar ventaja particular de las moléculas de ácidos nucleicos, vectores y/o células huésped descritos. Las definiciones dadas de forma correspondiente anteriormente se aplican aquí, cambiando lo que haya que cambiar.

Se conocen en la técnica varios enfoques de síntesis peptídica en particular enfoques de síntesis de péptidos

cíclicos (por ejemplo Williams, Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides, CRC-Press 1997; Benoiton: Chemistry of Peptide Synthesis. CRC- Press, 2005). La persona experta está fácilmente en posición de aplicar el conocimiento de la técnica anterior a los requerimientos específicos del procedimiento divulgado para producir los péptidos cíclicos, en base a la enseñanza proporcionada en el presente documento.

5 Como ya se ha mencionado anteriormente, también se describe en el presente documento un péptido cíclico obtenible u obtenido por el procedimiento descrito anteriormente, pero también de un péptido lineal correspondiente (armazón aminoacídico/secuencia primordial del péptido cíclico correspondiente) obtenible u obtenido por el procedimiento descrito como alguna clase de producto intermedio (particularmente un producto obtenible u obtenido por etapa a) del procedimiento descrito anteriormente).

10 En general, el péptido cíclico de acuerdo con la presente invención puede, entre otras cosas, ser para usar en aproximaciones de intervención médica. Tales aproximaciones comprenden el uso como o en un agente diagnóstico y para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades o al uso en o como una composición, preferentemente una composición farmacéutica, una composición de diagnóstico o un kit de diagnóstico, preferentemente para la detección de anticuerpos anti- β -AR, más preferentemente para la detección de anticuerpos anti- β_1 -AR. Como se ha mencionado, los anticuerpos según se definen o describen en el presente documento son preferentemente autoanticuerpos.

Se describen en el presente documento usos y aplicaciones no limitantes de los compuestos divulgados, particularmente del péptido cíclico de acuerdo con la presente invención, por ejemplo en lo siguiente.

20 La presente invención también se refiere a una composición que comprende un péptido cíclico como se proporciona en el contexto de la presente invención y opcionalmente un vehículo. En una realización particular de este aspecto, dicha composición es una composición farmacéutica y dicho vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable.

25 La composición de esta invención, particularmente la composición farmacéutica de esta invención, es particularmente para el uso en el tratamiento, mejora o prevención según se describe y define en el presente documento. De acuerdo con ello, la composición farmacéutica de la presente invención puede ser para uso en el tratamiento, mejora o prevención de una enfermedad donde la actividad de una β -AR está potenciada o para el tratamiento de un paciente que tiene anticuerpos frente a un β -AR. Además, la composición farmacéutica de la presente invención puede ser para usar en inducir tolerancia inmune de un paciente, en particular tolerancia inmune de un paciente con respecto a los tramos inmunogénicos del β_1 -AR endógeno.

30 Aparte de contener al menos un péptido cíclico de la presente invención, la composición (farmacéutica) proporcionada puede comprender bien dos o bien una pluralidad (como al menos 3 o al menos 5) de péptidos cíclicos de la presente invención.

35 Asimismo, no sólo uno, sino también dos o una pluralidad (como al menos 3 o al menos 5) de dichos péptidos cíclicos pueden ser para usar en administrar a un paciente en necesidad de intervención médica de acuerdo con la presente invención. Por lo tanto, la administración de dichos más de uno péptidos cíclicos puede ser simultáneamente o sucesivamente.

Además, en una realización particular, la presente invención se refiere a la composición farmacéutica, el procedimiento o usos para intervención médica del péptido cíclico o la composición farmacéutica como se describe en el presente documento, en el que dicho péptido cíclico está para administrarse con o dicha composición farmacéutica comprende al menos un agente farmacéuticamente activo adicional.

40 Dicho al menos un agente farmacéuticamente activo puede ser un bloqueante de receptores de β , preferentemente un bloqueante selectivo de β -AR, como, por ejemplo, un bloqueante de β_1 -AR seleccionado del grupo constituido por atenolol, metoprolol, nebivolol, bisoprolol y similares. Sin comprometerse con ninguna teoría, esta clase de combinación particular mantiene protección frente a la regulación a la baja de β_1 -AR selectiva, inducida por anticuerpos por los péptidos cíclicos proporcionados en el presente documento, dado que β_1 -AR está al mismo tiempo regulado al alza por beta-bloqueantes, como bisoprolol o metoprolol y da como resultado en última instancia un efecto sinérgico de los péptidos cíclicos y el/los β -bloqueante(s) adicionales(s).

El vehículo opcionalmente comprendido en la composición (farmacéutica) de la invención o a administrarse conjuntamente con la composición (farmacéutica) o con el péptido cíclico de la invención puede ser particularmente un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.

50 Estos vehículos se conocen bien en la técnica. La persona experta está fácilmente en la posición para encontrar vehículos adecuados que son particularmente adecuados para emplearse de acuerdo con la presente invención.

En lo siguiente, se describen varios esquemas de administración no limitantes y el uso del vehículo farmacéuticamente aceptable correspondientemente adecuado.

55 Para usar en una administración de la composición farmacéutica y/o los péptidos cíclicos de acuerdo con esta invención por medio de inyección subcutánea (s.c.) o intravenosa (i.v.), los compuestos de la invención pueden

formularse en solución acuosa, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer, o tampón de solución salina fisiológica. Para la administración transmucosal y transpulmonar, se usan en la formulación penetrantes apropiados para la barrera a permearse. En general, tales penetrantes se conocen en la técnica.

5 El uso de vehículos farmacéuticamente aceptables para formular los compuestos de acuerdo con la presente invención en dosificaciones o composiciones farmacéuticas adecuadas para administración sistémica, es decir, intravenosa/intraarterial, o subcutánea está dentro del ámbito de la presente invención. Con elección apropiada del vehículo y práctica de fabricación apropiada, las composiciones de la presente invención, en particular aquellas formuladas como soluciones, pueden administrarse parenteralmente, tal como por inyección intravenosa. Los compuestos se pueden formular fácilmente usando vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica en dosificaciones adecuadas para administración subcutánea u oral. Tales vehículos permiten a los compuestos de acuerdo con la presente invención formularse como comprimidos, píldoras, cápsulas, grageas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones densas, suspensiones y similares, para ingestión oral por un sujeto a tratarse.

10 Los compuestos de acuerdo con la presente invención, o los medicamentos que los comprenden, destinados a administrarse intracorporalmente/intracelularmente pueden administrarse usando técnicas bien conocidas por aquellos de habilidad ordinaria en la técnica. Por ejemplo, tales agentes pueden encapsularse en liposomas, después administrarse como se describe anteriormente. Los liposomas son bicapas lipídicas esféricas con interiores acuosos. Todas las moléculas presentes en una solución acuosa en el momento de la formación de liposomas se incorporan en el interior acuoso. Los contenidos liposomales están tanto protegidos del microentorno externo y debido a que los liposomas se condensan con membranas celulares, se administran cerca de la superficie celular. Sistemas de liberación que implican liposomas están divulgados en Patente de los EE.UU. N.º: 4.880.635 cedida a Janoff y cols. Las publicaciones y patentes proporcionan descripciones útiles de técnicas para administración de fármacos liposomales.

15 Las composiciones farmacéuticas que comprenden un compuesto de acuerdo con la presente invención para usar en administración parenteral y/o subcutánea incluyen soluciones acuosas de los compuesto(s) activo(s) en forma soluble en agua. Adicionalmente se pueden preparar suspensiones de los compuestos activos como 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 de inyecciones acuosas pueden contener compuestos que incrementan la viscosidad de la suspensión, tales como carboximetilcelulosa de sodio, sorbitol, dextrano, o similares. Opcionalmente, la suspensión también puede contener estabilizantes o agentes adecuados que incrementan la solubilidad de los compuestos para permitir la preparación de soluciones altamente concentradas y para permitir una liberación lenta constante de la sustancia en el organismo.

20 Está claro para la persona experta que, de acuerdo con la presente invención, la composición farmacéutica revelada o el péptido cíclico revelado pueden administrarse en una dosis farmacéuticamente/terapéuticamente efectiva, lo que significa que se alcanza una cantidad farmacéuticamente/terapéuticamente efectiva. Preferentemente, una dosis farmacéuticamente/terapéuticamente efectiva se refiere a aquella cantidad del compuesto administrado (ingrediente activo) que produce mejora de los síntomas o una prolongación de la supervivencia de un sujeto que se puede determinar por alguien experto en la técnica haciendo pruebas de rutina.

25 Es de destacar que el régimen de dosificación de los compuestos a administrarse de acuerdo con la presente invención se determinará por el médico que atiende y los factores clínicos. Como se conoce bien en la técnica médica, aquella dosificación para cualquier paciente depende de muchos factores, incluidos el tamaño del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto concreto que se ha de administrar, el sexo, el tiempo y la vía de administración, la salud general y otros fármacos que se estén administrando concurrentemente. Un experto en la técnica es consciente de las dosis relevantes y es capaz de poner a prueba las dosis relevantes, a las que están para administrarse los compuestos a aplicarse médicamente de acuerdo con la presente invención.

30 Como se muestra en el presente documento, el efecto de los péptidos cíclicos proporcionado en el presente documento, a saber el bloqueo de anticuerpos anti β_1 -AR, puede obtenerse de un modo dependiente de dosis. Por lo tanto, la eficiencia de los ciclopéptidos mutados Cys \rightarrow Ser como se describen en el presente documento depende de una concentración umbral (Fig. 14, 15 y 16 B, C).

35 De acuerdo con ello, la composición farmacéutica divulgada o el péptido cíclico divulgado se puede administrar particularmente en una manera que está presente en una concentración, es decir alcanza una concentración umbral, de al menos 0,05 mg por kg de peso corporal, preferentemente en una concentración de al menos 0,1 mg por kg de peso corporal, más preferentemente en un intervalo de 0,1 mg por kg de peso corporal (100 μ g/kg) hasta 100 mg por kg de peso corporal, más preferentemente en un intervalo de 1 mg por kg de peso corporal a 100 mg por kg de peso corporal y lo más preferentemente en un intervalo de 1 mg por kg de peso corporal a 10 mg por kg de peso corporal. Particularmente, la dosis efectiva de la composición farmacéutica divulgada o del péptido cíclico divulgado puede estar en aproximadamente 1 mg por kg de peso corporal. También se prevé que se alcancen concentraciones más altas de la composición farmacéutica divulgada o del péptido divulgado por esquemas de administración correspondientemente aplicados. Por ejemplo, tales concentraciones más altas pueden ser al menos 2, 3, 4 o 5 mg

por kg de peso corporal. Se prefieren las concentraciones de al menos de 1 mg por kg de peso corporal o de al menos 2 mg por kg de peso corporal.

5 Un esquema de administración no limitante particularmente preferido, a aplicarse en el contexto de esta invención es una aplicación s.c. o i.v. cada dos o cuatro semanas. En este contexto, es de señalar que en el modelo de rata empleado en el presente documento fue suficiente una dosis de 1 a 4 mg/kg i.v. en meses alternos para obtener niveles terapéuticos de los compuestos de acuerdo con la presente invención, con la dosis respectiva para seres humanos siendo preferentemente aproximadamente 0,3-10 mg/kg, i.v. o s.c., siendo más preferentemente aproximadamente 1-10 mg/kg i.v. o s.c., incluso siendo más preferentemente aproximadamente 1 a 5 mg/kg i.v. o s.c. Como se demuestra en el presente documento, la administración de los péptidos cíclicos divulgados puede activar inicialmente una respuesta inmune opuesta transitoria, en particular cuando se aplica en dosis más altas. 10 Tales respuestas inmunes transitorias a la larga están compensadas por la actividad inactivadora de los anticuerpos de los péptidos cíclicos administrados. Esto puede conducir a un efecto desacelerado de los péptidos cíclicos administrados, es decir a una eliminación decelerada de anticuerpos anti- β_1 -AR y así a una reducción decelerada de actividad β_1 -AR (aberrante).

15 La presente invención también se refiere a un péptido cíclico o a una composición farmacéutica como se describe en el presente documento y opcionalmente a un vehículo farmacéuticamente aceptable, para usar en

- a) el tratamiento, mejora o prevención de una enfermedad donde la actividad de una β -AR, preferentemente β_1 -AR, está potenciada;
- 20 b) el tratamiento de un paciente que tenía anticuerpos contra un β -AR, preferentemente contra β_1 -AR, o que puede sufrir de o estar en riesgo de desarrollar una enfermedad como se describe en el presente documento; o
- c) inducir inmunotolerancia.

25 Las enfermedades a intervenirse médicamente (a tratarse, aliviarse, evitarse o diagnosticarse) de acuerdo con esta invención o las enfermedades de las que sufre el paciente según se define y describe en el presente documento son preferentemente aquellas, donde el β_1 -AR está activado en una manera no fisiológica, más preferentemente está activado por anticuerpos, más preferentemente por auto-anticuerpos que están dirigidos contra el β_1 -AR. Ejemplarmente y preferentemente, las enfermedades a intervenirse médicamente de acuerdo con esta invención o las enfermedades de las que sufre el paciente según se define y describe en el presente documento comprenden, sin embargo, no están limitadas a, el grupo de enfermedades cardiacas.

30 En particular, las enfermedades cardiacas a intervenirse médicamente de acuerdo con la presente invención o las enfermedades cardiacas de las que sufre el paciente según se define y describe en el presente documento pueden comprender pero no están limitadas a enfermedad cardiaca infecciosa y no infecciosa, enfermedad cardiaca isquémica y no isquémica, enfermedad cardiaca inflamatoria y miocarditis, dilatación cardiaca, miocardiopatía idiopática, miocardiopatía dilatada (DCM) (idiopática), miocardiopatía inmune, fallo cardiaco y cualquier arritmia cardiaca incluyendo latidos de captura prematuros ventriculares o supraventriculares así como arritmia auricular 35 incluyendo fibrilación auricular y/o aleteo auricular. En otras palabras, la enfermedad de corazón como se refiere en las descripciones y definiciones dadas en el presente documento con respecto a los procedimientos o al péptido cíclico o a la composición farmacéutica de la invención pueden ser enfermedades cardiacas seleccionadas del grupo que comprende enfermedad cardíaca infecciosa y no infecciosa, enfermedad cardiaca isquémica y no isquémica, enfermedad cardiaca inflamatoria y miocarditis, dilatación cardiaca, miocardiopatía idiopática, miocardiopatía dilatada (DCM) (idiopática), miocardiopatía inmune, fallo cardiaco y cualquier arritmia cardiaca incluyendo latidos de 40 captura prematuros ventriculares o supraventriculares así como arritmia auricular incluyendo fibrilación auricular y/o aleteo auricular.

45 Es de destacar que la enfermedad más preferida para intervenirse médicamente (para tratarse, aliviarse, evitarse o diagnosticarse) de acuerdo con esta invención o la enfermedad más preferida de la que sufre el paciente según se define y describe en la presente invención es DCM, preferentemente DCM idiopática.

50 Un subgrupo particular de los "pacientes" para el propósitos de la presente invención son aquellos pacientes que sufren de cualesquiera de las enfermedades descritas en el presente documento, más particularmente, del grupo de enfermedades del corazón descritas en el presente documento y que tienen al mismo tiempo anticuerpos dirigidos contra β -AR, más preferentemente anticuerpos contra el β_1 -AR, por lo que los anticuerpos son preferentemente auto-anticuerpos.

Una enfermedad a intervenirse médicamente (a tratarse, aliviarse, evitarse o diagnosticarse) de acuerdo con esta invención o una enfermedad de la que sufre el paciente según se define y describe en el presente documento se desea que que se induzca por anticuerpos contra un β -AR, preferentemente por anticuerpos frente a β_1 -AR. Preferentemente, estos anticuerpos son auto-anticuerpos.

55 Los medios y procedimientos en el presente documento son particularmente útiles cuando se proporcionan en la profilaxis/prevención de una enfermedad según se define en el presente documento. Esto significa que el paciente se puede tratar con el péptido cíclico y/o la composición farmacéutica de la invención antes de la aparición (de

- síntomas) de una enfermedad según se define en el presente documento. Por ejemplo, este tratamiento preventivo puede seguir aplicación diagnóstica precedentes, que, por ejemplo, toma la ventaja de los medios y procedimientos de diagnóstico proporcionados en el presente documento. Por lo tanto, se prefiere que se aplique un tratamiento preventivo que toma ventaja de los medios y procedimientos terapéuticos de esta invención, cuando el riesgo de desarrollar una enfermedad según se define en el presente documento se diagnostica, por ejemplo cuando se detectan (auto-)anticuerpos anti- β -AR. En este contexto, un "paciente" preferido es uno que lleva riesgo de desarrollar una enfermedad según se define en el presente documento. En particular, un paciente tal es uno que tiene (auto-)anticuerpos anti- β -AR, preferentemente (auto-)anticuerpos anti- β_1 -AR, pero que no sufre (todavía) de una enfermedad según se define en el presente documento, o de síntomas de la misma.
- La tolerancia inmune a inducirse en el contexto de esta invención se prevé que se obtenga particularmente por supresión de la producción de anticuerpos contra los tramos inmunógenos de la molécula de β -AR, que, sin comprometerse con ninguna teoría, puede deberse a un bloqueo de los sitios de reconocimiento de antígenos de las células B (maduras) tempranas de producción de antígeno y de las células B de memoria.
- Está dentro de la presente invención que la composición farmacéutica o el péptido cíclico sea particularmente para usar en el tratamiento, prevención y/o mejora de cualquiera de las enfermedades y los grupos de pacientes o los pacientes según se definen en el presente documento, incluyendo la detección de anticuerpos anti- β -AR en estos pacientes usando los compuestos mencionados anteriormente.
- Un "paciente" para los efectos de la presente invención, es decir, a quien administrarse un compuesto de acuerdo con la presente invención o quien sufre de la enfermedad según se define y describe en el presente documento o quien se desea diagnosticarse de acuerdo con esta invención, incluye tanto seres humanos como otros animales y organismos. Así los compuestos y procedimientos de esta invención son aplicables a o en conexión con tanto aplicaciones de terapia de seres humanos como aplicaciones veterinarias incluyendo diagnóstico(s), procedimientos y métodos de diagnóstico así como procedimientos y métodos de estadiaje. En la realización preferida, el paciente es un mamífero, y en la realización más preferida el paciente es un ser humano.
- Los péptidos cíclicos mutantes de acuerdo con la presente invención pueden usarse también para la preparación de un medicamento para el tratamiento, prevención y/o mejora de cualquiera de las enfermedades y los grupos de pacientes/pacientes según se definen en el presente documento. Lo que se dice en el presente documento para la composición farmacéutica también se aplica al medicamento para la fabricación de los péptidos de la presente invención que se pueden usar.
- En aún un aspecto adicional, se describe en el presente documento un agente diagnóstico que comprende o que es un péptido cíclico o una composición de acuerdo con esta invención y opcionalmente al menos un compuesto biológicamente activo.
- Preferentemente el agente diagnóstico descritos en el presente documento consta de o comprende un péptido mutante de la presente invención, por lo que el péptido mutante comprende una marca. Tal marca puede seleccionarse del grupo que comprende marcadores radiactivos y marcas fluorescentes. Las marcas respectivas se conocen por aquellos expertos en la técnica. Las definiciones y descripciones de las marcas según se dan anteriormente se aplican aquí, cambiando lo que haya que cambiar. Típicamente, el péptido es la parte del agente diagnóstico que confiere características de unión específicas al agente diagnóstico, preferentemente unión a anti- β_1 -AR, mientras que la marca confiere las características de señalización al agente diagnóstico.
- El agente diagnóstico como se divulga en el presente documento puede comprender, aparte de (a) péptido(s) mutante(s) marcado(s) o no marcado(s) de la presente invención, un compuesto biológicamente activo adicional. Tal compuesto biológicamente activo puede ser un medio para conferir características de señalización al agente diagnóstico, particularmente en el caso de que los péptidos mutantes de la presente invención estén no marcados. Por ejemplo, el compuesto biológicamente activo adicional puede ser un anticuerpo, preferentemente un anticuerpo monoclonal y más preferentemente un anticuerpo que se une específicamente a un péptido mutante de la presente invención o a un complejo constituido por un péptido mutante de la presente invención y un anticuerpo anti- β -AR, preferentemente un anticuerpo anti- β_1 -AR.
- En un aspecto adicional, se divulga en el presente documento un procedimiento para diagnosticar una enfermedad según se define y describe en el presente documento que comprende las etapas de
- a) detectar anticuerpos contra un β -AR (por ejemplo en una muestra) usando el péptido cíclico o la composición o el agente diagnóstico de la presente invención; y
 - b) diagnosticar para dicha enfermedad, cuando la valoración de dichos anticuerpos está incrementada.
- En un aspecto adicional, en el presente documento se divulgan los péptidos mutantes, las composiciones farmacéuticas y los medicamentos con arreglo a la presente invención para usar en un procedimiento para diagnosticar un paciente que se puede tratar usando dichos compuestos de acuerdo con la invención actual. En el contexto de este procedimiento también se pueden emplear una etapa de detección de anticuerpos frente a un β -AR (por ejemplo en una muestra) usando los compuestos de la presente invención y/o una etapa de considerar si el

resultado de dicha etapa de detección indica una enfermedad según se definen en el presente documento. Como se ha mencionado, se indica una enfermedad según se define en el presente documento o el riesgo de desarrollar una enfermedad según se define en el presente documento, cuando la valoración de dichos anticuerpos anti-β-AR está incrementada.

5 En otro aspecto, se describe en el presente documento un péptido cíclico, una composición o un agente diagnóstico según se proporciona y se describe en el presente documento para usar en diagnosticar (por ejemplo en una muestra) una enfermedad según se definen en el presente documento. De nuevo, una enfermedad según se define en el presente documento o el riesgo de desarrollar una enfermedad según se define en el presente documento se indica por una valoración incrementada de anticuerpos anti-β-AR.

10 En el contexto de la presente invención el término "valoración incrementada de anticuerpos anti-β-AR" quiere decir que la valoración de los anticuerpos anti-β-AR (por ejemplo en una muestra derivada de un paciente a ser diagnosticado de acuerdo con esta invención) es mayor que el control de un paciente sano, es decir un paciente que no sufre una enfermedad según se define en el presente documento y/o un paciente que carece de anticuerpos anti-β-AR.

15 Como se menciona, en los pacientes sanos, los anticuerpos anti-β-AR son generalmente difícilmente detectables o no están presentes en absoluto o no son detectables en absoluto. Por consiguiente, una "valoración aumentada de anticuerpos anti-β-AR" de acuerdo con la presente invención se refiere preferentemente a cualquier aparición de anticuerpos anti-β-AR, es decir a cualquier presencia de una cantidad detectable de anticuerpos anti-β-AR.

20 Una "muestra" de acuerdo con la presente invención incluye, pero no se limita a, (a) muestra(s) biológica(s) o médica(s), como, por ejemplo (una) muestra(s) que comprende(n) célula(s) o tejido(s). Por ejemplo, tal(es) (una) muestra(s) puede(n) comprender material biológico de biopsia(s). El significado de "biopsias" se conoce en la técnica. Por ejemplo, las biopsias comprenden célula(s) o tejido(s) tomado(s), por ejemplo por el médico que atiende, de un paciente/sujeto según se describe en el presente documento. De forma ejemplar, pero no limitante, la muestra biológica o médica a analizarse en el contexto de la presente invención es o se deriva de sangre, plasma, glóbulos blancos, orina, semen, esputo, líquido cefalorraquídeo, linfa o células o tejidos linfáticos, células musculares, células cardíacas, células de las venas o arterias, células nerviosas, células de médula espinal, células cerebrales, células hepáticas, células renales, células del tracto intestinal, células de los testículos, células del tracto urogenital, células de colon, piel, hueso, médula ósea, placenta, líquido amniótico, pelo, pelo y/o folículos, células madre (embrionarias, neuronales, y/u otras) o líneas celulares primarias o inmortalizadas (linfocitos; macrófagos, o líneas celulares). Las "muestras" preferidas de conformidad con la presente invención son aquellas derivadas de sangre o plasma. La muestra biológica o médica según se define en el presente documento también puede ser biopsias o puede derivarse de biopsias, por ejemplo biopsias derivadas de tejido cardíaco, venas o arterias.

35 En un aspecto adicional, se divulga en el presente documento un kit diagnóstico, por ejemplo un kit diagnóstico para la detección de anticuerpos frente a un β-AR, que comprende el péptido cíclico, la composición, o el agente diagnóstico divulgado en el presente documento.

40 El kit divulgado comprende al menos uno de los compuestos según se divulgan en el presente documento de acuerdo con la invención, como, por ejemplo un péptido lineal o cíclico, una molécula de ácido nucleico, vector o célula huésped o una composición o agente diagnóstico. En un aspecto particular, el kit comprende adicionalmente un prospecto de instrucción, y/o un tampón para usar en la aplicación del kit, y/o al menos un recipiente de reacción para llevar a cabo la reacción de detección para la que el que el kit se usa o está para usarse. En un aspecto adicional, al menos uno, algunos o todos los reactivos usados en relación con la aplicación de dicho kit están presentes como partes útiles en llevar a cabo la(s) reacción/reacciones para el que el kit se utilice.

45 Los péptidos cíclicos, agentes diagnósticos o kits según se divulgan en el presente documento se pueden aplicar para la detección de β-AR. De acuerdo con ello, estos péptidos cíclicos, agentes diagnósticos o kits pueden ser particularmente útiles para identificar/detectar anticuerpos anti-β₁-AR unidos en superficies celulares y/o tisulares. Por ejemplo, los péptidos cíclicos, agentes diagnósticos o kits según se describen en el presente documento pueden usarse en propósitos de formación de imágenes, como la tomografía computerizada por emisión de fotón único (SPECT), MiBi, PET, tomografía de resonancia magnética (MRT) u otras técnicas de formación de imágenes de diagnóstico empleadas en medicina. Debido al patrón de distribución de CP marcado con ¹³¹I in vivo (Fig. 30), los péptidos cíclicos divulgados, agentes diagnósticos pueden, por ejemplo, ser particularmente útiles como marcadores específicos de órganos.

55 Un enfoque particular para usar los compuestos de acuerdo con la presente invención como un diagnóstico y en un procedimiento de diagnóstico, respectivamente, es un procedimiento de examen de tres etapas. Por ejemplo, este procedimiento comprende llevar a cabo un ELISA con los péptidos cíclicos de acuerdo con la presente invención así como determinar inmunofluorescencia y determinar respuestas de AMPc en células que expresan β-AR humano nativo. Se debe reconocer que cada una y cualquiera de las etapas anteriormente mencionadas pueden como tales preformarse para la detección de dichos anticuerpos usando los péptidos cíclicos de acuerdo con la presente invención. Un gran número de pacientes, por ejemplo pacientes con insuficiencia cardíaca, pueden así examinarse para anticuerpos anti-β₁-AR funcionalmente activos. En relación con tales (pero también con otros divulgados en el

presente documento) procedimientos de diagnóstico, la definición de anticuerpos anti- β_1 -AR funcionalmente activos se basa preferentemente en sus efectos sobre señalización mediada por receptor, es decir, sus efectos de AMPc celulares y en la actividad de la proteína cinasa dependiente de AMPc (PKA). El AMP cíclico es un segundo mensajero universal de muchos receptores acoplados a proteínas G incluyendo la familia β -AR. Ello ejerce sus efectos por medio de PKA, canales iónicos de apertura regulada por AMPc, fosfodiesterasas y proteínas de intercambio directamente activadas por AMPc, conocidas como Epac1 y 2. La técnica anterior describe varios procedimientos de fluorescencia para medir AMPc en células intactas que pueden usarse todas en relación con el procedimiento divulgado en el presente documento. La transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) entre variantes de proteína fluorescente verde (GFP) fusionadas a las subunidades reguladoras y catalíticas de PKA se ha descrito para estudiar las dinámicas espacio-temporales de AMPc en neuronas (Hempel.CM, Vincent P, Adams SR, Tsien RY, Selverston AI. Nature 1996; 384: 113-114) o miocitos cardiacos (Zaccolo M, Pozzan T., Science 2002; 295: 1711-1715).

Más recientemente, los indicadores de fluorescencia de cadena individual descritos en la técnica se caracterizan por tener una proteína fluorescente cian (CFP) o una proteína fluorescente amarilla (YFP) potenciada fusionada directamente al dominio de unión de AMPc de proteínas Epac, que permitió lograr una mayor sensibilidad y una mejor resolución temporal de las medidas de AMPc. Tal sistema se describe, entre otros en el documento W02005/052186. Tal sistema puede usarse en relación con cualquier procedimiento diagnóstico usando los péptidos cíclicos u otros compuestos correspondientes de acuerdo con la presente invención. Tal sistema también puede utilizarse para analizar la prevalencia de anticuerpos anti- β_1 -AR funcionalmente activos, sin embargo no está limitado a ello. Preferentemente tal procedimiento diagnóstico se aplica a una cohorte de pacientes de DCM previamente sometidos a prueba de anticuerpos o a cualquier individuo a valorarse en la medida de lo posible o a cualquier individuo sospechoso de sufrir o que sufre de cualquiera de las enfermedades descritas en el presente documento o que está en riesgo de sufrir de ellas. En una etapa adicional del procedimiento de diagnóstico y del procedimiento de examen, la capacidad de β -bloqueantes para inhibir activación de receptor inducida por anticuerpos anti- β_1 -AR puede valorarse y determinarse, respectivamente.

El ensayo descrito anteriormente que es un procedimiento basado en FRET como se describe en el documento WO 2005/052186 que hace uso de los péptidos de acuerdo con la presente invención es ventajoso en la medida en que es más simple, menos consumidor de tiempo y que al mismo tiempo revela o identifica todos los pacientes de DCM anteriormente considerados positivos en anticuerpos anti- β_1 -EC_{II}. Esta realización de un procedimiento basado en FRET de diagnóstico que hace uso de uno o varios de los péptidos de acuerdo con la presente invención se basa en detectar incrementos inducidos por anticuerpos en AMPc.

Tomados conjuntamente, el examen por Epac-FRET parece representar una aproximación de etapa individual muy sensible, que permite detectar anticuerpos de activación dirigidos contra el β_1 -AR humano. Por lo tanto, también se describe en el presente documento el uso de uno o varios de los péptidos de acuerdo con la presente invención para usar en un ensayo de Epac-FRET. Más preferentemente tal ensayo Epac-FRET es para usar en diagnóstico, incluso más preferentemente en diagnóstico de pacientes que sufren de o sospechosos de sufrir de cualquiera de las enfermedades descritas en el presente documento.

En vista de lo anterior, se prefiere particularmente usar o aplicar la tecnología de FRET, particularmente un sistema de detección basado en FRET, de acuerdo con esta invención.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un procedimiento para la detección de anticuerpos frente a un β -AR (por ejemplo en una muestra según se define en el presente documento) que comprende la etapa de poner en contacto el péptido cíclico de la invención con dichos anticuerpos a detectarse.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere al péptido cíclico, composición o agente diagnóstico como se divulga en el presente documento para detectar (por ejemplo en una muestra según se define en el presente documento) anticuerpos frente a un β -AR.

El procedimiento anterior para la detección de anticuerpos o péptido cíclico, composición o agente diagnóstico es particularmente útil para emplearse en el contexto de las aplicaciones diagnósticas según se describen en el presente documento

Por toda la presente solicitud, las siguientes abreviaturas tendrán los significados siguientes: Ab o ab: anticuerpo, Abs o abs: anticuerpos, AR: receptor adrenérgico, CE dominio extracelular de un β -AR, EC_{II} dominio extracelular II de un β -AR y AA aminoácido.

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

Las figuras muestran:

La **Figura 1** es un diagrama que representa el esquema del ciclopéptido β_1 -EC_{II} de 25 aminoácidos (AA) y de los ciclopéptidos β_1 -EC_{II} de 25 AA (anillos negros) con los residuos de Cys originales (bolas blancas) o las cisteínas mutadas de Ser (bolas negras; Cys/Ser o Ser/Cys, respectivamente) y los correspondientes perfiles de elución cromatográfica de líquidos de presión de líquidos alta detectados a una longitud de onda de 210 nm o de 220 nm,

respectivamente.

Para el ciclopeptido de Cys/Cys de β_1 -EC_{II}-25AA, se llevó a cabo HPLC en un Waters Separation Modul 2690 conjuntamente con un detector de absorbancia Waters Dual Lambda; se leyó la absorbancia a 220 nm. Después de la síntesis de péptidos y la ciclación, las muestras se disolvieron en H₂O/acetonitrilo (ACN) al 5 % y se cargaron en una columna Nucliosil 100-5/C18 (Macherey-Nagel Inc., Alemania; longitud de columna 250 mm, lumen 4 mm) con un flujo de 1 ml/min; después un gradiente de separación desde ACN al 5 % hasta ACN al 60 % en presencia de TFA al 0,2 % se hizo funcionar. La cantidad tenue que queda de péptido β_1 -EC_{II}-25AA lineal proporcionó un pico de péptido pequeño, típicamente entre 14 y 16 min, mientras que las fracciones que contienen el ciclopeptido Cys/Cys β_1 -EC_{II}-25AA aparecieron en un intervalo de 18 a 22 minutos.

Se realizó HPLC de los 25 AA-ciclopeptidos mutantes con una columna C18 de sílice (15 μ m, 120A, longitud 250 mm, lumen 4 mm) con un flujo de 1 ml/min seguido por un gradiente de separación de ACN desde el 5 % hasta el 60 % de ACN en presencia de TFA al 0,1 %. Las fracciones que contienen los mutantes β_1 -EC_{II}-25AA cíclicos se sometieron a seguimiento por absorción de UV (210 nm) y mostraron un pico de elución única afilado que aparece a ~ 10,5 min (mutante de Cys/Ser de 25AA, panel izquierdo) o a ~ 16,5 min (mutante de Ser/Cys de 25AA, panel derecho).

La **Figura 2** es un diagrama que representa el esquema de los ciclopeptidos de 25AA o de 18AA β_1 -EC_{II} mutantes (anillos negros) con los residuos de Cys originales (bolas blancas) o cisteínas mutadas de Ser (bolas negras; Cys/Ser o Ser/Cys, respectivamente), conjuntamente con los aminoácidos implicados en formar la estructura de anillo primario después del cierre cabeza a cola (sitio de cierre bien Ala-DGlu, o bien Pro-Lys).

Para la síntesis de los péptidos β_1 -EC_{II}-18AA (o β_1 -EC_{II}-25AA) cíclicos en fase sólida, Fmoc-Glu-ODmab u otro aminoácido de Fmoc que tiene un grupo protector de cadena lateral que puede escindirse selectivamente en una manera ortogonal, se incorpora en el extremo C-terminal del péptido lineal. La escisión del péptido cíclico de la resina de síntesis genera una amida peptídica (en el caso de D-Glu→Gln) y la retirada de los grupos protectores de la cadena lateral se hace tratando la resina con trifluoroacetato ácido/triisopropilsilano/etandiol/agua durante varias horas.

La **Figura 3** muestra seis paneles manifestando los perfiles de elución de HPLC de dos de los péptidos lineales (paneles izquierdos, 18 AA Cys/Ser y 25AA Cys/Cys, respectivamente) y de cuatro de los ciclopeptidos mutantes de la presente invención, todas ellos ciclopeptidos que contienen Gln con un sitio de cierre de Pro-Lys. La HPLC de los ciclopeptidos de 25AA o de 18AA mutantes se llevó a cabo en un Waters Separation Modul conjuntamente con un detector de absorbancia de UV; la absorbancia se leyó a 210 nm. Después de la síntesis de péptidos y la ciclación, las muestras se disolvieron en H₂O/acetonitrilo (ACN) al 5 % y se cargaron en una columna C18 de sílice (15 μ m, 120A, longitud de columna 250 mm, lumen 4 mm) con un flujo de 1 ml/min; después se hizo funcionar un gradiente de separación desde ACN al 5 % hasta ACN al 60 % en presencia de TFA al 0,1 %. Como se muestra para sus contrapartidas lineales, las fracciones que contenían los mutantes de β_1 -EC_{II}-18AA (fila superior, panel medio (Cys/Ser, ~ 14 min), panel derecho (Ser/Cys, ~ 16,5 min); o los mutantes de β_1 -EC_{II}-25AA (fila inferior, panel medio (Cys/Ser, ~ 10,6), panel derecho (Ser/Cys, ~ 16,5)) dieron picos de elución individuales agudos que aparecen en los puntos temporales indicados.

La **Figura 4** es un diagrama que representa la capacidad bloqueante de mutantes ciclopeptídicos β_1 -EC_{II}-18AA que tienen un cierre de anillo de D-Glu (mutación de Cys/Ser, columnas blancas; mutación Ser/Cys, columnas rayadas a la derecha en diagonal) en comparación con el ciclopeptido de 18AA que contiene 3 Cys (columnas negras) en un ensayo de competición de ELISA usando el péptido Cys/Cys de 25 AA lineal que contiene 3 Cys como un antígeno. Se describen los resultados representativos obtenidos con fracciones de IgG aisladas a partir de los sueros de 12 ratas positivas en anticuerpos inmunizadas diferentes. El eje y representa la eficiencia de bloqueo de los diversos péptidos usados dados en % de reactividad de ELISA bloqueada frente a reactividad de ELISA no bloqueada de los sueros después de preincubación (12 h durante toda una noche, 4 °C, incubador rotatorio) con los ciclopeptidos indicados.

La **Figura 5** es un diagrama que representa la capacidad de bloqueo de mutantes ciclopeptídicos β_1 -EC_{II}-18AA que tienen un cierre de anillo de D-Glu (mutación Cys/Ser, diamantes blancos; mutación Ser/Cys, diamantes negros) en comparación el péptido Cys/Cys de 25AA lineal que contiene 3 Cys (cuadrados negros) en un ensayo de competición de ELISA usando el péptido Cys/Cys de 25 aminoácidos lineal que contiene 3 Cys lineal como un antígeno. Se usó un suero representativo individual de una rata con miocardiopatía positiva (Fig. 4, rata número 4). El eje y representa la concentración de anticuerpos IgG anti- β_1 -EC_{II} específicos como se determina por ELISA, el eje x corresponde al exceso molar de péptidos lineales o cíclicos usado preincubar las fracciones de IgG (12 h, 4 °C, incubador rotatorio) asumiendo una estequiometría 1:1 (un péptido cíclico (masa molecular 2,1 kDa (MM)) o un péptido lineal (3,0 kDa MM)) se asume que bloquea un anticuerpo IgG (150 kDa, MM)).

La **Figura 6** es un diagrama que representa la capacidad de bloqueo de mutantes de ciclopeptido β_1 -EC_{II}-18AA que tienen un cierre de anillo de D-Glu en señalización mediada por receptor (ensayo de AMPc funcional) usando una aproximación por transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET). El efecto de la preincubación (12 h, 4 °C, incubador rotatorio) de anticuerpos IgG anti- β_1 -EC_{II} de una rata representativa (suero) (Fig. 4, rata número 4)

con mutantes ciclopeptídicos β_1 EC_{II}-18AA (mutación Cys/Ser, azul oscuro (3); mutación Ser/Cys, de color azul claro (4)) se comparó con el efecto de un ciclopeptido Cys/Cys de 25AA que contiene 3 Cys (rojo (2)) o con el resultado obtenido con anticuerpos IgG anti- β_1 -EC_{II} en ausencia de péptidos de bloqueo (negro (1)). El eje y representa la proporción YFP/CFP normalizada de las señales de emisión de FRET registradas, el eje x corresponde al tiempo de registro dado en segundos (s).

La **Figura 7** es un diagrama que reanuda el efecto de bloqueo de mutantes ciclopeptídicos que tienen un cierre de anillo después de preincubación (12 h, 4 °C, incubador rotatorio) con IgG aislado de 78 sueros de ratas positivas en anticuerpos inmunizadas en un ensayo de competición de ELISA usando el péptido-Cys/Cys 25AA que contiene 3 Cys lineal como un antígeno. Las columnas representan los resultados obtenidos con ciclopeptidos β_1 -EC_{II}-18AA (columna negra de mutación Cys/Ser; mutación Ser/Cys, columna blanca) comparados con el ciclopeptido de 18 AA que contiene 3 Cys (columna rayada verticalmente), el ciclopeptido de 25AA que contiene 3 Cys (columna rayada horizontalmente), o el péptido de 25AA lineal que contiene 3 Cys (columna rayada a la derecha en diagonal). Las barras de error indican el error estándar de la media (\pm SEM). El eje y representa la eficiencia de bloqueo de los diversos péptidos usados dados en % de reactividad de ELISA bloqueado frente a % de reactividad de ELISA no bloqueado de los sueros.

La **Figura 8** es un diagrama que reanuda la capacidad de bloqueo de mutantes ciclopeptídicos β_1 -EC_{II}-18AA (que tienen un cierre de anillo D-Glu) en un ensayo de competición de ELISA llevado a cabo con sueros de n = 82 ratas positivas en anticuerpos inmunizadas. Aproximadamente el 95% de los sueros se bloquearon eficientemente por el ciclopeptido mutado Cys/Ser β_1 -EC_{II} solo (representado esquemáticamente en la parte superior de la columna blanca izquierda), mientras que aproximadamente el 5% de los sueros se bloquean por ambos, el mutante Cys/Ser de 18 AA y el mutante Ser/Cys de 18 AA (el último representado esquemáticamente en la parte superior de la columna negra derecha).

La **Figura 9** es un diagrama compuesto de dos paneles (superior e inferior) que reanudan el efecto bloqueante tanto de mutantes del ciclopeptidos de 25AA como de mutantes de ciclopeptidos de 18AA que tienen un sitio de cierre de Gln, así como de mutantes de ciclopeptidos de 18AA que tienen un sitio de cierre de D-Glu después de preincubación (12 horas, 4 °C, incubación rotatoria) con suero aislado a partir de 69 ratas positivas en anticuerpos inmunizadas diferentes en un ensayo de competición de ELISA usando el péptido Cys-Cys de 25 AA lineal que contiene 3 Cys como un antígeno. El panel superior representa suero de rata que reacciona preferentemente con los ciclopeptidos mutados Cys/Ser (reacción de tipo 1, n = 64) separados en cyc25AA(Gln)-péptidos (izquierda) y cyc18AA(Gln y D-Glu)-péptidos (derecha). El panel inferior representa los sueros de ratas que reaccionan tanto con los ciclopeptidos mutados Cys/Ser como con los ciclopeptidos mutados Ser/Cys (reacción de tipo 2, n = 5), una vez separados en los resultados obtenidos con cyc25AA(Gln)-péptidos (izquierda) y cyc18AA(Gln y D-Glu)-péptidos (derecha).

Las primeras tres columnas del lado izquierdo dentro de los dos paneles representan los resultados obtenidos con el (Gln-)ciclopeptido de 25AA no mutado (columnas negras) y los (Gln-)ciclopeptido(s) β_1 -EC_{II}-25AA (mutación Cys/Ser, columnas blancas; mutación Ser/Cys, columnas rayadas horizontalmente).

Las cinco columnas del lado derecho dentro de los dos paneles representan los resultados obtenidos con el (Gln-)ciclopeptido de 18AA que contiene 3 Cys (columnas negras) en comparación con los diferentes ciclopeptidos de 18AA mutantes que contienen 2 Cys diferentes (mutante Cys/Ser de 18AA con un sitio de cierre de Gln; columnas blancas; mutante de Cys/Ser de 18AA con un sitio de cierre de D-Glu, columnas rayadas a la izquierda diagonalmente; mutante de Ser/Cys de 18AA con un sitio de cierre de D-Gln, columnas rayadas a la derecha diagonalmente; mutante de Ser/Cys de 18AA con un sitio de cierre de D-Glu, columnas rayadas verticalmente).

Las barras de error representan el error estándar de la media (\pm SEM). El eje y representa la eficiencia de bloqueo de los diversos péptidos usados dados en % de reactividad de ELISA bloqueado frente a % de reactividad de ELISA no bloqueado de los sueros.

La **Figura 10** es un diagrama que reanuda la capacidad de bloqueo de mutantes de (Gln-)ciclopeptido β_1 -EC_{II} en un ensayo de competición de ELISA llevado a cabo con sueros de n = 69 ratas inmunizadas positivas en anticuerpos. Aproximadamente el 93 % (n = 64) de los sueros se bloquearon eficientemente por el ciclopeptido mutado Cys/Ser β_1 -EC_{II}-18AA solo (representado esquemáticamente en la parte superior de la columna blanca izquierda), mientras que aproximadamente el 7 % (n = 5) de los sueros se bloquean por ambos, el mutante Cys/Ser de 18AA y el mutante Ser/Cys de 18AA (el último representado esquemáticamente en la parte superior de la columna negra derecha).

La **Figura 11** es un diagrama que reanuda la capacidad bloqueante dependiente de dosis (eje x, abscisa: exceso molar en veces de péptidos específicos) de diversos péptidos lineales y péptidos beta1-EC_{II} dados en % de la valoración de anticuerpo no bloqueado (eje y, ordenada), incluyendo péptidos lineales Cys/Cys 25AA (cuadrados negros), mutantes ciclopeptídicos de Cys/Ser de 25AA (cuadrados blancos), ciclopeptidos Cys/Cys de 18AA (diamantes negros), mutantes ciclopeptídicos Cys/Ser de 18AA (diamantes blancos) y mutantes de péptidos lineales Cys/Ser de 18AA (diamantes rayados verticalmente) en un ensayo de competición de ELISA llevado a cabo con sueros de n = 6 ratas positivas a anticuerpos inmunizadas elegidas al azar. Todos los sueros se bloquearon lo más

eficientemente por el ciclopeptido mutante Cys/Ser beta1-ECII-18AA seguido por el ciclopeptido Cys/Cys 18AA no mutante y el ciclopeptido mutante Cys/Ser de 25AA. Todos los ciclopeptidos fueron grandemente superiores a sus contrapartidas lineales (con o sin mutación) en términos de sus capacidades bloqueantes de anticuerpos ($P < 0,005$).

5 La **Figura 12** es un diagrama que reanuda la capacidad bloqueante in vivo de las cinco aplicaciones (profilácticas) totales de diversos péptidos beta1-ECII lineales y cíclicos, comenzada 3 meses después de la primera inmunización (y dos refuerzos de antígenos beta1-ECII/GST posteriores, correspondientes a un *protocolo de prevención*). Se determinaron valoraciones séricas de los anticuerpos de receptor beta 1 antes y 18-20 horas después de cada inyección peptídica (abcisa, tiempo en meses) y se dan en % de las correspondientes valoraciones de anticuerpos de ratas no tratadas inmunizadas (eje y, ordenada). Los péptidos inyectados fueron: péptidos lineales de Cys/Cys de 25 AA (cuadrados negros), ciclopeptidos Cys/Cys de 25AA (cuadrados blancos), ciclopeptido Cys/Cys de 18AA (diamantes negros), ciclopeptido mutante Cys/Ser de 18AA (diamantes blancos) y el mutante peptídico lineal de Cys/Ser de 18AA (diamantes rayados verticalmente). También *in vivo*, la eficacia de los péptidos cíclicos fue grandemente superior a sus contrapartidas lineales. La eficiencia más alta en términos de neutralización de anticuerpos se logró con 1,0 mg/kg de peso corporal (Pc) de ciclopeptidos Cys/Cys de 25AA o Cys/Cys de 18 AA no mutantes (decrecimiento del $87,7 \pm 2$ % o del $89,9 \pm 3$ % después de 5 inyecciones de ciclopeptidos, comparados con animales no tratados inmunizados; ambos $P < 0,005$), seguidos por el ciclopeptido mutante Cys/Ser de 18AA (decrecimiento del $54,5 \pm 2$ % después de 5 inyecciones ciclopeptídicas; $P < 0,05$), mientras que péptidos Cys/Cys de 25AA o mutantes Cys/Ser de 18AA lineales a una misma concentración no tuvieron ningún efecto bloqueante significativo (decrecimiento del $25,8 \pm 3$ % o del $4,5 \pm 11$ % después de 5 inyecciones, $P = 0,16$ o $P = 0,8$, respectivamente). Los círculos negros indican valoraciones de anticuerpos de animales inmunizados regularmente (cada 4 semanas) no tratados que sirven como referencia, fijada en el 100 %.

La **Figura 13** muestra los resultados de los ensayos de ELISPOT llevados a cabo con células B preparadas a partir tanto de la médula ósea (columnas de la izquierda) como del bazo (columnas de la derecha) de animales no tratados cardiomiopáticos positivos en anti-beta-1 inmunizados (no tratados con Beta1, columnas negras) comparados con aquellos aislados de animales cardiomiopáticos positivos en anticuerpo anti-beta1 inmunizados tratados profilácticamente con los ciclopeptidos Cys/Cys 25AA-ECII (Cys/Cys de 25 cíclicos, columnas rayadas verticalmente), el mutante ciclopeptídico Cys/Ser 18AA-ECII (Cys/Ser de 18 cíclico, Cys/Ser, columnas rayadas diagonalmente a la derecha) o el mutante peptídico Cys/Ser de 18AA-ECII lineal (Cys/Ser de 18 lineal, columnas rayadas horizontalmente). Para los ensayos, las placas de ELISPOT se revistieron durante toda una noche con el antígeno específico (GST/beta1-ECII-FP) en 0,05 mol/l de tampón de Tris, pH 9,4; después las placas se lavaron 3 veces y se bloquearon con BSA durante 3 horas a 37 °C. Subsecuentemente, las placas se incubaron durante toda una noche a 37 °C con linfocitos B bien desde el bazo o bien desde la médula ósea (cultivados en medio RPMI 1640/X-VIVO-15 suplementado con suero bovino fetal al 10 % (FCS)) con 1×10^6 a 1×10^3 células por pocillo. Después de 12 horas las células B se descartaron y las placas con las IgG segregadas por células B unidas se lavaron varias veces (PBS/Tween al 0,5 %) antes de la adición de IgG anti-rata secundaria conjugada con fosfatasa alcalina (0,3 µg/ml) para detectar IgG de rata unida. Después las placas se incubaron durante otras 3 horas a 37 °C, se lavaron varias veces con PBS/Tween al 0,5 % y se desarrollaron usando LMP/BICP 5:1 (1 ml por pocillo; "LMP" significa agarosa de fusión baja y "BICP" significa sal de *p*-toluidina 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, una tinción coloreada de azul) permitiendo una cuantificación de las manchas azules obtenidas, con cada mancha representando una célula del bazo o de médula ósea que segrega IgG específica de antígeno.

La **Figura 14** es un diagrama que reanuda el efecto bloqueante in vivo tanto de mutantes ciclopeptídicos 25AA como de mutantes ciclopeptídicos 18AA con un sitio de cierre de Gln, determinado después de la primera inyección intravenosa (i.v.) de 1,0 mg/kg de peso corporal (Pc) en ratas positivas a anticuerpos inmunizadas. Los sueros se extrajeron 18-20 horas después de la inyección i.v. de Pc 1,0 o 0,25 mg/kg de los péptidos indicados y se ensayaron para determinar la reactividad por ELISA usando péptido Cys/Cys de 25AA lineal conteniendo 3 Cys como un antígeno.

La primera fila dentro del panel representa el grupo de ratas ($n = 5$) tratadas con el (Gln)-ciclopeptido Cys/Ser de 25AA conteniendo 2 Cys (representado esquemáticamente en la parte superior de la primera fila, círculos rayados), la segunda y tercera fila representan a los grupos de ratas tratados con el mutante (Gln)-ciclopeptido Cys/Ser de 18AA a dos concentraciones diferentes ($n = 40$, peso corporal de 1 mg/kg; $n = 9$; 0,25 mg/kg de peso corporal, el esquema del péptido cíclico representado en la parte superior de la segunda fila, círculos blancos), la cuarta línea representa $n = 4$ animales tratados con el (Gln)-ciclopeptido Ser/Gly 18AA (1 mg/kg de peso corporal, el esquema del péptido cíclico representado en la parte superior de la cuarta fila, diamantes negros) y la quinta línea representa los resultados obtenidos con (Gln)-péptidos Cys/Ser de 18AA Cys conteniendo 2 Cys (esquema del péptido lineal representado en la parte superior de la quinta fila, círculos negros).

Las barras y números (en cajas) de cada fila representan los valores promedio de la capacidad bloqueante del péptido indicado respectivamente dada en % de la inmunoreactividad de ELISA de los sueros antes y 18-20 horas después de inyección peptídica i.v. (eje y).

60 La **Figura 15** es un diagrama que reanuda el efecto bloqueante in vivo tanto de mutantes ciclopeptídicos 25AA como de mutantes ciclopeptídicos 18AA con un sitio de cierre de Gln, determinado después de la primera inyección

intravenosa (i.v.) de 1 mg/kg de peso corporal o de 0,25 mg/kg de peso corporal (Pc) en ratas positivas a anticuerpos inmunizadas. Los sueros se extrajeron 18-20 horas después de la inyección i.v. de los diversos péptidos y se ensayaron por ELISA usando el péptido Cys/Cys de 25AA lineal conteniendo 3 Cys como un antígeno.

5 El gráfico representa la disminución relativa (o el incremento relativo) en valoraciones de anticuerpos anti-receptor β_1 en sueros de ratas inmunizadas positivas en anticuerpos después de inyección de los diversos péptidos y muestra el valor medio respectivo de la capacidad bloqueante del péptido indicado en % de la inmunorreactividad de ELISA del suero antes y 18-20 horas después de inyección i.v. (eje y). Los símbolos en el lado derecho del panel representan: cuadrado blanco, (Gln)-ciclopéptido mutante Cys/Ser de 18AA (1 mg/kg de Pc); diamante blanco, (Gln)-ciclopéptido mutante Cys/Ser de 18AA (0,25 mg/kg de Pc); diamante negro, (Gln)-ciclopéptido mutante Ser/Cys de 18AA (1 mg/kg de Pc); cuadrado rayado horizontalmente, (Gln)-péptido lineal mutante Cys/Ser de 18AA (1 mg/kg de Pc); cuadrado negro, mutante Cys/Ser de 25AA (Gln)-ciclopéptido (1 mg/kg de Pc). Por razones de claridad las barras de error no figuran en el gráfico.

15 La **Figura 16A** es un diagrama que reanuda el efecto bloqueante *in vivo* tanto de mutantes 25AA como de mutantes 18AA con un sitio de cierre de Gln, determinado después de un total de nueve inyecciones intravenosas (i.v.) de 1,0 mg/kg de peso corporal (Pc) de los péptidos indicados en ratas positivas a anticuerpos inmunizadas. Los sueros se retiraron antes de y 18-20 horas después de la inyección i.v. de los diversos péptidos cada 4 semanas (abscisa: tiempo en meses de tratamiento) y se sometieron a ensayo para reactividad por ELISA usando el Cys/Cys-péptido de 25AA como un antígeno.

20 El gráfico representa la disminución relativa (o el incremento relativo) en valoraciones de anticuerpos anti-receptor beta1-en sueros a partir de ratas inmunizadas positivas a anticuerpos después de inyección de los péptidos indicados y muestra el valor medio respectivo de la capacidad de bloqueo del péptido dado en % de la inmunorreactividad de ELISA inicial antes de empezar el tratamiento (eje y, ordenada).

Los símbolos indican:

25 círculos negros, animales inmunizados regularmente (cada 4 semanas) no tratados (n = 9); diamantes blancos, (Gln)-ciclopéptido mutante Cys/Ser de 18AA (1,0 mg/kg de Pc, n = 20); cuadrados negros, (Gln)-ciclopéptido mutante Cys/Ser de 25AA (1,0 mg/kg de Pc, n = 5).

30 La **Figura 16B** es un diagrama que reanuda el efecto bloqueante *in vivo* de diversas concentraciones de mutantes ciclopeptídicos de 18AA con un sitio de cierre de Gln, determinado después de un total de nueve inyecciones intravenosas (i.v.) de 0,25, 1,0, 2,0, y 4,0 mg/kg de peso corporal (Pc) en ratas positivas a anticuerpos inmunizadas, independientemente del "estado de capacidad de respuesta" de animales individuales. Los sueros se retiraron antes de y 18-20 horas después de la inyección i.v. de los diversos péptidos cada 4 semanas (abscisa: tiempo en meses) y se sometieron a ensayo para reactividad por ELISA usando el Cys/Cys-péptido de 25AA como un antígeno.

35 El gráfico representa la disminución relativa (o el incremento relativo) en valoraciones de anticuerpos anti-receptor beta1-en sueros a partir de ratas inmunizadas positivas a anticuerpos después de inyección de los péptidos indicados y muestra los valores medios respectivo de la capacidad de bloqueo de los péptidos dados en % de la inmunorreactividad de ELISA inicial antes de empezar el tratamiento (eje de las y, ordenadas).

Los símbolos indican:

40 círculos negros, animales inmunizados regularmente (cada 4 semanas) no tratados (n = 9); círculos blancos, (Gln)-ciclopéptido mutante Cys/Ser de 18AA (0,25 mg/kg de Pc, n = 4); diamantes blancos, (Gln)-ciclopéptido mutante Cys/Ser de 18AA (1,0 mg/kg de Pc, n = 20); diamantes rayados verticalmente, (Gln)-ciclopéptido mutante Cys/Ser de 18AA (2,0 mg/kg de Pc, n = 5); diamantes negros, (Gln)-ciclopéptido mutante Cys/Ser de 18AA (4,0 mg/kg de Pc, n = 9).

45 La **Figura 16C** es un diagrama que reanuda el efecto bloqueante *in vivo* de diversas concentraciones de mutantes ciclopeptídicos de 18AA con un sitio de cierre de Gln, determinado después de un total de nueve inyecciones intravenosas (i.v.) de 0,25, 1,0, 2,0, y 4,0 mg/kg de peso corporal (Pc) en ratas positivas a anticuerpos inmunizadas, con respecto sólo a las "respondedoras" sensibles a ciclopéptidos, definidas como animales que tienen, después de 7 inyecciones ciclopeptídicas, un nivel de receptor que queda máximo igual o inferior al 80 % de la valoración respectiva al comienzo de la terapia (comparar las curvas entre 16C y Fig. 16B, representando la última lo que ocurre en la naturaleza en respuesta homogénea de animales no seleccionados). Los sueros se extrajeron como se describe anteriormente y se sometieron a ensayo para reactividad por ELISA usando el Cys/Cys-péptido de 25AA como un antígeno. El gráfico representa el decrecimiento relativo en valoraciones de anticuerpos anti-receptor beta1 en sueros a partir de respondedores inmunizados positivos en anticuerpos después de inyección de los péptidos indicados que dan la capacidad de bloqueo en % de la inmunorreactividad de ELISA (eje de las y, ordenadas).

Los símbolos indican (número de respondedores en negrita):

55 círculos negros, animales inmunizados regularmente (cada 4 semanas) no tratados (n = 9); círculos blancos, (Gln)-ciclopéptido mutante Cys/Ser de 18AA (0,25 mg/kg de Pc, n = 3/4); diamantes blancos, (Gln)-ciclopéptido mutante

Cys/Ser de 18AA (1,0 mg/kg de Pc, n = 16/20); diamantes rayados verticalmente, (Gln-)ciclopéptido mutante Cys/Ser de 18AA (2,0 mg/kg de Pc, n = 2/5); diamantes negros, (Gln-)ciclopéptido mutante Cys/Ser de 18AA (4,0 mg/kg de Pc, n = 6/9).

5 **La figura 17.A** es un diagrama que muestra el curso temporal (mes 0 a 20) de los diámetros ventriculares izquierdos al final de la sístole y al final de la diástole (LVES, LVED) de animales GST/ β_1 -EC_{II}-inmunizados no tratados frente a animales GST/ β_1 -EC_{II}-inmunizados tratados con los diversos ciclopéptidos indicados (véase la leyenda) según se determina por ecocardiografía (sistema de ecocardiografía: Sonics Visual, Vevo 770 (versión V2.2.3), equipado con un transductor de 15-17,5 MHz), en el que LVES/LVED es diámetro ventricular izquierdo al final de la sístole/diámetro ventricular izquierdo al final de la diástole. Los símbolos indican:

10 círculos blancos, animales control no inmunizados inyectados con NaCl al 0,9 % no tratados (n = 10); círculos negros, animales inmunizados regularmente (cada 4 semanas) no tratados; diamantes blancos, (Gln-)ciclopéptido mutante Cys/Ser de 18AA (1,0 mg/kg de peso corporal, n = 20); cuadrados negros, (Gln-)ciclopéptido mutante Cys/Ser de 25AA (1,0 mg/kg de peso corporal, n = 5); cuadrados blancos, (Gln-)péptido lineal mutante Cys/Ser de 18AA (1,0 mg/kg de peso corporal, n = 5).

15 **La Figura 17.B** es un diagrama similar que muestra el curso temporal (mes 0 a 20) de los diámetros ventriculares izquierdos al final de la sístole y al final de la diástole (LVES, LVED) de animales GST/ β_1 -EC_{II}-inmunizados no tratados frente a animales GST/ β_1 -EC_{II}-inmunizados, tratados con diferentes concentraciones de mutante en ciclopéptido Cys/Ser de 18AA (véase la leyenda). Los símbolos indican:

20 círculos blancos, animales control no inmunizados inyectados con NaCl al 0,9 % no tratados (n = 10); círculos negros, animales inmunizados regularmente (cada 4 semanas) no tratados (n = 9); cuadrados blancos, (Gln-)ciclopéptido mutante Cys/Ser de 18AA (0,25 mg/kg de Pc, n = 4); diamantes blancos, (Gln-)ciclopéptido mutante Cys/Ser de 18AA (1,0 mg/kg de Pc, n = 20); diamantes rayados verticalmente, (Gln-)ciclopéptido mutante Cys/Ser de 18AA (2,0 mg/kg de Pc, n = 5); diamantes negros, (Gln-)ciclopéptido mutante Cys/Ser de 18AA (4,0 mg/kg de Pc, n = 9).

25 **La Figura 18** es un diagrama que indica la evolución de la valoración (mes 0 a 9) de anticuerpos anti- β_1 -EC_{II} en ratas inmunizadas con GST/ β_1 -EC_{II} frente a ratas inyectadas con NaCl al 0,9 %, por lo que "Beta1" significa animales inmunizados (antes de comenzar tratamiento con péptidos de acuerdo con la presente invención), y "controles de NaCl" significa animales de control inyectados con NaCl.

30 **La Figura 19A** es un diagrama que representa el curso temporal (mes 0 a 20) del "Índice cardiaco" (CI) en ml/min/g (peso corporal) como se determina por ecocardiografía (sistema ecocardiográfico véase la leyenda para la Figura 17a).

Los símbolos indican:

35 círculos blancos, animales control no inmunizados inyectados con NaCl al 0,9 % no tratados (n = 10); círculos negros, animales inmunizados regularmente (cada 4 semanas) no tratados; diamantes blancos, (Gln-)ciclopéptido mutante Cys/Ser de 18AA (1,0 mg/kg de peso corporal, n = 20); cuadrados negros, (Gln-)ciclopéptido mutante Cys/Ser de 25AA (1,0 mg/kg de peso corporal, n = 5); cuadrados blancos, (Gln-)péptido lineal mutante Cys/Ser de 18AA (1,0 mg/kg de peso corporal, n = 5).

40 **La Figura 19B** es un diagrama similar que muestra el curso temporal (mes 0 a 20) del "Índice cardiaco" (CI) en ml/min/g (peso corporal) como se determina por ecocardiografía (sistema ecocardiográfico véase la leyenda para la Figura 17a). Los símbolos indican:

45 círculos blancos, animales control no inmunizados inyectados con NaCl al 0,9 % no tratados (n = 10); círculos negros, animales inmunizados regularmente (cada 4 semanas) no tratados (n = 9); cuadrados blancos, (Gln-)ciclopéptido mutante Cys/Ser de 18AA (0,25 mg/kg de peso corporal, n = 4); diamantes blancos, (Gln-)ciclopéptido mutante Cys/Ser de 18AA (1,0 mg/kg de peso corporal, n = 20); diamantes rayados verticalmente, (Gln-)ciclopéptido mutante Cys/Ser de 18AA (2,0 mg/kg de peso corporal, n = 5).

50 **La Figura 20** muestra tres hileras de paneles (a, b, c) con parámetros hemodinámicos obtenidos en el estudio de terapia después de 10 meses de tratamiento, en detalle en la primera fila muestra en cada panel de la primera fila (a) en el lado izquierdo la frecuencia cardiaca (HF) dada en latidos por minuto (= lpm) y en el lado derecho la presión sanguínea sistólica (presión LV) dada en mm de Hg; en cada panel de la segunda fila (b) en el lado izquierdo la contractilidad (+ dP/dt) en mm de Hg/s y en el lado derecho la relajación (-dP/dt) en -mmHg/s; la tercera fila (c) muestra la presión diastólica final ventricular izquierda (LVEDP) como se determina por la cateterización cardiaca en mm de Hg.

55 Los paneles izquierdo y derecho dentro de cada fila separan datos obtenidos con (paneles izquierdos, constantemente 1,0 mg/kg de peso corporal de los diferentes péptidos) Cys/Ser de 18AA cíclico (columnas rayadas a la derecha diagonalmente, N = 20 animales), mutantes Cys/Ser lineales (columnas rayadas horizontalmente, n = 5 animales) y mutantes Cys/Ser de 25AA cíclicos (columnas rayadas verticalmente, n = 5 animales). Las columnas en

los paneles derechos representan los datos obtenidos con diversas concentraciones del mutante Cys/Ser cyc18AA; con columnas rellenas de blanco, colinas punteadas de negro que corresponden a 0,25 mg/kg de peso corporal (n = 4 animales), columnas rayadas a la derecha diagonalmente a 1,0 mg/kg de peso corporal (n = 10 animales), columnas rayadas a la izquierda diagonalmente a 2,0 mg/kg de peso corporal (n = 5 animales) y las columnas con estructuras negras a 4,0 mg/kg de peso corporal (n = 9 animales). Las columnas negras y blancas en cada panel sirven como una referencia y corresponden bien a animales inmunizados regularmente (cada 4 semanas) no tratados (control positivo, negro, n = 9), o a animales control no inmunizados inyectados con NaCl al 0,9 % (control negativo, blanco, n = 10).

En las leyendas "no tratados con Beta1" significa animales no tratados cardiomiopáticos positivos en anticuerpos anti-beta1 inmunizados (n = 9, columnas negras), "Controles" significa el grupo control inyectado con NaCl al 0,9 % (n = 10, columnas blancas), "18cyc Cys/Ser" significa animales cardiomiopáticos anti-beta 1-positivos inmunizados tratados con los mutantes Cys/Ser 18 lin lineales indicados (n = 5 [1,0 mg/kg de peso corporal] o mutantes 18cyc Cys/Ser cíclicos (n = 10 [1,0 mg/kg de peso corporal], o mutantes peptídicos Cys/Ser de 25AA cíclicos (n = 4 [1,0 mg/kg de peso corporal] después de 9 meses de inmunización. Los paneles del lado derecho representan los efectos de dosis diferentes de mutantes de ciclopeptido Cys/Ser de 18AA beta1-ECII (n = 4 [0,25 mg/kg de peso corporal]; n = 20 [1,0 mg/kg de peso corporal], n = 5 [2,0 mg/kg de peso corporal] y n = 9 [4,0 mg/kg de peso corporal], respectivamente). Las diferencias entre los grupos se valoraron por ANOVA unidireccional; n.s. = no significativos, * $P < 0,05$, ** $P < 0,005$.

La **Figura 21** muestra dos paneles (a y b) con los parámetros macroanatómicos de los animales del estudio de terapia como columnas:

Paneles superiores (a.) muestran los pesos húmedos relativos de los órganos indicados (desde la izquierda hasta la derecha: corazón, bazo, riñón derecho, riñón izquierdo, pulmón e hígado) dado en g/kg de peso corporal, por los que "no tratados con beta1" significa animales no tratados cardiomiopáticos positivos a anticuerpos inmunizados (n = 9, columnas negras), "Controles" significa el grupo control inyectado con NaCl al 0,9 % (n = 10, columnas blancas), "18cyc Cys/Ser" significa animales cardiomiopáticos anti-beta 1-positivos inmunizados tratados con los mutantes Cys/Ser 18 lin lineales indicados (n = 5 [1,0 mg/kg de peso corporal], columnas rayadas horizontalmente), o mutantes Cys/Ser 18cyc cíclicos (n = 20 [1,0 mg/kg de peso corporal], columnas rayadas a la derecha diagonalmente), o mutantes peptídicos Cys/Ser cíclicos de 25AA (n = 4 [1,0 mg/kg de peso corporal], columnas rayadas verticalmente) después de 9 meses de inmunización.

Paneles inferiores (b.) muestran los pesos húmedos relativos de los órganos indicados (desde la izquierda hasta la derecha: corazón, bazo, riñón derecho, riñón izquierdo, pulmón e hígado) dado en g/kg de peso corporal de animales cardiomiopáticos anti-beta 1 positivos inmunizados tratados con las dosis indicadas de mutantes ciclopeptídicos Cys/Ser de 18AA beta1-ECII (n = 4 [0,25 mg/kg de peso corporal], columnas moteadas en negro rellenas de blanco; n = 20 [1,0 mg/kg de peso corporal] columnas rayadas a la derecha diagonalmente, n = 5 [2,0 mg/kg de peso corporal], columnas rayadas a la izquierda diagonalmente; n = 9 [4,0 mg/kg de peso corporal], columnas estructuradas en negro) después de 9 meses de inmunización, por los que "no tratados con Beta1" significa animales no tratados cardiomiopáticos positivos en anticuerpos anti-beta1 (n = 9, columnas negras) y "Controles" quiere decir el grupo control inyectado con NaCl al 0,9 % (n = 10, columnas blancas). Riñón D significa derecho y Riñón I significa izquierdo. Las diferencias entre los grupos se valoraron por ANOVA unidireccional; n.s. = no significativos, * $P < 0,05$, ** $P < 0,005$.

La **Figura 22** muestra dos paneles (a y b) con parámetros de laboratorio diferentes determinados en el suero de animales después de 10 meses de tratamiento. "no tratados con Beta1 no tratados" y "Controles" en ambos paneles significan animales no tratados cardiomiopáticos positivos en anticuerpos anti-beta1 (n = 5, columnas negras, control positivo) y controles inyectados de NaCl al 0,9 % (n = 6, columnas blancas, control negativo), respectivamente. Paneles superiores (a) muestran los parámetros de animales cardiomiopáticos anti-beta 1-positivos inmunizados terapéuticamente tratados con el Cys/Ser 18lin lineal (n = 5 [1,0 mg/kg de peso corporal], columnas rayadas horizontalmente), o mutantes Cys/Ser 18cyc cíclicos (n = 20 [1,0 mg/kg de peso corporal], columnas rayadas a la derecha diagonalmente), o mutantes peptídicos Cys/Ser de 25AA cíclicos (n = 4 [1,0 mg/kg de peso corporal], columnas rayadas verticalmente) después de 9 meses de inmunización.

Paneles inferiores (b) muestran los parámetros de animales cardiomiopáticos anti-beta 1-positivos inmunizados terapéuticamente tratados con las dosis indicadas de mutantes ciclopeptídicos Cys/Ser de 18AA beta1-ECII (n = 4 [0,25 mg/kg de peso corporal], columnas punteadas de negro rellenas de blanco; n = 20 [1,0 mg/kg de peso corporal] columnas rayadas a la derecha diagonalmente, n = 5 [2,0 mg/kg de peso corporal], columnas rayadas a la izquierda diagonalmente; n = 9 [4,0 mg/kg de peso corporal], columnas estructuradas en negro) después de 9 meses de inmunización; Crea significa creatinina; GOT significa transaminasa glutámico oxalacética; GPT significa piruvato de transaminasa glutámico; LDH significa lactato deshidrogenasa.

La **Figura 23** muestra el patrón de distribución de mutantes ciclopeptídicos Cys/Ser de 18AA marcados con fluorocromo rojo texas ("CP-1") después de inyección i.v. de 1,0 mg/kg de peso corporal (Pc) del ciclopeptido marcado bien en animales control tratados con NaCl al 0,9 % no inmunizados (panel izquierdo) o ratas de Lewis cardiomiopáticas positivas a anticuerpos inmunizadas (550 g de peso corporal). Las fotografías representan la

distribución subcelular de mutantes ciclopeptídicos Cys/Ser de 18AA marcados con fluorocromo rojo texas en el riñón (secciones de 2 μm de la región renal cortical). Las imágenes muestran, que no se ejerció ninguna toxicidad por los péptidos cíclicos de la invención y no se observó obstrucción mecánica de membranas glomerulares.

5 La **Figura 24** es un diagrama que representa el esquema de ciclopeptidos homólogos beta1-ECII que contienen cisteína mutada (los aminoácidos (AA) se representan como bolas blancas con el código de letra de AA correspondiente escrito en cada bola). Las moléculas de cisteína y sus sustitutos se representan como bolas negras. La localización asumida del puente disulfuro está representada por una línea negra gruesa.

10 Lado izquierdo: esquema que representa la secuencia original del bucle de ECII en el receptor beta1 adrenérgico humano; en medio: péptido homólogo a ECII de 22AA cíclico con la mutación de glicina en el sitio de cierre de anillo supuesto (posición 222). El panel derecho representa un ejemplo de un mutante peptídico de 22AA cíclico que contiene solamente dos cisteínas (es decir, posición 209 y 215). Se muestra el mutante Cys/Ser de la cisteína en la posición 216 (péptido beta1-ECII de 22AA cíclico Cys₂₁₆—Ser₂₁₅). Los números dados indican la numeración de los aminoácidos en la secuencia primaria original de acuerdo con Frielle y cols. 1987, PNAS 84, páginas 7920-7924.

15 La **Figura 25** muestra dos paneles que manifiestan los perfiles de elución de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de dos péptidos cíclicos (22+1) = péptidos de 22 AA; el primer panel corresponde a la construcción cyc22AA Cys/Cys (25A) que contiene 3 cisteínas y el segundo al cyc22AA Cys/Ser (25B) mutante que contiene 2 cisteínas de la presente invención, todos ellos ciclopeptidos con un sitio de cierre de Gly. Se llevó a cabo HPLC en un sistema de HPLC analítico de Hewlett Packard Series 1050 (Agilent Technologies Alemania GmbH, Böblingen) equipado con un detector de absorbancia de UV de longitud de onda dual; la absorbancia se leyó a 216 nm. Después de síntesis peptídica y de ciclación, las muestras se disolvieron en H₂O/trifluoro-ácido (TFA) al 0,1 % y se cargaron sobre una columna de HPLC analítica (Waters GmbH, Eschborn) XBridge BEH130, C18, 3,5 μm (longitud de columna 50 mm, lumen 4,6 mm) con un flujo de 2 ml/min; después un gradiente de separación de acetoneitrilo desde el 0 % hasta el 75 % (ACN) en la presencia de TFA al 0,1 % se hizo funcionar durante 5 minutos.

20 Las fracciones que contenían los péptidos Cys/Cys beta1-ECII-22AA cíclicos con tres moléculas de cisteína accesibles libremente presentan el patrón de elución similar a montaña típico que indica la presencia de racematos de cisteína (25A, elución entre 2,6 y 3,8 minutos). En contraste, el péptido de 22AA cíclico mutante que contiene sólo dos cisteínas (conectadas por un segundo puente disulfuro reforzado) dio un pico de elución único agudo que aparece a 2,63 (cyc22AA Cys/Ser, 25B).

25 La **Figura 26** muestra dos paneles representativos que representan la caracterización de los péptidos cíclicos 22AA-ECII por espectrometría de masas (MALDI). El primer panel corresponde a la construcción que contiene 3 cisteínas cyc22AA Cys/Cys (26A) y el segundo al mutante que contiene 2 cisteínas cyc22AA Cys/Ser (26B) de la presente invención, todas ellas ciclopeptidos con un sitio de cierre de Gly. Los paneles muestran trazados de MALDI representativos de los péptidos 22A beta1-ECII cíclicos indicados.

30 La ordenada de cada gráfica muestra intensidades de señal medidas ("u.a.": significa unidades arbitrarias), la abcisa indica la masa molecular (dada en m/z). 26A corresponde al cyc22AA Cys/Cys-péptido (2518,28 m/z) y 26B al cyc22AA Cys/Ser-mutante (2502,31 m/z). El análisis de MALDI se llevó a cabo usando un espectroscopio de masas reflex-II (Bruker Daltonic GmbH, Bremen), equipado con un transportador de muestras Scout-26. En cada caso la molécula protonada de forma sencilla se analizó a 2200 m/z.

35 Las **Figuras 27A y B** representan el bloqueo (= neutralización) *in vitro* de la capacidad de diversas variantes ciclopeptídicas que contienen cisteína del segundo bucle extracelular (ECI) del receptor beta-adrenérgico humano, determinada poniendo a prueba n = 6 sueros individuales (27A) de ratas positivas en anticuerpos de beta1-ECII inmunizadas después de incubación durante toda una noche con los ciclopeptidos indicados (12-14 h, 4 °C) por ELISA. Las columnas en 27A representan la eficiencia bloqueante receptor-anticuerpo de los ciclopeptidos indicados en % de las señales de anticuerpo-(ELISA) obtenidas con sueros de rata positivos en anticuerpos no bloqueados. Las columnas en 27B representan la eficiencia bloqueante promedio para cada ciclopeptido, las barras de error indican \pm SEM.

40 Columnas blancas: mutante cyc18AA Cys/Ser (60,0 \pm 8,3 % de eficiencia bloqueante, P = 0,0014 cuando se probó para significancia contra sueros no bloqueados por prueba t bilateral); columnas rayadas verticalmente: cyc18AA Cys/Cys (66,1 \pm 7,0 % de eficiencia bloqueante, P = 0,00025); columnas negras: cyc22AA Cys/Cys (82,0 \pm 5,0 % de eficiencia bloqueante, P = 0,000046);

45 columnas rayadas (a la derecha) diagonalmente: mutante cyc22AA Cys/Ser (74,9 \pm 5,0 % de eficiencia bloqueante, P = 0,00026); columnas rayadas horizontalmente: cyc25AA Cys/Cys (73,4 \pm 5,0 % de eficiencia bloqueante, P = 0,00011).

50 Las **Figuras 28A y B** representan la capacidad de bloqueo (= neutralización) *in vivo* de mutantes ciclopeptídicos de 18AA o 22AA que contienen dos cisteínas del segundo bucle extracelular (ECII) del receptor beta-adrenérgico humano tras inyección terapéutica de las diferentes construcciones en ratas inmunizadas regularmente a partir de 8 meses (primero = inmunización básica seguida por 7 refuerzos antigénicos cada 4 semanas). Se muestran los efectos de cuatro a cinco inyecciones ciclopeptídicas cada 4 semanas. La Fig. 28A representa los valores promedio

± SEM de cada uno de los grupos tratados de ratas cardiomiopáticas positivas en anticuerpos de beta-ECII inmunizadas (el número de animales por grupo se da en la leyenda). 28A muestra el efecto promedio de 4 inyecciones ciclopeptídicas subsiguientes, determinado 20-22 horas después de la aplicación de las construcciones indicadas. Las valoraciones de anticuerpos de receptor que quedan después de cada inyección en % de las valoraciones de anticuerpos al comienzo de la terapia (mes 8) se representan (columnas). Las barras de error indican ± SEM. Números en las columnas indican el número de inyección mensual (subsiguiente).

Columnas negras: animales positivos en anticuerpos no tratados (valoración de referencia en 8 + 4 (= 12) refuerzos antigénicos totales 8 + 4 (= 12) (comparados con el título al inicio de la terapia) $110,7 \pm 5,6 \%$; n = 5, control positivo).

Columnas blancas: mutante cyc18AA Cys/Ser, n = 5 animales (valoración de anticuerpo que queda después de 4 inyecciones en porcentaje de la valoración al comienzo de la terapia: $76,0 \pm 23,0 \%$, $P = 0,44$ cuando se probó para significancia contra la valoración de anticuerpos de animales positivos en anticuerpos no tratados por prueba f bilateral).

Columnas rayadas (a la derecha) diagonalmente: mutante Cys/Ser cyc22AA, n = 8 animales (valoración de anticuerpo que queda después de 4 inyecciones en porcentaje de la valoración al comienzo de la terapia: $9,0 \pm 2,2 \%$, $P = 3,0 \times 10^{-7}$).

La **Figura 28B** representa el curso temporal de valoraciones de anticuerpos después de 4 inyecciones ciclopeptídicas subsiguientes determinadas *antes de* y 20-22 horas *después de* aplicación de las construcciones indicadas. Los valores se dan en porcentaje del incremento o decremento en las valoraciones de anticuerpos respectivas después de cada inyección ciclopeptídica comparadas con la valoración de anticuerpos determinada al inicio de la terapia (mes 8).

Círculos negros: animales positivos en anticuerpos no tratados (n = 5, control positivo); cuadrados blancos: mutante cyc18AA Cys/Ser, 4 inyecciones, n = 5 animales; diamantes negros: mutante cyc22AA Cys/Ser, 4 inyecciones, n = 8 animales.

La **Figura 29A** es un diagrama que muestra el curso temporal (mes 0 a 12) de los diámetros ventriculares izquierdos al final de la sístole y al final de la diástole internos (LVES, LVED) de animales GST/beta 1-ECII-inmunizados no tratados (círculos negros) frente a animales GST/beta 1-ECII-inmunizados tratados con los diversos ciclopeptidos indicados (véase el punto 7) según se determina por ecocardiografía de modo 2D y de modo M (sistema de ecocardiografía: Visual Sonics, Vevo 770 (versión V2.2.3), equipado con un transductor de 15-17,5 MHz), por lo que LVES/LVED es diámetro al final de la sístole del ventrículo izquierdo/diámetro al final de la diástole del ventrículo izquierdo, círculos blancos, animales control no inmunizados inyectados con NaCl al 0,9 % (n = 5); círculos negros, animales positivos a anticuerpos inmunizados regularmente (cada 4 semanas) no tratados (n = 6); cuadrados blancos, mutante cyc18AA Cys/Ser (1,0 mg/kg de peso corporal, n = 5); diamantes negros, (Gly-)péptido mutante 22AA Cys/Ser (1,0 mg/kg de peso corporal, n = 8).

La **Figura 29B** es un diagrama que representa el curso temporal (mes 0 a 12) del "Índice cardiaco" (CI) en ml/min/g (peso corporal) según se determina por ecocardiografía 2D y por ecocardiografía Doppler (sistema ecocardiográfico véase más arriba), círculos blancos, animales control no inmunizados inyectados con NaCl al 0,9 % no tratados (n = 5), animales positivos en anticuerpos inmunizados regularmente (cada 4 semanas) no tratados (n = 6)

cuadrados blancos, mutantes cyc18AA Cys/Ser (1,0 mg/kg de peso corporal, n = 5);

diamantes negros, (Gly-)péptido cyc22AA Cys/Ser mutante (1,0 mg/kg de peso corporal, n = 8).

La **Figura 30** muestra el patrón de radiactividad acumulada en los órganos indicados 20 minutos después de inyección i.v. bien de animales control tratados con NaCl al 0,9 % no inmunizados (panel izquierdo) o bien ratas de Lewis positivas en anticuerpos inmunizados (350-400 g Pc) con 0,5-1,0 MBq de mutantes de ciclopeptido Cys/Ser 18AA-ECII marcados con yodo 131. Los valores se dan en actividad en % de la radiactividad inyectada inicialmente (ID) por gramo de peso húmero de órgano.

Los ejemplos siguientes, no limitantes ilustran la invención.

Ejemplo 1: síntesis de ciclopeptidos mutantes

Tres ejemplos particulares de los ciclopeptidos descritos en el presente documento que pueden formar sólo un puente disulfuro individual están compuestos de 18, 22 o 25 aminoácidos (AA): (Gln-)ciclopeptido mutante Cys/Ser EC_{II}-18AA, (Gly-)ciclopeptido mutante Cys/Ser EC_{II}-22AA y (Gln-)ciclopeptido mutante Cys/Ser EC_{II}-25AA, respectivamente. La secuencia primaria es parcialmente homóloga a la secuencia humana del B₁-AR (posiciones aminoacídicas 204 a 219, 200 a 220 y 200 a 222, respectivamente). Restringiendo flexibilidad conformacional por ciclación cabeza a cola del péptido lineal seguido por un procedimiento de estabilizar ciclación de puente disulfuro (individual), el mutante ciclopeptídico de 18AA, 22 o 25AA adopta una conformación que mimetiza más cercanamente aquella del epítipo según se presenta en la superficie del bucle proteico de β₁EC_{II}. Además, la

ciclación se ha empleado con frecuencia como una herramienta prolongando la duración de la acción del péptido, ya que en general los péptidos cíclicos son más estables a proteólisis que sus contrapartidas lineales.

5 En detalle, la secuencia peptídica del mutante Cys/Ser, Ciclo(K-18-P) Cíclico S-S, es: Ciclo-Ala-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-Gln; la ciclación puede producirse entre Cys₇ y Cys₁₃ (enlace disulfuro) y Ala₁ y Gln₁₈ (cierre de anillo).

En detalle, la secuencia peptídica del mutante Cys/Ser, Ciclo(K-22-P) Cíclico S-S, es: Ciclo-Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-Thr-Gly; la ciclación puede producirse entre Cys₁₀ y Cys₁₆ (enlace disulfuro) y Arg₁ y Gly₂₂ (cierre de anillo).

10 En detalle, la secuencia peptídica del mutante Cys/Ser, Ciclo(K-25-P) Cíclico S-S, es: Ciclo-Ala-Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-Thr-Asn-Arg-Gln; la ciclación puede producirse entre Cys₁₁ y Cys₁₇ (enlace disulfuro) y Ala₁ y Gln₂₅ (cierre de anillo).

15 Los mutantes ciclopeptídicos de la presente invención se sintetizan primero como péptidos lineales y después se ciclan covalentemente en el armazón por condensación del grupo carboxilo terminal con el grupo amino del aminoácido terminal. Subsiguientemente, se establece un enlace disulfuro entre residuos de cisteína 7 y 13 (ciclopéptido 18mero), residuos de cisteína 10 y 16 (ciclopéptido 22mero) y residuos de cisteína 11 y 17 (ciclopéptido 25mero).

20 El péptido lineal se ensambla por síntesis peptídica en fase sólida por etapas usando una estrategia de Fmoc/terc-butilo. Clorotritilo se usa como una resina de partida. El primer aminoácido (Fmoc-Pro-OH) está acoplándose con DIEA en DMF, el segundo con PyBOP/HOBT/DIEA en DMF y los aminoácidos siguientes con diisopropilcarboimida, HOBT en DMF. La calidad de péptidos se somete a seguimiento en línea por detección UV. El procedimiento de desprotección/acoplamiento (exceso de dos veces) se describe a continuación:

Tabla 1: Procedimiento de desprotección/acoplamiento (exceso de dos veces)

Etapa	Disolventes		Ciclo
1	Acoplamiento/DMF	(*) min	Acoplamiento
2	DMF	3 x 1 min	Lavado
3	25 % de piperidina/DMF	1 min	Desprotección
4	25 % de piperidina/DMF	2 x 15 min	Desprotecciones
5	DMF	7 x 1 min	Lavado

*el tiempo de acoplamiento se determina por prueba de Kaiser

25 Para ensamblaje, se usaron los siguientes aminoácidos (ejemplarmente proporcionados por el mutante de péptido Cys/Ser 18mero):

Tabla 2: aminoácidos usados para la síntesis de F-moc del mutante peptídico Cys/Ser cíclico 18mero

Aminoácido		
Fmoc-ASP (OtBu)-OH	Fmoc-Asn (Trt)-OH	Fmoc-Tyr (tBu)-OH
Fmoc-Cyc (Trt)-OH	Fmoc-Asn (Pbf)-OH	Fmoc-Ala-OH
Fmoc-Glu (OtBu)-OH	Fmoc-D-Glu (OtBu)-OH	Fmoc-Val-OH
Fmoc-Phe-OH	Fmoc-Ser (tBu)-OH	Fmoc-Lys (Boc)-OH

El péptido totalmente protegido con grupos amino N-terminal y carboxilo C-terminal reactivos se escinde de la resina por tratamiento con hexaiso fluoropropanol/diclorometano.

30 La ciclación se lleva a cabo posteriormente en solución de acuerdo con el protocolo siguiente:

35 La ciclación "cabeza-cola" del péptido protegido se lleva a cabo con PyBOP/NaHCO₃ en dilución de DMF alto (10 mmol de péptido lineal/1 l de DMF). La ciclación se completa después de 3 días. Después de evaporación de DMF, el péptido se lava con NaHCO₃ al 5 %, H₂O y H₂O pura. La mezcla de reacción se enfría y el péptido se desprotege exceptuando los grupos de cisteína. Después, el péptido protegido parcialmente está aislado por precipitación con éter metil-t-butílico.

El péptido en bruto se pre-purifica por cromatografía líquida:

Fase estacionaria: C18 de sílice, 15 μ m, 120 A
 Eluyente: H₂O acetonitrilo + TFA al 0,1%
 Detección: UV (210 nm)

- 5 La ciclación disulfuro se lleva a cabo en H₂O (2 mg/ml) con la presencia de sulfóxido de dimetilo (al 3 %). La reacción de ciclación se completa después de 3 días. El péptido se purifica por HPLC, usando las condiciones descritas anteriormente. Las fracciones con una pureza mayor del 95 % se almacenan. El péptido se intercambia sobre una resina de intercambio iónico (Dowex 1X2) y la solución final se liofiliza. El contenido de péptido se determina por análisis aminoacídico (secuenciación de Edman).
- 10 Los perfiles de elución de HPLC en las Fig. 1, 3, 25 y 26 manifiestan claramente los picos de elución agudos y bien definidos obtenidos con ciclopeptidos mutantes que contienen todos el mismo enlace disulfuro en comparación con el perfil de elución relativamente grande (similar a montaña) obtenido con un ciclopeptido Cys₁₃-Cys₁₄ de 18AA que contiene 3 Cys, un ciclopeptido Cys₁₆-Cys₁₇ de 22AA que contiene 3 Cys y un ciclopeptido 3 Cys₁₇-Cys₁₈ de 25AA que contiene 3 Cys.
- 15 Los siguientes estudios *in vitro* e *in vivo* se llevaron a cabo con estos ciclopeptidos mutantes.

Ejemplo 2: ensayo de competición de ELISA *in vitro*

La capacidad de bloqueo de mutantes de ciclopeptido β_1 -EC_{II}-18AA (mutación Cys₁₃-Ser₁₄ o Ser₁₃-Cys₁₄ que tiene un intercambio adicional de D-Glu→ Gln intercambio, por ejemplo, en el sitio de cierre del anillo) se comparó con los ciclopeptidos Cys/Cys de 25AA o de 18AA conteniendo 3 Cys después de preincubación (12 h, 4 °C, incubación rotatoria durante toda una noche) de números diferentes de sueros de ratas positivas en anticuerpos inmunizadas en un ensayo de competición de ELISA usando el péptido Cys/Cys lineal conteniendo 3 Cys como un antígeno. Las Fig. 4, 5, y 7-10 muestran los resultados de las mediciones llevadas a cabo con sueros de n = 12 a n = 82 ratas positivas a anticuerpos inmunizadas usando diferentes ciclopeptidos de la presente invención.

Los resultados obtenidos con las fracciones de IgG aisladas a partir de sueros de 12 ratas positivas a anticuerpos inmunizadas diferentes revelaron que, sorprendentemente, solamente los mutantes ciclopeptídicos Cys/Ser pero no los de Ser/Cys fueron capaces de bloquear significativamente la unión de anticuerpos al β_1 -EC_{II}-antígeno. El efecto bloqueante del ciclopeptido mutante Cys/Ser de 18AA fue comparable a o (en más de la mitad de los sueros analizados n = 8/12) fue incluso más efectivo que la capacidad bloqueante del ciclopeptido Cys/Cys β_1 -EC_{II}-18AA que contiene 3 Cys (Fig. 4). Este hallazgo se confirmó por estudios de valoración de dosis que demuestran un efecto bloqueante dependiente de dosis del mutante ciclopeptídico de Cys/Ser β_1 -EC_{II}-18AA, que a exceso molar de dos a ocho veces (asumiendo una estequiometría 1:1 para ambos péptidos cíclicos (2,1 kDa de masa molecular (MM)) o péptidos lineales (3,0 kDa (MM), considerando un peso molecular de 150 kDa para una molécula IgG) fue consistentemente grandemente superior en bloquear anticuerpos de receptor que bien su contrapartida mutada Ser/Cys o bien un péptido Cys/Cys de 25AA lineal conteniendo 3 Cys (Fig. 5).

La Fig. 7 reanuda el efecto bloqueante de mutantes ciclopeptídicos diferentes después de preincubación con IgG aislado de n = 78 ratas positivas en anticuerpos inmunizadas en un ensayo de competición de ELISA con el Cys/Cys-péptido de 25AA que contenía 3 Cys como un antígeno. La capacidad bloqueante de mutantes Cys/Ser de 18AA fue la más alta (69 \pm 2 %), seguido por Cys/Cys de 25AA (67 \pm 2 %), ciclopeptidos Cys/Cys de 18 AA (60 \pm 4 %) y péptidos de 25AA lineales que contienen 3 Cys (55 \pm 4 %) comparados con los mutantes Ser/Cys de 25AA o de 18AA (6 \pm 2 % o 1 \pm 2 %, respectivamente; P < 5 x 10⁻³⁰ o P < 3,7 x 10⁻³³). Solamente menos del 5 % de los sueros de rata puestos a prueba (n = 4) se bloquearon parcialmente por los mutantes Ser/Cys de EC_{II}-18AA, mientras que la gran mayoría (> 95 %; n = 78) se bloqueó eficientemente por el mutante Cys/Ser de EC_{II}-18AA (Fig. 8).

El efecto bloqueante *in vitro* de mutantes ciclopeptídicos que tienen bien un sitio de cierre de Gln-Ala o bien un sitio de cierre de D-Glu-Ala se analizó por ensayo de competición de ELISA (con el péptido Cys/Cys de 25AA lineal conteniendo 3 Cys como un antígeno) después de preincubación con suero aislado a partir de 69 ratas positivas a anticuerpos inmunizadas diferentes. Los resultados se muestran en la Fig. 9.

Una vez más, hubo dos patrones de reacción de los sueros de rata puestos a prueba (tipo 1/tipo 2). Una fracción principal de los sueros (al 93 %, Fig. 9, panel superior, tipo 1 y Fig. 10), fue muy eficientemente bloqueada por los ciclopeptidos mutantes Cys/Ser de 25AA o de 18AA (69 \pm 2 % o 68 \pm 3 % (cierre de Gln)/69 \pm 2 % (cierre de D-Glu), respectivamente), mientras que los mutantes Ser/Cys de 25AA o de 18AA casi no tienen ningún efecto inhibitor, con independencia del aminoácido en el sitio de cierre (6 \pm 2 %, Ser/Cys 25AA, P < 5 x 10⁻³⁰; 1 \pm 2 %, Ser/Cys de 18 AA con cierre de Gln (P < 3,7 x 10⁻³³) o 1 \pm 2 % con cierre de D-Glu (P < 6 x 10⁻⁵⁵).

Una fracción menor de los sueros (al 7 %, Fig. 9, panel inferior, tipo 2 y Fig. 10) se bloqueó de forma similar por péptidos mutados Cys/Ser o por péptidos mutados Ser/Cys -aunque en un menor grado en términos de capacidad inhibitoria; además, tanto para ciclopeptidos de 25AA como para ciclopeptidos de 18AA los mutantes fueron menos

efectivos que sus contrapartidas Cys/Cys de 25AA o de 18AA que contienen 3 Cys. La capacidad bloqueante de ciclopéptidos mutantes Cys/Ser de 25AA o de 18AA fue $48 \pm 6\%$ o $50 \pm 8\%$ (Gln-cierre)/ $47 \pm 5\%$ (D-Glu-cierre), respectivamente, que fue constantemente inferior a aquella de los ciclopéptidos Cys/Cys de 25AA o de 18AA que contienen 3-Cys correspondientes ($72 \pm 5\%$ o $67 \pm 6\%$, respectivamente); sin embargo, en estos animales los mutantes de 25AA o de 18AA revelaron capacidades bloqueantes que fueron casi comparables a aquellas de mutantes Cys/Ser ($37 \pm 7\%$ de Ser/Cys de 25AA, $P = 0,22$ n.s.; $47 \pm 3\%$ de Ser/Cys de 18AA con cierre de Gln o $33 \pm 5\%$ con cierre de D-Glu, $P = 0,7$ n.s. o $P = 0,08$ n.s., respectivamente).

Subsiguientemente, la capacidad bloqueante dependiente de dosis de diversos péptidos beta1-ECII lineales y cíclicos *in vitro* se analizó usando el mismo ensayo de competición de ELISA (Fig. 11):

Los experimentos que incluyen péptidos Cys/Cys de 25AA lineales, mutantes peptídicos Cys/Ser 25AA cíclicos, péptidos Cys/Cys de 18AA cíclicos, mutantes peptídicos Cys/Ser de 18AA cíclicos y un mutante peptídico Cys/Ser de 18AA lineal revelaron, que todos los sueros de $n = 6$ ratas positivas a anticuerpos inmunizadas elegidas al azar se bloquearon mejor en una manera dependiente de dosis por ciclopéptidos mutantes Cys/Ser de beta1-ECII-18AA, seguidos por ciclopéptidos Cys/Cys de 18AA no mutantes y por el mutante ciclopeptídico Cys/Ser de 18AA. Todos los ciclopéptidos fueron grandemente superiores a sus contrapartidas lineales (con o sin mutación) en términos de capacidad neutralizante de anticuerpos ($P < 0,005$, Fig. 11), proporcionando un decrecimiento dependiente de dosis en anticuerpos anti-Beta1-ECII libres circulantes del 53 % con un exceso de 8 veces, del 66 % con un exceso de 20 veces y aproximadamente del 85 % con un exceso de 80 veces de mutantes ciclopeptídicos Cys/Ser de 18AA. Los resultados correspondientes para péptidos Cys/Cys de 18AA o para péptidos Cys/Ser de 25AA cíclicos fueron: 46/30 % [exceso de 8 veces], 56/49 % [exceso de 20 veces] y 71/83 % a un exceso de 80 veces. Los péptidos lineales fueron claramente menos eficientes, produciendo un decrecimiento dependiente de dosis en valoraciones de anticuerpos de receptor de solamente el 24 % [exceso de 8 veces], el 35 % [exceso de 20 veces] y aproximadamente el 50 % a un exceso de 80 veces para ambos, péptidos Cys/Cys de 25AA lineales y Cys/Ser de 18AA lineales.

Adicionalmente, la capacidad de bloqueo (= neutralización) *in vitro* de diversas variantes ciclopeptídicas del segundo bucle extracelular (ECII) del receptor beta1-adrenérgico humano se puso a prueba con sueros de ratas positivas a anticuerpos de beta1-ECII inmunizados de incubación durante 12-14 horas a 4 °C. La eficiencia bloqueante *in vitro* del ciclopéptido cyc22A Cys/Cys de 22AA ($82,0 \pm 5,0\%$ de eficiencia bloqueante frente a sueros no bloqueados, $P = 0,000046$) y de mutantes ciclopeptídicos cyc22AA Cys/Ser de 22AA ($74,9 \pm 5,0\%$ de eficiencia bloqueante, $P = 0,00026$) fue incluso superior que la capacidad bloqueante de los ciclopéptidos que contienen 3 Cys descritos anteriormente, es decir, cyc25AA Cys/Cys ($73,4 \pm 5,0\%$ de eficiencia bloqueante, $P = 0,00011$) o cyc18AA Cys/Cys ($66,1 \pm 7,0\%$ de eficiencia bloqueante frente a los sueros no bloqueados, $P = 0,00025$; véanse las Fig. 27A/B).

Ejemplo 3: ensayo de FRET funcional *in vitro*

La capacidad bloqueante de mutantes ciclopeptídicos de 25AA o 18AA de β_1 -ECII (que tienen o no un D-Glu/Gln en el sitio de cierre de anillo) en señalización mediada por receptor de β_1 (ensayo de AMPc funcional) se ensayó usando un enfoque por transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET) (Fig. 6).

El efecto de la preincubación (12 h, 4 °C, incubador rotatorio) de anticuerpos IgG anti- β_1 -ECII de una rata representativa con mutantes ciclopeptídicos de β_1 -ECII-18AA (mutaciones Cys/Ser o Ser/Cys, respectivamente) se comparó con el efecto inhibitor de un ciclopéptido Cys/Cys de 25AA conteniendo Cys/Cys o con el efecto de anticuerpos de IgG anti- β_1 -ECII no incubados con péptidos bloqueantes. La proporción de YFP/CFP normalizada de señales de emisión de FRET registradas sirvió para cuantificar el efecto de los mutantes ciclopeptídicos de la presente invención en términos de bloqueo (en porcentaje) de producción de AMPc celular inducida por anticuerpos de células renales embrionarias humanas que expresan β_1 -ECII establemente transfectadas con Epac1 de forma transitoria. El eje x en Fig. 6 corresponde al tiempo de registro dado en segundos (s).

El efecto inhibitor de mutantes ciclopeptídicos de β_1 -ECII-18AA en la estimulación inducida por anticuerpos de señalización transmembrana de β -adrenérgicos se analizó usando un enfoque por transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET). De nuevo, también en términos de inhibir efectos de anticuerpos funcional medibles (bloqueando incrementos de AMPc intracelulares) el mutante Cys/Ser ciclopeptídico de β_1 -ECII-18AA cíclico fue grandemente superior a su contrapartida Ser/Cys, e incluso ligeramente más eficaz que un ciclopéptido Cys/Cys de 25AA que contiene 3 Cys (Fig. 6).

Tomados conjuntamente, los resultados de los ensayos llevados a cabo en el presente documento demuestran que la capacidad bloqueante de anticuerpos de ciclopéptidos mutados no se afectó por la reducción del número de los aminoácidos desde un péptido 25-mérico hasta un péptido 18-mérico. Los resultados también demostraron una comparabilidad de Cys/Cys de 25AA y Cys/Cys de 18AA con los mutantes Cys/Ser de 25AA o de 18AA, pero no con los mutantes Ser/Cys de 25AA o de 18AA cíclicos. Sorprendentemente, la naturaleza exacta del intercambio de un residuo de cisteína individual con un residuo de serina determina marcadamente la potencia de neutralización de los péptidos mutados: el intercambio Cys→Ser en la posición 18 (ciclopéptido de 25-AA) o en la posición 14 (ciclopéptido de 18-AA), respectivamente, proporcionó péptidos cíclicos con excelentes efectos neutralizantes de anticuerpos y efectos farmacológicos *in vitro* (Fig. 6-10), mientras que los mutantes Cys₁₇→Ser₁₇ o Cys₁₃→Ser₁₃

(péptido de 25-AA o de 18-AA, respectivamente) no tenía casi ningún efecto inhibitorio, ni con respecto a sus propiedades como aceptor de anticuerpos ni en términos de su capacidad de inhibir efectos de anticuerpos funcionales (neutralización de receptor-estimulación *in vitro*; Fig. 6-10 y ejemplo 3). El intercambio D-Glu/Gln en la posición 25 (mutantes ciclopeptídicos de 25AA) o 18 (mutantes ciclopeptídicos de 18AA) no influirían significativamente en la capacidad de bloqueo de los ciclopeptidos, independientemente de su longitud (es decir, 25 frente a 18 aminoácidos; Fig. 7-10).

Ejemplo 4: modelo animal, bloqueo "in vivo" de los anticuerpos de receptor

El modelo animal usado en este ejemplo y en cualquier otro ejemplo descrito en el presente documento, si no se indica lo contrario es el modelo de rata análogo al humano. Antes de evaluar y realizar pruebas, respectivamente, este modelo de rata análogo al humano se trató como se describe más adelante en el presente documento usando los diversos compuestos de la presente invención, más particularmente los compuestos de fórmula VI, VII, VIII y IX y como controles, un (Gln₁₈)-péptido mutado Cys/Ser EC_{II}-18AA lineal (con la siguiente secuencia de aminoácidos: Ala-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-Gln) y un péptido (Gln₂₅) Cys/Cys EC_{II}-25AA que contiene 3 Cys no mutado lineal (con la siguiente secuencia de aminoácidos: Ala-Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Cys-Asp-Phe-Val-Thr-Asn-Arg-Gln).

Los efectos bloqueantes *in vivo* tanto de ciclopeptidos mutantes Cys/Ser de 25AA como de ciclopeptidos mutantes Cys/Ser de 18AA (con un sitio de cierre de Gln), el ciclopeptido mutante Ser/Cys de 18AA y un péptido Cys/Ser de 18AA lineal mutado se analizaron después de inyección intravenosa (i.v.) de 1,0 mg/kg de peso corporal (peso corporal) de cada construcción en ratas positivas a anticuerpos recién inmunizadas (es decir, uso de ciclo-péptidos en una clase de estudio de "prevención"), con una primera aplicación ciclopeptídica 3 meses después de la inmunización inicial (y dos refuerzos subsiguientes en los meses 2 y 3). En total, cinco aplicaciones profilácticas de las construcciones diversas se dieron a intervalos de 4 semanas, siempre dos semanas después de refuerzo de antígeno continuado mensualmente. Los sueros se extrajeron 18-20 horas después de la inyección i.v. y se ensayaron para reactividad por ELISA usando el péptido Cys/Cys de 25AA lineal conteniendo 3 Cys como un antígeno (Fig. 12).

Estas primeras aplicaciones ciclopeptídicas (profilácticas) *in vivo* demostraron, que la eficiencia más alta en términos de neutralización de anticuerpos se logró con peso corporal (Pc) de 1,0 mg/kg de ciclopeptidos Cys/Cys de 25AA o Cys/Cys-ciclopeptidos de 18AA no mutantes (decrecimiento del $87,7 \pm 2 \%$ o del $89,9 \pm 3 \%$ después de 5 inyecciones ciclopeptídicas, comparadas con animales inmunizados no tratados; ambos $P < 0,005$), seguidos por el ciclopeptido mutante Cys/Ser de 18 AA (decrecimiento del $54,5 \pm 2 \%$ después de 5 inyecciones ciclopeptídica; $P < 0,05$), mientras que péptidos Cys/Cys de 25AA o mutantes Cys/Ser de 18AA a una misma concentración no tuvieron efectos bloqueantes significativos (disminución de valoración de anticuerpo de $25,8 \pm 3 \%$ o $4,5 \pm 11 \%$ después de 5 inyecciones, $P = 0,16$ o $P = 0,8$; Fig. 12).

Este hallazgo se confirmó por análisis de ELISpot de la médula ósea y preparaciones de células de bazo de ratas tratadas con ciclopeptido seleccionadas frente a ratas inmunizadas no tratadas ($n = 3$). La Fig. 13 muestra una disminución significativa en el número de células secretoras de anticuerpos anti-beta1-ECII (ASC), tanto en el bazo como -en una menor extensión- en la médula ósea sólo en ratas tratadas con ciclopeptido Cys/Cys de 25AA o con mutantes ciclopeptídicos de 18AA Cys/Ser ($n = 3$ o 4, respectivamente), mientras que el mutante peptídico Cys/Ser de 18AA lineal ($n = 3$) no tuvo ningún efecto en ASC (ni bazo ni médula ósea).

Además, los efectos bloqueantes *in vivo* de mutantes ciclopeptídicos Cys/Ser de 25AA y 18AA terapéuticamente usados, el (Gln)-ciclopeptido mutante Ser/Cys de 18AA y un péptido Cys/Ser de 18AA lineal mutado se evaluaron después de una primera dosis intravenosa (i.v.) (es decir, 1,0 mg/kg de peso corporal (Pc)) de cada construcción inyectada dentro de ratas positivas a anticuerpos anti-beta1-ECII inmunizadas a largo plazo, presentando todavía un fenotipo cardiomiopático (después de nueve meses de inmunización mensual 1x con el antígeno beta1-ECII/GST; Fig. 14-16 y 17). Los sueros se extrajeron 18-20 horas después de la inyección i.v. de las diversas construcciones y se ensayaron por ELISA usando el péptido Cys/Cys de 25AA lineal conteniendo 3 Cys como un antígeno. La aplicación "terapéutica" de diversos ciclopeptidos en ratas positivas a anticuerpos cardiomiopáticas revelaron una capacidad bloqueante *in vivo* superior de mutantes ciclopeptídicos de Cys/Ser de 18AA (1 mg/kg de peso corporal) en comparación bien mutantes ciclopeptídicos Cys/Ser de 25AA o bien con mutantes ciclopeptídicos Cys/Ser de 18A claramente menos eficientes a la misma concentración (Fig. 14 y 15). De nuevo, la eficiencia *in vivo* del mutante ciclopeptídico Cys/Ser de 18AA fue grandemente superior a aquella del mutante peptídico lineal de 18AA Cys/Ser. Sin embargo, cuando decrece la dosis aplicada de mutantes 18AA Cys/Ser a 0,25 mg/kg de peso corporal (Pc), no se logró decrecimiento relevante en anticuerpos de receptor, sugiriendo una relación dosis-y-efecto para mutantes ciclopeptídicos.

Inyecciones terapéuticas repetidas de ciclopeptidos S-S individuales mutantes cada 4 semanas en ratas inmunizadas con miocardiopatía inmune inducida por anticuerpos confirmó una clase de relación "dosis mínima crítica"-y-efecto para mutantes ciclopeptídicos S-S: una dosis de 0,25 mg/kg de peso corporal del ciclopeptido Cys/Ser de 18 AA -aunque capaz de aceptar anticuerpos de receptor en algún grado- fue claramente menos eficiente en términos tanto de (1) el decrecimiento logrado en anticuerpos de receptor circulantes (incluso cuando es solamente respecto a "respondedores" sensibles a ciclopeptidos, definidos como animales que tienen, después de 7

inyecciones ciclopeptídicas, un nivel de anticuerpos que quedan máximo igual o inferior al 80 % de la valoración al comienzo de la terapia (Fig. 16b y c), como de (2) en el efecto cardioprotector logrado (Fig. 17b, 19B, 20, y 21b) comparado bien con una dosis de 1,0 o bien con una dosis de 2,0 mg/kg de peso corporal de ciclopeptido Cys/Ser de 18AA. La últimas dosis fueron casi igualmente eficientes en términos tanto de neutralización de anticuerpos receptores circulantes (Fig. 16b y c) como de reversión de características cardiomiopáticas inducidas por anticuerpos (Fig. 17b, 19b, 20 y 21b). Un incremento adicional en la dosis aplicada a 4,0 mg/kg de peso corporal, sin embargo, no resultaría en eficiencia más alta -ni en relación a capacidad aceptora de anticuerpos (Fig. 16b y c), ni tampoco respecto a efectos cardioprotectores (Fig. 17b, 19b, 20 y 21b)-.

Después de la inyección de los péptidos no se observaron efectos secundarios locales o sistémicos graves. Además, después de la inyección de los diversos ciclopeptidos mutantes, tanto la frecuencia cardiaca como la presión sanguínea de los animales no se afectó (Fig. 20a). Además, no tuvieron lugar cambios obvios en parámetros de laboratorio de rutina asociados con la aplicación de los mutantes ciclopeptídicos (Fig. 22a y b).

Con el fin de generar anticuerpos de anti- β_1 -receptor los animales se inmunizaron con una proteína de fusión que contenía glutation-S-transferasa bacteriana y la secuencia del segundo bucle extracelular del receptor β_1 -adrenérgico humano (GST/ β_1 -ECII). Antes del tratamiento de los animales con ciclopeptidos mutados de acuerdo con la presente invención, se observa miocardiopatía inmune dilatada progresiva después de 6 a 8 meses de regular inmunización cada cuatro semanas (Fig. 17). Todos los animales inmunizados desarrollaron títulos elevados de anticuerpos anti- β_1 -ECII estimuladores. La valoración específica de anti- β_1 -ECII alcanzó un máximo entre 6 y 8 meses de reforzar continuamente a los animales cada 4 semanas, mientras que los animales control inyectados con NaCl no desarrollaron ningún anticuerpo específico de receptor (Fig. 18).

Tales animales inmunizados se usaron para la aplicación de ciclopeptidos mutantes de acuerdo con la presente invención. El efecto bloqueante *in vivo* tanto de ciclopeptidos mutantes tanto de 25AA como de 18AA (con un sitio de cierre de Gln) se determinó después de una primera inyección intravenosa de 1,0 mg/kg de peso corporal (Pc) (para ciclopeptidos Cys/Ser de 18AA también 0,25 mg/kg de peso corporal) en ratas positivas a anticuerpos inmunizadas. Los sueros se extrajeron 18-20 horas después de la inyección *i.v.* de los diferentes péptidos y se ensayaron por ELISA usando el péptido Cys/Cys de 25AA lineal conteniendo 3 Cys como un antígeno.

Como se ha mencionado, los efectos bloqueantes *in vivo* tanto de ciclopeptidos mutados Cys/Ser de 25AA como de ciclopeptidos mutados Cys/Ser de 18AA (con un sitio de cierre de Gln), el (Gln-)ciclopeptido mutante Ser/Cys de 18AA y un péptido Cys/Ser de 18AA lineal mutado se analizaron después de una primera inyección intravenosa (*i.v.*) de cada construcción en ratas positivas en anticuerpos inmunizadas. Los sueros se extrajeron 18-20 horas después de la inyección *i.v.* y se ensayaron para reactividad por ELISA usando el péptido Cys/Cys de 25AA lineal conteniendo 3 Cys como un antígeno.

Los datos *in vivo* confirmaron una capacidad de bloqueo más alta de los ciclopeptidos mutados Cys/Ser de 18AA (1 mg/kg de peso corporal) comparados con mutantes Cys/Ser de 25 AA claramente menos efectivos a una misma concentración (Fig. 14 y 15). La eficiencia *in vivo* del mutante ciclopeptídico Cys/Ser de 18AA fue también grandemente superior a aquella del mutante péptido lineal de 18AA Cys/Ser.

Después de la inyección de los péptidos no se observaron efectos secundarios locales o sistémicos graves. Además, después de la inyección de los diversos ciclopeptidos mutantes, tanto la frecuencia cardiaca como la presión sanguínea de los animales no se vieron afectadas.

Sin embargo, los datos *in vivo* indican también, que la eficiencia del (Gln-)ciclopeptido mutado Cys/Ser de 18AA parece depender también de la dosis aplicada; una inyección de 0,25 mg/kg de peso corporal fue menos eficiente en términos de neutralización de anticuerpos que la misma construcción dada a una concentración de 1 mg/kg de peso corporal (Fig. 14 y 15).

Los hallazgos *in vitro* descritos en ejemplos 2 y 3 generalmente se confirmaron *in vivo* (por ejemplo, Fig. 14-16). De forma interesante, la diferencia en la eficiencia de bloqueo de los ciclopeptidos mutados Cys/Ser comparada con aquella de los péptidos lineales fue incluso más pronunciada *in vivo* (Fig. 5, 7 y 14-16).

Sin embargo, los datos *in vivo* indican también, que la eficiencia del ciclopeptido mutado Cys/Ser de 18AA puede depender igualmente de la dosis aplicada (Fig. 14-16). Los resultados obtenidos son compatibles con una relación dosis-y-efecto (mínima) para mutantes ciclopeptídicos S-S individuales: una dosis de 0,25 mg/kg del mutante ciclopeptídico Cys/Ser de 18AA fue grandemente menos eficiente en términos tanto del decrecimiento logrado en anticuerpos de receptor circulantes como en el efecto cardioprotector comparado bien con una dosis de 1,0 o bien con una dosis de 2,0 mg/kg por peso corporal (Pc) (Fig. 14-16). Estas dosis fueron casi igualmente eficientes en términos tanto de neutralización de anticuerpos de receptor circulantes como de reversión de características cardiomiopáticas inducidas por anticuerpos (Fig. 16-20). Un incremento adicional en la dosis aplicada hasta 4,0 mg/kg de peso corporal, sin embargo, no dio lugar a una eficiencia más alta -ni respecto a acepción de anticuerpos (Fig. 16) ni respecto a efectos cardioprotectores *in vivo* (Fig. 17-21).

Una dosis alta (= 4.0 mg/kg de peso corporal) de mutantes Cys/Ser cyc18AA no incrementó la eficiencia; en cambio, condujo a un incremento transitorio en valoraciones de anticuerpos, permitiendo reducciones significativas en

valoraciones de recepción de anticuerpos solamente después de la tercera o cuarta inyección de ciclopéptidos. Más notablemente, el efecto sobre la capacidad neutralizadora de anticuerpos de las diferentes concentraciones inyectadas de ciclopéptidos mutantes Cys/Ser cyc18AA se confirmó también en términos de características cardiomiopáticas inducidas por anticuerpos inversas en el curso del estudio con la mejor cardioprotección lograda por 1,0 o 2,0 mg/kg de peso corporal de mutantes ciclopeptídicos de Cys/Ser (Fig. 17B, 19B, 20, 21B).

Según se menciona, tanto 1,0 mg/kg de peso corporal de Cys/Ser 25AA-mérico así como dosis alta (= 4,0 mg/kg de peso corporal) de mutantes Cys/Ser condujeron a un incremento transitorio en valoraciones de anticuerpos, compatible con una reacción inmune inicial, permitiendo reducciones significativas en valoraciones de receptor-anticuerpo solamente después de la tercera o cuarta inyección de anticuerpos (tercer o cuarto mes de terapia; véanse las Fig. 16a y b). Este fenómeno no ocurrió bien con dosis de 1,0 o bien con dosis de 2,0 mg/kg de peso corporal de mutantes ciclopeptídicos Cys/Ser de 18AA, dando como resultado decrecimientos absolutos más altos en valoraciones de anticuerpos después de 9 meses de tratamiento (1,0 mg/kg $-59 \pm 14\%$ o 2,0 mg/kg: $-59 \pm 12\%$, respectivamente, $P < 0,0005$ frente a animales no tratados inmunizados) comparados a solamente $-37 \pm 13\%$ (1,0 mg/kg de Cys/Ser-CP de 25AA; $P = 0,36$ han sido inmunizados frente a los animales inmunizados no tratados) o $-39 \pm 14\%$ (4,0 mg/kg de Cys/Ser-CP de 18AA, $P = 0,24$ frente a animales no inmunizados) de las valoraciones de anticuerpos respectivas al inicio del tratamiento. Una dosis de péptidos cyc18AA Cys/Ser de 1,0 o 2,0 mg/kg de peso corporal fue así casi igualmente eficiente en términos de neutralizar anticuerpos de receptor circulantes (Fig. 16b y c) y en el transcurso del estudio también en términos de inversión de características cardiomiopáticas inducidas por anticuerpos (Fig. 17b, 19b, 20 y 21b).

Además, los experimentos *in vivo* demostraron que la capacidad bloqueante de anticuerpos de ciclopéptidos mutantes no está aparentemente afectada por una reducción del número de los aminoácidos de un ciclopéptido 25-mérico a un ciclopéptido 18-mérico; tanto datos *in vitro* como datos *in vivo* demuestran una excelente comparabilidad de los dos mutantes ciclopeptídicos Cys/Ser de 25AA o Cys/Ser de 18AA de enlace disulfuro individual que contienen dos cisteínas. Debería destacarse, sin embargo, que tanto 1,0 mg/kg de mutantes Cys/Ser 25AA-méricos como dosis alta (es decir, 4,0 mg/kg de peso corporal) de mutantes Cys/Ser 18AA-méricos condujeron a un incremento transitorio inicial en valoraciones de anticuerpos (Fig. 16a y b) y así pospusieron una reducción significativa en valoraciones de receptor de anticuerpos a la tercera o cuarta aplicación ciclopeptídica (tercer o cuarto mes de terapia). Este fenómeno no ocurrió bien con dosis de 1,0 o bien con dosis de 2,0 mg/kg de peso corporal de mutantes ciclopeptídicos Cys/Ser de 18AA.

La capacidad de bloqueo (= neutralización) *in vivo* de los mutantes cyc22AA Cys/Ser del segundo bucle extracelular (ECII) del receptor beta1-adrenérgico humano también se puso a prueba por inyección "terapéutica" en ratas que se habían inmunizado regularmente a lo largo de 8 meses (inmunización básica y siete refuerzos de antígeno posteriores cada 4 semanas, véanse Fig. 28A/B) y se comparó con los efectos del mutante cyc18AA Cys/Ser descrito.

Después de cuatro a cinco inyecciones ciclopeptídicas regulares cada 4 semanas, las valoraciones en animales positivos en anticuerpos no tratados se incrementaron al $110,7 \pm 5,6\%$ de los valores al inicio del tratamiento ($n = 5$, controles positivos; valoración de referencia en $8 + 4 (= 12)$ aplicaciones totales de antígenos comparadas con las valoraciones de anticuerpos en el mes 8). En contraste, 4 inyecciones de mutantes cyc22AA Cys/Ser ($n = 8$ animales) disminuyeron las valoraciones de anticuerpos al $9,0 \pm 2,2\%$ de las valoraciones de anticuerpos al inicio de la terapia ($P = 3,0 \times 10^{-7}$, cuando se pusieron a prueba en su significancia contra las valoraciones de anticuerpos de animales positivos a anticuerpos no tratados por prueba *f* bilateral). La eficiencia *in vivo* de los mutantes cyc22AA está así potenciada adicionalmente comparada con el mutante ciclopeptídico Cys/Ser descrito que tiene una longitud de 18 aminoácidos (cyc18AA Cys/Ser; $n = 5$ animales), que después de 4 inyecciones disminuyeron la valoración de anticuerpos al $76,0 \pm 23,0\%$ de los títulos al inicio de la terapia ($P = 0,44$ frente a animales positivos a anticuerpos no tratados, n.s.; véase la Fig. 28A).

Además, los datos de seguimiento ecocardiográficos después de 4 meses de tratamiento también muestran una superioridad de mutantes cyc22AA comparados con el mutante cyc18AA Cys/Ser con respecto a sus efectos cardioprotectores *in vivo*, como se valoró por el decrecimiento tanto en diámetros diastólicos finales del ventrículo izquierdo (LVED) como en diámetros sistólicos finales del ventrículo izquierdo (LVES) (Fig. 29A) y un aumento de "Índice cardíaco" (CI, dado en ml/min/g de peso corporal; véase la Fig. 29B), como se determina por ecocardiografía bidimensional y por ecocardiografía de Doppler usando un sistema ecocardiográfico Visual Sonics (Vevo 770, versión V2.2.3), equipado con un transductor de 17,5 MHz).

Tomando conjuntamente, debido a que la actividad cardioprotectora y la actividad inmunomoduladora de los péptidos cíclicos ECII-homólogos parecen depender grandemente de su conformación, un puente disulfuro localizado intramolecularmente es esencial estabilizando y manteniendo la estructura tridimensional de la construcción. En el péptido cíclico de 21+1 (= 22) AA las cisteínas que quedan (es decir, en la posición 209 y 215, en el caso de 216 se ha mutado a Ser) mantienen una distancia intramolecular definida, reforzada adicionalmente por introducción del aminoácido más pequeño que se da en la naturaleza glicina en el sitio de cierre de anillo (previsto), con el fin de permitir la formación de un puente disulfuro intramolecular que defina estructura.

La presente invención se refiere a las siguientes secuencias nucleotídicas y aminoácidas: SEQ ID NO: 1

ES 2 391 358 T3

Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β_1 -AR humano (18AA; Cys₁₄→Ser₁₄); la ciclación puede tener lugar entre Ala₁ y Gln₁₈

Ala-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-Gln

SEQ ID NO: 2:

- 5 Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β_1 -AR humano (18AA; Cys₁₈→Ser₁₈); la ciclación puede tener lugar entre Ala₁ y Gln₂₅

Ala-Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-Thr-Asn-Arg-Gln

SEQ ID NO: 3:

- 10 Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β_1 -AR humano (18AA; Cys₁₄→Ser₁₄; Gln₁₈→DGLu₁₈); la ciclación puede tener lugar entre Ala₁ y DGLu₁₈

Ala-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-DGLu

SEQ ID NO: 4:

Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β_1 -AR humano (25AA; Cys₁₈→Ser₁₈; Gln₂₅→DGLu₂₅); la ciclación puede tener lugar entre Ala₁ y DGLu₂₅

- 15 Ala-Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-Thr-Asn-Arg-DGLu

SEQ ID NO: 5:

Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β_1 -AR humano (18AA; Cys₁₃→Ser₁₃); la ciclación puede tener lugar entre Ala₁ y Gln₁₈ Ala-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Ser-Cys-Asp-Phe-Val-Gln

SEQ ID NO: 6:

- 20 Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β_1 -AR humano (25AA; Cys₁₇→Ser₁₇); la ciclación puede tener lugar entre Ala₁ y Gln₂₅

Ala-Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Ser-Cys-Asp-Phe-Val-Thr-Asn-Arg-Gln

SEQ ID NO: 7:

- 25 Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β_1 -AR humano (18AA; Cys₁₃→Ser₁₃; Gln₁₈→DGLu₁₈); la ciclación puede tener lugar entre Ala₁ y DGLu₁₈

Ala-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Ser-Cys-Asp-Phe-Val-DGLu

SEQ ID NO: 8:

Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β_1 -AR humano (25AA; Cys₁₇→Ser₁₇; Gln₂₅→DGLu₂₅); la ciclación puede tener lugar entre Ala₁ y DGLu₂₅

- 30 Ala-Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Ser-Cys-Asp-Phe-Val-Thr-Asn-Arg-DGLu

SEQ ID NO: 9:

Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β_1 -AR humano (18AA; Cys₁₄→Ser₁₄)

gngacgaggcgccgctgctacaacgacccaagtgc**SER**gacttcgtccar

- 35 SEQ ID NO: 10:

Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β_1 -AR humano (25AA; Cys₁₈→Ser₁₈)

gncggggcgagagcgacgaggcgccgctgctacaacgacccaagtgc**SER**gacttcgtcaccacccggcar

SEQ ID NO: 11:

- 40 Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β_1 -AR humano (18AA; Cys₁₄→Ser₁₄; Gln₁₈→DGLu₁₈)

gcngacgagggcgccgctgctacaacgaccccaagtgcSERgacttcgtcgar

SEQ ID NO: 12:

Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β₁-AR humano (25AA; Cys₁₄→Ser₁₄; Gln₂₅→DGlu₂₅)

5 gcncgggcgagagcgacgagggcgccgctgctacaacgaccccaagtgcSERgacttcgtcaccaaccgggar

SEQ ID NO: 13:

Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β₁-AR humano (18AA; Cys₁₃→Ser₁₃)

gcngacgagggcgccgctgctacaacgaccccaagSERTgctgacttcgtccar

10 SEQ ID NO: 14:

Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β₁-AR humano (25AA; Cys₁₇→Ser₁₇)

gcncgggcgagagcgacgagggcgccgctgctacaacgaccccaagSERTgctgacttcgtcaccaaccgggar

SEQ ID NO: 15:

15 Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β₁-AR humano (18AA; Cys₁₃→Ser₁₃; Gln₁₈→DGlu₁₈)

gcngacgagggcgccgctgctacaacgaccccaagSERTgctgacttcgtcgar

SEQ ID NO: 16:

20 Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β₁-AR humano (25AA; Cys₁₇→Ser₁₇; Gln₂₅→DGlu₂₅)

gcncgggcgagagcgacgagggcgccgctgctacaacgaccccaagSERTgctgacttcgtcaccaaccgggar

SEQ ID NO: 17:

Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β₁-AR humano (18AA; Cys₃→Ser₃); la ciclación puede tener lugar entre Lys₁ y Pro₁₈

25 Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-Gln-Ala-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro

SEQ ID NO: 18:

Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β₁-AR humano (25AA; Cys₃→Ser₃); la ciclación puede tener lugar entre Lys₁ y Pro₂₅

Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-Thr-Asn-Arg-Gln-Ala-Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn- Asp-Pro

30 SEQ ID NO: 19:

Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β₁-AR humano (18AA; Cys₃→Ser₃; Gln₇→DGlu₇); la ciclación puede tener lugar entre Lys₁ y Pro₁₈

Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-DGlu-Ala-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro

SEQ ID NO: 20:

35 Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β₁-AR humano (25AA; Cys₃→Ser₃; Gln₁₀→DGlu₁₀); la ciclación puede tener lugar entre Lys₁ y Pro₂₅

Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-Thr-Asn-Arg-DGlu-Ala-Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn- Asp-Pro

SEQ ID NO: 21:

40 Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β₁-AR humano (18AA; Cys₂→Ser₂); la ciclación puede tener lugar entre Lys₁ y Pro₂₅

Lys-Ser-Cys-Asp-Phe-Val-Gln-Ala-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro

SEQ ID NO: 22:

Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β₁-AR humano (25AA; Cys₂→Ser₂); la ciclación puede tener lugar entre Lys₁ y Pro₂₅

Lys-Ser-Cys-Asp-Phe-Val-Thr-Asn-Arg-Gln-Ala-Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn- Asp-Pro

5 SEQ ID NO: 23:

Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β₁-AR humano (18AA; Cys₂→Ser₂; Gln₇→DGLu₇); la ciclación puede tener lugar entre Lys₁ y Pro₁₈

Lys-Ser-Cys-Asp-Phe-Val-DGLu-Ala-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro

SEQ ID NO: 24:

10 Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β₁-AR humano (25AA; Cys₂→Ser₂; Gln₁₀→DGLu₁₀); la ciclación puede tener lugar entre Lys₁ y Pro₂₅

Lys-Ser-Cys-Asp-Phe-Val-Thr-Asn-Arg-DGLu-Ala-Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn- Asp-Pro

SEQ ID NO: 25:

15 Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β₁-AR humano (18AA; Cys₃→Ser₃)

aagtgc**SER**gactctgtc**cargc**ngacgaggcgccgctgctacaacgacccc

SEQ ID NO: 26:

Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β₁-AR humano (25AA; Cys₃→Ser₃)

20 aagtgc**SER**gactctgtcaccaaccggc**cargcnc**ggggcggagagcgacgaggcgccgctgctacaacgacccc

SEQ ID NO: 27:

Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β₁-AR humano (18AA; Cys₃→Ser₃; Gln₇→DGLu₇)

aagtgc**SER**gactctgtc**gargc**ngacgaggcgccgctgctacaacgacccc

25 SEQ ID NO: 28:

Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β₁-AR humano (25AA; Cys₃→Ser₃; Gln₁₀→DGLu₁₀)

aagtgc**SER**gactctgtcaccaaccgg**gargcnc**ggggcggagagcgacgaggcgccgctgctacaacgacccc

SEQ ID NO: 29:

30 Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β₁-AR humano (18AA; Cys₂→Ser₂)

aag**SER**tg**cg**actctgtc**cargc**ngacgaggcgccgctgctacaacgacccc

SEQ ID NO: 30:

35 Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β₁-AR humano (25AA; Cys₂→Ser₂)

aag**SER**tg**cg**actctgtcaccaaccgg**cargcnc**ggggcggagagcgacgaggcgccgctgctacaacgacccc

SEQ ID NO: 31:

Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β₁-AR humano (18AA; Cys₂→Ser₂; Gln₇→DGLu₇)

40 aag**SER**tg**cg**actctgtc**gargc**ngacgaggcgccgctgctacaacgacccc

SEQ ID NO: 32:

ES 2 391 358 T3

Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β_1 -AR humano (25AA; Cys₂→Ser₂; Gln₁₀→DGLu₁₀)

aag**SERtgcg**acttcgtcaccaaccgg**gargcnc**ggggcggagagcgacgagggcgccgctgctacaacgacccc

SEQ ID NO: 33:

- 5 Secuencia aminoacídica de un epítipo de EC_{II} que lleva parte del β_1 -AR humano (16AA; posiciones de AA 204 a 219)

DEARRCYNDPKCCDFV

SEQ ID NO: 34:

- 10 Secuencia aminoacídica de un epítipo de EC_{II} que lleva parte del β_1 -AR humano (23AA; posiciones de AA 200 a 222)

RAESDEARRCYNDPKCCDFVTNR

SEQ ID NO: 35:

Secuencia aminoacídica de un epítipo de EC_{II} de β_1 -AR humano

DEARR

- 15 SEQ ID NO: 36:

Secuencia aminoacídica de un epítipo de EC_{II} (que lleva parte) de β_1 -AR humano

RAESDEARR

SEQ ID NO: 37:

Secuencia aminoacídica de un epítipo de EC_{II} de β_1 -AR humano

- 20 DFV

SEQ ID NO: 38:

Secuencia aminoacídica de un epítipo de EC_{II} de β_1 -AR humano

DFVTNR

SEQ ID NO: 39:

- 25 Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β_1 -AR humano (16AA; Cys₁₁→Ser₁₁; AA N-terminales: Gln₁₆ o DGLu₁₆); la ciclación puede tener lugar entre Ala₁ y Gln₁₆/DGLu₁₅

Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-Tyr-Gln/DGLu

SEQ ID NO: 40:

Secuencia aminoacídica del β_1 -AR humano

- 30

```
1 mgagvlvlga sepgnlssaa plpdgaataa rllvpasppa sllppasesp eplsqqwtag
61 mgllmalivl livagnvlvi vaiaktprlq tltnlfimsl asadlvmgll vvpfgativv
121 wgrweygsff celwtsvdvl cvtasietlc vialdrylai tspfryqsl1 trararglvc
181 tvwaisalvs flpilmhwr aesdearrcy ndpkccdfvt nrayaiassv vsfyvplcim
241 afvylrvfre aqkqvkkids cerrflggpa rppspspspv papapppgpp rpaaaaatp
301 langragkrr psrlvalreq kalktlgiim gvftlcwlpf flanvkvafh relvpdr1fv
361 ffnwlgians afnpiiyrcs pdfrkafggl lccarraarr rhathgdrpr asgclarpgp
421 ppspgaasdd ddddvvgatp parllepwag cnggaaadsd ssldepcrpg faseskv
```

ES 2 391 358 T3

SEQ ID NO: 41:

Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β_1 -AR humano (22AA; Cys₁₇→Ser₁₇); la ciclación puede tener lugar entre Arg₁ y Gly₂₂

Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-Thr-Gly

5 SEQ ID NO: 42:

Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β_1 -AR humano (22AA; Cys₁₇→Ser₁₇)

cgggcggagagcgacgaggcgccgctgctacaacgaccccaagtgcSERgacttcgtcaccGLY

SEQ ID NO: 43:

10 Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β_1 -AR (22AA; Cys₃→Ser₃); la ciclación puede tener lugar entre Lys₁ y Pro₂₂

Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-Thr-Gly-Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro

SEQ ID NO: 44:

15 Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β_1 -AR humano (22AA; Cys₃→Ser₃)

aagtgcSERgacttcgtcaccGLYcgggaggagagcgacgaggcgccgctgctacaacgacccc

SEQ ID NO: 45:

Secuencia aminoacídica de un epítipo de EC_{II} (que lleva parte) de β_1 -AR humano

DEARRCYNDPK

20 SEQ ID NO: 46:

Secuencia aminoacídica de un epítipo de EC_{II} (que lleva parte) de β_1 -AR humano

ESDEARRCYNDPK

SEQ ID NO: 47:

Secuencia aminoacídica de un epítipo de EC_{II} de β_1 -AR humano

25 AESDEARR

SEQ ID NO: 48:

Secuencia aminoacídica de un epítipo de EC_{II} de β_1 -AR humanoDFVT

SEQ ID NO: 49:

30 Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β_1 -AR humano (18AA; Cys₁₄→Ser₁₄ (18AA; Cys₁₄→Ser₁₄))

gcnagcgacgaggcgccgctgctacaacgaccccaagtgcSERgacttcgtccar

SEQ ID NO: 50:

Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β_1 -AR humano (18AA; Cys₁₄→Ser₁₄ (18AA; Cys₁₄→Ser₁₄); Gln₁₈→DGIu₁₈)

35 **gcnagcgacgaggcgccgctgctacaacgaccccaagtgcSERgacttcgtcgar**

SEQ ID NO: 51:

Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β_1 -AR humano (19AA; Cys₁₄→Ser₁₄ (18AA; Cys₁₃→Ser₁₃))

gcnagcgacgaggcgccgctgctacaacgaccccaagSERtgcgacttcgtccar

40 SEQ ID NO: 52:

Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β₁-AR humano (19AA; Cys₁₄→Ser₁₄ (18AA; Cys₁₃→Ser₁₃); Gln₁₈→DGlu₁₈)

gcnagcgacgaggcgcgccgctgctacaacgacccaag**SERtgcgactctgctgar**

SEQ ID NO: 53:

- 5 Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β₁-AR humano (19AA; Cys₃→Ser₃ (18AA; Cys₁₄→Ser₁₄))

aag**tgcsER**gactctgctcc**argc**gnagcgacgaggcgcgccgctgctacaacgacccc

SEQ ID NO: 54:

- 10 Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β₁-AR humano (19AA; Cys₃→Ser₃ (18AA; Cys₃→Ser₃); Gln₇→DGlu₇)

aag**tgcsER**gactctgct**gargc**gnagcgacgaggcgcgccgctgctacaacgacccc

SEQ ID NO: 55:

Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β₁-AR humano (19AA; Cys₂→Ser₂ (18AA; Cys₂→Ser₂))

- 15 aag**SERtgcgactctgctccargc**gnagcgacgaggcgcgccgctgctacaacgacccc

SEQ ID NO: 56:

Secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de EC_{II} de β₁-AR humano (19AA; Cys₂→Ser₂ (18AA; Cys₂→Ser₂); Gln₇→DGlu₇)

aag**SERtgcgactctgctgargc**gnagcgacgaggcgcgccgctgctacaacgacccc

- 20 En las secuencias de nucleótidos, "**SER**" representa cualquier triplete de nucleótidos que codifica para Ser (serina), es decir, para tcn o **agy**; y "**GLY**" representa cualquier triplete de nucleótidos que codifica para Gly (Glicina), es decir, para **ggn**.

n representa cualquier nucleótido, en particular **a**, **c**, **g** o **t**, y representa **t** o **c** y **r** representa **a** o **g**.

- 25 Como se usan en el presente documento, las secuencias de los diversos péptidos se indican desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, por lo que el extremo N-terminal está en el lado izquierdo y el extremo C-terminal está en el lado derecho de la secuencia de aminoácidos representada respectiva.

Se usan las siguientes abreviaturas adicionales en el presente documento:

aminoácido:	código de 3 letras:	código de 1 letra:
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Ácido aspártico	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Ácido glutámico	Glu	E
Glutamina	Gln	Q
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K

Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptófano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V
Asparagina o ácido aspártico	Asx	B
Glutamina o ácido glutámico	Glx	Z
Leucina o Isoleucina	Xle	J
Aminoácido no especificado desconocido	oXaa	X

Referencias adicionales citadas

- American, Heart, Association: 2007. Dallas; Heart disease and stroke statistics - actualización de 2007. Circulation 115: e69-e171
- Anderton 2001 Immunology 104: 367-376
- 5 Baba 2004 Eur. Heart J. 25: 1108-1115
- Boivin 2005 Eur. J. Heart Fail. 4, supl.1: 24 (104)
- Boivin 2002 Eur. J. Heart Fail. 4: 411-417
- Chiale 2001 Circulation 103: 1765-1771
- Chien 2000 Oncol. 27: 9-17
- 10 Christ 2001 J. Mol. Cell. Cardiol. 33: 1515-1525
- Christ 2006 J. Mol. Cell Cardiol. 41: 716-723
- Elies 1996 J. Immunol. 157: 4203-4211
- Engelhardt 1999 Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. 96: 7059-7064
- Eriksson 2003 Nat. Med. 9: 1484-1490
- 15 Fabrizio 1994 Drugs Ther. 8: 89-94
- Felix 2000 J. Am. Coll. Cardiol. 35: 1590-1598
- Ferrari 1995 J. Exp. Med. 182: 59-65
- Freedman 2004 J. Clin. Invest. 113: 1379-1382
- Fu 1993, J. Clin. Invest. 91: 1964-1968
- 20 Göser 2006 Circulation 114: 1693-1702
- Hershko 2005 Ann. N.Y. Acad. Sci. 1051: 635-646
- Hoebeke 1996 Int. J. Cardiol. 54: 103-111
- Iwata 2001a J. Am. Coll. Cardiol. 37: 418-424
- Iwata 2001b Circ. Res. 88: 578-586

- Jahns 1996 *Eur. J. Pharmacol.* 316: 111-121
- Jahns 1999a *J. Am. Coll. Cardiol.* 34: 1545-1551
- Jahns 1999b *Circulation* 99: 649-654
- Jahns 2000 *J. Am. Coll. Cardiol.* 36: 1280-1287
- 5 Jahns 2004 *J. Clin. Invest.* 113: 1419-1429
- Jahns 2006 *Trends Cardiovasc Med* 16: 20-24
- Khoynezhad 2007 *Eur. J. Heart Fail.* 9: 120-123
- Kühl 2005 *Circulation* 112: 1965-1970
- Li 2006 *Circulation* 117: 8234-8240
- 10 Limas 1992 *Am. Heart J.* 123: 967-970
- Limas 1996 *Int. J. Cardiol.* 54: 113-116
- Limas 1997 *Circulation* 95: 1979-1980
- Limas 2004 *Am. J. Cardiol.* 93: 1189-1191
- Lohse 2003 *Circ. Res.* 93: 896-906
- 15 Luppi 1998 *Circulation* 98: 777-785
- MacLellan 2003 *Nat. Med.* 9: 1455-1456
- Maekawa 2007 *Circulation* 115: 5-8
- Magnusson 1994 *Circulation* 89: 2760-2767
- Magnusson 1996 *Int. J. Cardiol.* 54: 137-141
- 20 Mahrholdt 2006 *Circulation* 114: 1581-1590
- Matsui 1995 *Autoimmunity* 21: 85-88
- Matsui 2001 *Autoimmunity* 43: 217-220
- Mobini 2004 *Autoimmunity Rev.* 3: 277-284
- Morita 2005 *J. Clin. Invest.* 115: 518-526
- 25 Neumann 1990 *J. Am. Coll. Cardiol.* 16: 839-846
- Nikolaev 2007 *J. Am. Coll. Cardiol.* 50: 423-431
- Okazaki 2003 *Nat. Med.* 9: 1477-1483
- Okazaki 2005 *Trends Mol Med* 11: 322-326
- Pohlner 1997 *Am. J. Cardiol.* 80: 1040-1045
- 30 Rose 1993 *Immunol. Today* 14: 426-430
- Rose 2001 *J. Clin. Invest.* 107: 943-944
- Schultheiss 1985 *J. Mol. Cell Cardiol.* 17: 603-617
- Schultheiss 1988 *J. Exp. Med.* 168: 2102-2109
- Schulze 1999 *Cardiovasc. Res.* 44: 91-100
- 35 Sewald 2002 *Peptides: Chemistry and Biology*, Willey-VCH.
- Smulski 2006 *FASEB J.* 20: 1396-1406
- Stork 2006 *Am. Heart J.* 152: 697-704

ES 2 391 358 T3

<220>

<223> Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de ECII de beta1-AR humano

<400> 2

5

Ala Arg Ala Glu Ser Asp Glu Ala Arg Arg Cys Tyr Asn Asp Pro Lys
1 5 10 15

Cys Ser Asp Phe Val Thr Asn Arg Gln
20 25

<210> 3

<211> 18

10 <212> Proteína

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de ECII de beta1-AR humano

15

<220>

<221> VARIANTE

<222> (18)..(18)

<223> /reemplazar = "DGlu"

20

<400> 3

Ala Asp Glu Ala Arg Arg Cys Tyr Asn Asp Pro Lys Cys Ser Asp Phe
1 5 10 15

Val Glu

25 <210> 4

<211> 25

<212> Proteína

<213> Artificial

30 <220>

ES 2 391 358 T3

<223> Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de ECII de beta1-AR humano

<220>

<221> VARIANTE

5 <222> (25)..(25)

<223> /reemplazar = "DGlu"

<400> 4

Ala Arg Ala Glu Ser Asp Glu Ala Arg Arg Cys Tyr Asn Asp Pro Lys
1 5 10 15

Cys Ser Asp Phe Val Thr Asn Arg Glu
 20 25

10

<210> 5

<211> 18

<212> Proteína

15 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de ECII de beta1-AR humano

20 <400> 5

Ala Asp Glu Ala Arg Arg Cys Tyr Asn Asp Pro Lys Ser Cys Asp Phe
1 5 10 15

Val Gln

<210> 6

25 <211> 25

<212> Proteína

<213> Artificial

<220>

<220>

<221> misc_feature

<222> (54)..(54)

<223> es a o g

5

<400> 9

gcngacgagg cgcgccgctg ctacaacgac cccaagtgct ctgacttcgt ccar

. 54

10 <210> 10

<211> 75

<212> ADN

<213> Artificial

15 <220>

<223> Secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo ECII de beta1-AR humana

<220>

20 <221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n es a, c, g, t o u

<220>

25 <221> misc_feature

<222> (52)..(54)

<223> /reemplazar = "tcc"

/reemplazar = "agc"

/reemplazar = "tca"

30 /reemplazar = "tcg"

/reemplazar = "agt"

<220>

<221> misc_feature

35 <222> (75)..(75)

<223> r es a o g

ES 2 391 358 T3

<410> 10

```
gcncggggcgg agagcgacga ggcgcgcccgc tgctacaacg accccaagtg ctctgacttc      60
gtcaccaacc ggcar                                     .                               75
```

- 5 <210> 11
- <211> 54
- <212> ADN
- <213> Artificial

10 <220>
<223> Secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo ECII de beta1-AR humana

<220>

- 15 <221> misc_feature
- <222> (3)..(3)
- <223> n es a, c, g, t o u

<220>

- 20 <221> misc_feature
- <222> (40)..(42)
- <223> /reemplazar = "tcc"
/reemplazar = "agc"
/reemplazar = "tca"
- 25 /reemplazar = "tcg"
/reemplazar = "agt"

<220>

- <221> misc_feature
- 30 <222> (54)..(54)
- <223> r es a o g

<410> 11

ES 2 391 358 T3

gcngacgagg cgcgccgctg ctacaacgac cccaagtgct ctgacttcgt cgar

54

<210> 12

<211> 75

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo ECII de beta1-AR humana

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

15 <223> n es a, c, g, t o u

<220>

<221> misc_feature

<222> (52)..(54)

20 <223> /reemplazar = "tcc"

/reemplazar = "agc"

/reemplazar = "tca"

/reemplazar = "tcg"

/reemplazar = "agt"

25

<220>

<221> misc_feature

<222> (75)..(75)

<223> r es a o g

30

<410> 12

gcncggggcg agagcgacga ggccgccgc tgctacaacg accccaagtg ctctgacttc

60

gtcaccaacc ggar

75

35 <210> 13

ES 2 391 358 T3

<211> 54

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> Secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo ECII de beta1-AR humana

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n es a, c, g, t o u

<220>

15 <221> misc_feature

<222> (37)..(39)

<223> /reemplazar = "tcc"

 /reemplazar = "agc"

 /reemplazar = "tca"

20 /reemplazar = "tcg"

 /reemplazar = "agt"

<220>

<221> misc_feature

25 <222> (54)..(54)

<223> r es a o g

<410> 13

30 gcn gac gagg cgcgccgctg ctacaacgac cccaagtctt gcgacttcgt ccar

54

<210> 14

<211> 75

<212> ADN

35 <213> Artificial

ES 2 391 358 T3

<220>

<223> Secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo ECII de beta1-AR humana

5 <220>

<221> misc_feature

>222> (3)..(3)

<223> n e s a, c, g, t o u

10 <220>

<221> misc_feature

<222> (49)..(51)

<223> /reemplazar = "tcc"

/reemplazar = "agc"

15 /reemplazar = "tca"

/reemplazar = "tcg"

/reemplazar = "agt"

<220>

20 <221> misc_feature

<222> (75)..(75)

<223> r e s a o g

<410> 14

25

gcncgggagg agagcgcacga ggcgcgccgc tgctacaacg accccaagtc ttgcgacttc 60

gtcaccaacc ggcar 75

<210> 15

<211> 54

30 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

35 <223> Secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo ECII de beta1-AR humana

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

5 <223> n es a, c, g, t o u

<220>

<221> misc_feature

<222> (37)..(39)

10 <223> /reemplazar = "tcc"

/reemplazar = "agc"

/reemplazar = "tca"

/reemplazar = "tcg"

/reemplazar = "agt"

15

<220>

<221> misc_feature

<222> (54)..(54)

<223> r es a o g

20

<410> 15

gcn gac gagg cgcgccgctg ctacaacgac cccaagtctt gcgacttcgt cgar

54

25 <210> 16

<211> 75

<212> ADN

<213> SEQ ID NO: 16:

30 <220>

<223> Secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo ECII de beta1-AR humana

<220>

35 <221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n es a, c, g, t o u

<220>

<221> misc_feature

<222> (49)..(51)

5 <223> /reemplazar = "tcc"

/reemplazar = "agc"

/reemplazar = "tca"

/reemplazar = "tcg"

/reemplazar = "agt"

10

<220>

<221> misc_feature

<222> (75)..(75)

<223> r e s a o g

15

<410> 16

gcnCGGGCGG agagCGacga ggcGCGccgc tgctacaacg accccaagtc ttgcgacttc 60

gtcaccaacc gggar 75

20 <210> 17

<211> 18

<212> Proteína

<213> Artificial

25 <220>

<223> Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de ECII de beta1-AR humano

<400> 17

Lys Cys Ser Asp Phe Val Gln Ala Asp Glu Ala Arg Arg Cys Tyr Asn
 1 5 10 15

Asp Pro

30

<210> 18

<211> 25

<212> Proteína

<213> Artificial

5

<220>

<223> Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de ECII de beta1-AR humano

<400> 18

10

Lys Cys Ser Asp Phe Val Thr Asn Arg Gln Ala Arg Ala Glu Ser Asp
1 5 10 15

Glu Ala Arg Arg Cys Tyr Asn Asp Pro
20 25

<210> 19

<211> 18

15

<212> Proteína

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de ECII de beta1-AR humano

20

<220>

<221> VARIANTE

<222> (7)..(7)

<223> /reemplazar = "DGlu"

25

<400> 19

Lys Cys Ser Asp Phe Val Glu Ala Asp Glu Ala Arg Arg Cys Tyr Asn
1 5 10 15

Asp Pro

ES 2 391 358 T3

<210> 20

<211> 25

<212> Proteína

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de ECII de beta1-AR humano

10 <220>

<221> VARIANTE

<222> (10)..(10)

<223> /reemplazar = "DGlu"

15 <400> 20

Lys Cys Ser Asp Phe Val Thr Asn Arg Glu Ala Arg Ala Glu Ser Asp
1 5 10 15

Glu Ala Arg Arg Cys Tyr Asn Asp Pro
20 25

<210> 21

20 <211> 18

<212> Proteína

<213> Artificial

<220>

25 <223> Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de ECII de beta1-AR humano

<400> 21

Lys Ser Cys Asp Phe Val Gln Ala Asp Glu Ala Arg Arg Cys Tyr Asn
1 5 10 15

Asp Pro

/reemplazar = "tcg"

/reemplazar = "agt"

<220>

5 <221> misc_feature

>222> (21)..(21)

<223> r e s a o g

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (24)..(24)

<223> n e s a , c , g , t o u

<410> 25

15

aagtgctctg acttcgtcca rgcngacgag gcgcgccgct gctacaacga cccc

54

<210> 26

<211> 75

20 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

25 <223> Secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo ECII de beta1-AR humana

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(9)

30 <223> /reemplazar = "tcc"

/reemplazar = "agc"

/reemplazar = "tca"

/reemplazar = "tcg"

/reemplazar = "agt"

35

<220>

<221> misc_feature

<222> (30)..(30)

<223> r e s a o g

5 <220>

<221> misc_feature

<222> (33)..(33)

<223> n e s a, c, g, t o u

10 <410> 26

aagtgctctg acttcgtcaç caaccggcar gncnccggcg agagcgcacga ggcgcgccgc 60

tgctacaacg acccc 75

<210> 27

15 <211> 54

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

20 <223> Secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo ECII de beta1-AR humana

<220>

<221> misc_feature

25 <222> (7)..(9)

<223> /reemplazar = "tcc"

/reemplazar = "agc"

/reemplazar = "tca"

/reemplazar = "tcg"

30 /reemplazar = "agt"

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

35 <223> r e s a o g

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(24)

5 <223> n e s a, c, g, t o u

<410> 27

aagtgctctg acttcgctcga rgcngacgag gcgcgcccgt gctacaacga cccc

54

10

<210> 28

<211> 75

<212> ADN

<213> Artificial

15

<220>

<223> Secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo ECII de beta1-AR humana

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(9)

<223> /reemplazar = "tcc"

/reemplazar = "agc"

25

/reemplazar = "tca"

/reemplazar = "tcg"

/reemplazar = "agt"

<220>

30

<221> misc_feature

<222> (30)..(30)

<223> r e s a o g

<220>

35

<221> misc_feature

<222> (33)..(33)

ES 2 391 358 T3

<223> n es a, c, g, t o u

<410> 28

aagtgctctg acttcgtcac caaccgggar gnccgggcgg agagcgacga ggcgcgccgc 60
tgctacaacg acccc 75

5

<210> 29

<211> 54

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítopo ECII de beta1-AR humana

15

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(6)

<223> /reemplazar = "tcc"

20 /reemplazar = "agc"

/reemplazar = "tca"

/reemplazar = "tcg"

/reemplazar = "agt"

25 <220>

<221> misc_feature

>222> (21)..(21)

<223> r es a o g

30 <220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(24)

<223> n es a, c, g, t o u

35 <410> 29

aagtcttgcg acttcgtcca rgngacgag gcgcgccgct gctacaacga cccc

54

<210> 30

5 <211> 75

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo ECII de beta1-AR humana

<220>

<221> misc_feature

15 <222> (4)..(6)

<223> /reemplazar = "tcc"

/reemplazar = "agc"

/reemplazar = "tca"

/reemplazar = "tcg"

20 /reemplazar = "agt"

<220>

<221> misc_feature

>222> (30)..(30)

25 <223> r e s a o g

<220>

<221> misc_feature

<222> (33)..(33)

30 <223> n e s a , c , g , t o u

<410> 30

aagtcttgcg acttcgtcac caaccggcar gcncgggagg agagcgacga ggcgcgccc

60

tgctacaacg acccc

75

<210> 31

<211> 54

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo ECII de beta1-AR humana

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(6)

15 <223> /reemplazar = "tcc"

/reemplazar = "agc"

/reemplazar = "tca"

/reemplazar = "tcg"

/reemplazar = "agt"

20

<220>

<221> misc_feature

>222> (21)..(21)

<223> r e s a o g

25

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(24)

<223> n e s a , c , g , t o u

30

<410> 31

aagtcttgcg acttcgtcga rgcngacgag gcgcgcccgt gctacaacga cccc

54

35 <210> 32

ES 2 391 358 T3

<211> 75

<212> ADN

<213> Artificial

5 <220>

<223> Secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo ECII de beta1-AR humana

<220>

10 <221> misc_feature

<222> (4)..(6)

<223> /reemplazar = "tcc"

/reemplazar = "agc"

/reemplazar = "tca"

15 /reemplazar = "tcg"

/reemplazar = "agt"

<220>

<221> misc_feature

20 <222> (30)..(30)

<223> r e s a o g

<220>

<221> misc_feature

25 >222> (24)..(24)

<223> n e s a, c, g, t o u

<410> 32

aagtcttgcg acttcgtcac caaccgggar gcnCGggcgg agagcgacga ggcgcgccgc

60

30 tgctacaacg acccc

75

<210> 33

<211> 16

<212> Proteína

35 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de ECII de beta1-AR humano

5 <400> 33

Asp Glu Ala Arg Arg Cys Tyr Asn Asp Pro Lys Cys Cys Asp Phe Val
1 5 10 15

<210> 34

10 <211> 23

<212> Proteína

<213> Artificial

<220>

15 <223> Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de ECII de beta1-AR humano

<400> 34

Arg Ala Glu Ser Asp Glu Ala Arg Arg Cys Tyr Asn Asp Pro Lys Cys
1 5 10 15

Cys Asp Phe Val Thr Asn Arg
20

20

<210> 35

<211> 5

<212> Proteína

<213> Artificial

25

<220>

<223> Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de ECII de beta1-AR humano

<400> 35

30 Asp Glu Ala Arg Arg

ES 2 391 358 T3

1 5

<210> 36

<211> 9

5 <212> Proteína

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de ECII de beta1-AR humano

10

<400> 36

Arg Ala Glu Ser Asp Glu Ala Arg Arg

1 5

15 <210> 37

<211> 3

<212> Proteína

<213> Artificial

20 <220>

<223> Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de ECII de beta1-AR humano

<400> 37

Asp Phe Val

25 1

<210> 34

<211> 6

<212> Proteína

30 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de ECII de beta1-AR humano

35 <400> 38

Asp Phe Val Thr Asn Arg

1 5

<210> 39

<211> 16

<212> Proteína

5 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de ECII de beta1-AR humano

10 <220>

<221> VARIANTE

<222> (16)..(16)

<223> /reemplazar = "DGlu"

15 <400> 39

Ala	Arg	Arg	Cys	Tyr	Asn	Asp	Pro	Lys	Cys	Ser	Asp	Phe	Val	Tyr	Glx
1				5					10					15	

<210> 40

20 <211> 477

<212> Proteína

<213> Homo sapiens

<400> 40

25

ES 2 391 358 T3

Met Gly Ala Gly Val Leu Val Leu Gly Ala Ser Glu Pro Gly Asn Leu
1 5 10 15

Ser Ser Ala Ala Pro Leu Pro Asp Gly Ala Ala Thr Ala Ala Arg Leu
20 25 30

Leu Val Pro Ala Ser Pro Pro Ala Ser Leu Leu Pro Pro Ala Ser Glu
35 40 45

Ser Pro Glu Pro Leu Ser Gln Gln Trp Thr Ala Gly Met Gly Leu Leu
50 55 60

Met Ala Leu Ile Val Leu Leu Ile Val Ala Gly Asn Val Leu Val Ile
65 70 75 80

Val Ala Ile Ala Lys Thr Pro Arg Leu Gln Thr Leu Thr Asn Leu Phe
85 90 95

Ile Met Ser Leu Ala Ser Ala Asp Leu Val Met Gly Leu Leu Val Val
100 105 110

Pro Phe Gly Ala Thr Ile Val Val Trp Gly Arg Trp Glu Tyr Gly Ser
115 120 125

Phe Phe Cys Glu Leu Trp Thr Ser Val Asp Val Leu Cys Val Thr Ala
130 135 140

Ser Ile Glu Thr Leu Cys Val Ile Ala Leu Asp Arg Tyr Leu Ala Ile
145 150 155 160

Thr Ser Pro Phe Arg Tyr Gln Ser Leu Leu Thr Arg Ala Arg Ala Arg
165 170 175

Gly Leu Val Cys Thr Val Trp Ala Ile Ser Ala Leu Val Ser Phe Leu
180 185 190

Pro Ile Leu Met His Trp Trp Arg Ala Glu Ser Asp Glu Ala Arg Arg
195 200 205

ES 2 391 358 T3

Cys Tyr Asn Asp Pro Lys Cys Cys Asp Phe Val Thr Asn Arg Ala Tyr
 210 215 220
 Ala Ile Ala Ser Ser Val Val Ser Phe Tyr Val Pro Leu Cys Ile Met
 225 230 235 240
 Ala Phe Val Tyr Leu Arg Val Phe Arg Glu Ala Gln Lys Gln Val Lys
 245 250 255
 Lys Ile Asp Ser Cys Glu Arg Arg Phe Leu Gly Gly Pro Ala Arg Pro
 260 265 270
 Pro Ser Pro Ser Pro Ser Pro Val Pro Ala Pro Ala Pro Pro Pro Gly
 275 280 285
 Pro Pro Arg Pro Ala Ala Ala Ala Ala Thr Ala Pro Leu Ala Asn Gly
 290 295 300
 Arg Ala Gly Lys Arg Arg Pro Ser Arg Leu Val Ala Leu Arg Glu Gln
 305 310 315 320
 Lys Ala Leu Lys Thr Leu Gly Ile Ile Met Gly Val Phe Thr Leu Cys
 325 330 335
 Trp Leu Pro Phe Phe Leu Ala Asn Val Val Lys Ala Phe His Arg Glu
 340 345 350
 Leu Val Pro Asp Arg Leu Phe Val Phe Phe Asn Trp Leu Gly Tyr Ala
 355 360 365
 Asn Ser Ala Phe Asn Pro Ile Ile Tyr Cys Arg Ser Pro Asp Phe Arg
 370 375 380
 Lys Ala Phe Gln Gly Leu Leu Cys Cys Ala Arg Arg Ala Ala Arg Arg
 385 390 395 400
 Arg His Ala Thr His Gly Asp Arg Pro Arg Ala Ser Gly Cys Leu Ala
 405 410 415
 Arg Pro Gly Pro Pro Pro Ser Pro Gly Ala Ala Ser Asp Asp Asp
 420 425 430
 Asp Asp Val Val Gly Ala Thr Pro Pro Ala Arg Leu Leu Glu Pro Trp
 435 440 445

Ala Gly Cys Asn Gly Gly Ala Ala Ala Asp Ser Asp Ser Ser Leu Asp
450 455 460

Glu Pro Cys Arg Pro Gly Phe Ala Ser Glu Ser Lys Val
465 470 475

<210> 41

<211> 22

5 <212> Proteína

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de ECII de beta1-AR humano

10

<400> 41

Arg Ala Glu Ser Asp Glu Ala Arg Arg Cys Tyr Asn Asp Pro Lys Cys
1 5 10 15

Ser Asp Phe Val Thr Gly
20

15 <210> 42

<211> 66

<212> ADN

<213> Artificial

20 <220>

<223> Secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo ECII de beta1-AR humana

<220>

25 <221> misc_feature

<222> (49)..(51)

<223> /reemplazar = "tcc"

/reemplazar = "agc"

/reemplazar = "tca"

ES 2 391 358 T3

/reemplazar = "tcg"

/reemplazar = "agt"

<220>

5 <221> misc_feature

<222> (66)..(66)

<223> n es a, c, g, t o u

<410> 42

10

cgggcgagaga gcgacgaggc ggcgcgctgc tacaacgacc ccaagtgctc tgacttcgctc 60

accggn 66

<210> 43

<211> 22

15 <212> Proteína

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de ECII de beta1-AR humano

20

<400> 43

Lys Cys Ser Asp Phe Val Thr Gly Arg Ala Glu Ser Asp Glu Ala Arg
1 5 10 15

Arg Cys Tyr Asn Asp Pro
20

25 <210> 44

<211> 66

<212> ADN

<213> Artificial

30 <220>

ES 2 391 358 T3

<223> Secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo ECII de beta1-AR humana

<220>

5 <221> misc_feature

<222> (7)..(9)

<223> /reemplazar = "tcc"

/reemplazar = "agc"

/reemplazar = "tca"

10 /reemplazar = "tcg"

/reemplazar = "agt"

<220>

<221> misc_feature

15 <222> (24)..(24)

<223> n e s a , c , g , t o u

<410> 44

aagtgctctg acttcgtcac cggncggggcg gagagcgcg aggcgcgccc ctgctacaac 60

20 gacccc 66

<210> 45

<211> 11

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo ECII de beta1-AR humana

30 <220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(3)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se dé en la naturaleza

35 <220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(7)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se dé en la naturaleza

5 <400> 45

```
Asp Xaa Xaa Arg Arg Cys Xaa Asn Asp Pro Lys
1           5           10
```

<210> 46

10 <211> 13

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

15 <223> Secuencia secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo ECII de beta1-AR humana

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(5)

20 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se dé en la naturaleza

<220>

<221> misc_feature

<222> (9)..(9)

25 <223> Xaa puede ser cualquier aminoácido que se dé en la naturaleza

<400> 46

```
Glu Ser Asp Xaa Xaa Arg Arg Cys Xaa Asn Asp Pro Lys
1           5           10
```

30

<210> 47

<211> 8

<212> Proteína

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de ECII de beta1-AR humano

5

<400> 47

Ala Glu Ser Asp Glu Ala Arg Arg

1

5

10 <210> 48

<211> 4

<212> Proteína

<213> Artificial

15 <220>

<223> Secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo de ECII de beta1-AR humano

<400> 48

Asp Phe Val Thr

20 1

<210> 49

<211> 57

<212> ADN

25 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo ECII de beta1-AR humana

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n e s a, c, g, t o u

35

<220>

<221> misc_feature

<222> (43)..(45)

<223> /reemplazar = "tcc"

/reemplazar = "agc"

/reemplazar = "tca"

5 /reemplazar = "tcg"

/reemplazar = "agt"

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (57)..(57)

<223> n es a o g

<410> 49

15 gcnagcgacg aggcgcgccg ctgctacaac gacccaagt gctctgactt cgtccar · 57

<210> 50

<211> 57

<212> ADN

20 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo ECII de beta1-AR humana

25

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n es a, c, g, t o u

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (43)..(45)

<223> /reemplazar = "tcc"

35 /reemplazar = "agc"

/reemplazar = "tca"

/reemplazar = "tcg"

/reemplazar = "agt"

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (57)..(57)

<223> r e s a o g

<410> 50

10 gcnagcgcgacg aggcgcgcgcg ctgctacaac gaccccaagt gctctgactt cgtcgar 57

<210> 51

<211> 57

<212> ADN

15 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo ECII de beta1-AR humana

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n e s a , c , g , t o u

25

<220>

<221> misc_feature

<222> (43)..(45)

<223> /reemplazar = "tcc"

30 /reemplazar = "agc"

 /reemplazar = "tca"

 /reemplazar = "tcg"

 /reemplazar = "agt"

35 <220>

<221> misc_feature

<222> (57)..(57)

<223> r e s a o g

<410> 51

5 gcnagcgcgacg aggcgcgcgcg ctgctacaac gaccccaagt cttgcgactt cgtccar 57

<210> 52

<211> 57

<212> ADN

10 <213> Artificial

<220>

<223> Secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítopo ECII de beta1-AR humana

15

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> n e s a , c , g , t o u

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (40)..(42)

<223> /reemplazar = "tcc"

25

/reemplazar = "agc"

/reemplazar = "tca"

/reemplazar = "tcg"

/reemplazar = "agt"

30

<220>

<221> misc_feature

<222> (57)..(57)

<223> r e s a o g

35

<410> 52

gcnagcgacg agggcgcgccg ctgctacaac gacccaagt cttgcgactt cgtcgar

57

<210> 53

<211> 57

5 <212> ADN

<213> Artificial

<220>

10 <223> Secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo ECII de beta1-AR humana

<220>

<221> misc_feature

<222> (7)..(9)

15 <223> /reemplazar = "tcc"

/reemplazar = "agc"

/reemplazar = "tca"

/reemplazar = "tcg"

/reemplazar = "agt"

20

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> r e s a o g

25

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(24)

<223> n e s a , c , g , t o u

30

<400> 53

aagtgctctg acttcgtcca rgcnagcgac gagggcgcgcc gctgctacaa cgacccc

57

35 <210> 54

<211> 57

ES 2 391 358 T3

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

5 <223> Secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo ECII de beta1-AR humana

<220>

<221> misc_feature

10 <222> (7)..(9)

<223> /reemplazar = "tcc"

/reemplazar = "agc"

/reemplazar = "tca"

/reemplazar = "tcg"

15 /reemplazar = "agt"

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

20 <223> r e s a o g

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(24)

25 <223> n e s a , c , g , t o u

<400> 54

aagtgctctg acttcgtcga rgcnagecgac gaggcgcgcc gctgctacaa cgacccc

57

30

<210> 55

<211> 57

<212> ADN

<213> Artificial

35

<220>

<223> Secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo ECII de beta1-AR

humana

<220>

<221> misc_feature

5 <222> (4)..(6)

<223> /reemplazar = "tcc"

/reemplazar = "agc"

/reemplazar = "tca"

/reemplazar = "tcg"

10 /reemplazar = "agt"

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

15 <223> r e s a o g

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(24)

20 <223> n e s a , c , g , t o u

<400> 55

aagtctttgcg acttctgtcca rgnagcgcac gaggcgcgcc gctgctacaa cgacccc

57

25

<210> 56

<211> 57

<212> ADN

<213> Artificial

30

<220>

<223> Secuencia nucleotídica que codifica una secuencia aminoacídica homóloga a un epítipo ECII de beta1-AR humana

35

<220>

<221> misc_feature

<222> (4)..(6)

ES 2 391 358 T3

<223> /reemplazar = "tcc"

/reemplazar = "agc"

/reemplazar = "tca"

/reemplazar = "tcg"

5 /reemplazar = "agt"

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

10 <223> r e s a o g

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(24)

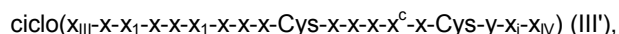
15 <223> n e s a , c , g , t o u

<400> 56

aagtcttgcg acttcgtcga rgcnagcgcac gaggcgcgcc gctgctacaa cgacccc

57

20

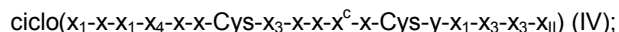


en las que

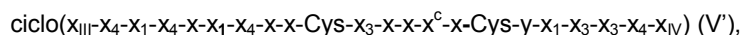
a) x_1 o Xxx_1 está seleccionado individualmente e independientemente del grupo constituido por aminoácidos ácidos; y/o

5 b) x_2 está seleccionado individualmente e independientemente del grupo constituido por aminoácidos básicos.

11. El péptido cíclico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 que es un péptido cíclico de fórmula IV, V o V':



10 $\text{ciclo}(x_1-x_2-x_4-x_1-x_4-x-x_1-x_4-x-x-\text{Cys}-x_3-x-x-x^c-x-\text{Cys}-y-x_1-x_3-x_3-x_4-x_5-x_2-x_{II}) \text{ (V)};$



en las que

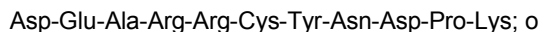
a) x_1 o Xxx_1 están seleccionados individualmente e independientemente del grupo constituido por aminoácidos ácidos;

15 b) x_2 está seleccionado individualmente e independientemente del grupo constituido por aminoácidos básicos;

c) x_3 o Xxx_3 está individualmente e independientemente seleccionado del grupo constituido por Leu, He, Val, Met, Trp, Tyr y Phe; y/o

20 d) x_4 o Xxx_4 está individualmente e independientemente seleccionado del grupo constituido por Ser, Thr, Ala y Gly.

12. El péptido cíclico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende el tramo aminoacídico



25 13. El péptido cíclico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 que es un péptido cíclico seleccionado a partir del grupo constituido por:

a) un péptido cíclico formable o formado por la secuencia de aminoácidos como se representa en una cualquiera de las SEQ ID NO: 41, 43, 1 a 4 y 17 a 20;

30 b) un péptido cíclico formable o formado por una secuencia de aminoácidos como se codifica por una secuencia de nucleótidos como se describe en una cualquiera de SEQ ID NO: 42, 44, 9 a 12, 25 a 28, 49, 50, 53 y 54;

c) un péptido cíclico formable o formado por una secuencia de aminoácidos según se codifican por una secuencia de nucleótidos que difiere de la secuencia de nucleótidos según se describe en una cualquiera de SEQ ID NO: 42, 44, 9 a 12, 25 a 28, 49, 50, 53 y 54 debido a la degeneración del código genético; y

d) un péptido cíclico de una cualquiera de fórmula VI a IX':

35

ciclo (Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-Thr-Gly) (IX')

ciclo (Ala-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-Gln) (VI);

ciclo (Ala-Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-Thr-Asn-Arg-Gln) (VII);

ciclo (Ala-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-DGlu) (VIII);

ciclo (Ala-Arg-Ala-Glu-Ser-Asp-Glu-Ala-Arg-Arg-Cys-Tyr-Asn-Asp-Pro-Lys-Cys-Ser-Asp-Phe-Val-Thr-Asn-Arg-DGlu) (IX).

- 5 14. El péptido cíclico de la reivindicación 13, en el que al menos uno de los aminoácidos ácidos está reemplazado por un aminoácido diferente seleccionado del grupo constituido por aminoácidos ácidos.
15. El péptido cíclico de la reivindicación 13 o 14, en el que al menos uno de los aminoácidos básicos está reemplazado por un aminoácido diferente seleccionado del grupo constituido por aminoácidos básicos.
- 10 16. El péptido cíclico de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que al menos uno de los residuos aminoacídicos alifáticos está reemplazado por un aminoácido diferente seleccionado del grupo constituido por aminoácidos alifáticos.
17. Un procedimiento para producir un péptido cíclico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que comprende las etapas de
- 15 a) (i) cultivar una célula huésped recombinante que comprende un ácido nucleico de la molécula que codifica el armazón aminoacídico del péptido cíclico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 o un vector que comprende dicha molécula de ácido nucleico en condiciones tales que el armazón aminoacídico del polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 se expresa y recuperar dicho armazón aminoacídico; o
- (ii) sintetizar químicamente el armazón aminoacídico del polipéptido de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16; y
- 20 b) ciclación de dicho armazón de aminoácidos para formar el péptido cíclico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16.
18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que dicha secuencia de nucleótidos es una secuencia de nucleótidos como se representa en una cualquiera de SEQ ID NO: 9 a 12, 25 a 28, 42 y 44 o una secuencia de nucleótidos que difiere de las mismas debido a la degeneración del código genético.
- 25 19. Una composición que comprende un péptido cíclico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 y opcionalmente un vehículo.
20. La composición de la reivindicación 19, en la que dicha composición es una composición farmacéutica y dicho vehículo es un vehículo farmacéuticamente aceptable.
21. Un péptido cíclico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 o una composición farmacéutica de la reivindicación 20 y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable, para usar en
- 30 a) el tratamiento, mejora o prevención de una enfermedad donde la actividad de un β -AR está potenciada;

- b) el tratamiento de un paciente que tiene anticuerpos frente a un β -AR; o
- c) inducir inmunotolerancia.

5 22. El péptido cíclico o la composición farmacéutica de la reivindicación 21, en la que dicha enfermedad donde la actividad de un receptor β -adrenérgico está potenciada es una enfermedad del corazón o en la que dicho paciente sufre de una enfermedad del corazón.

10 23. El péptido cíclico o la composición farmacéutica de la reivindicación 22, en la que dicha enfermedad del corazón está seleccionada del grupo constituido por enfermedad cardiaca infecciosa y no infecciosa, enfermedad cardiaca isquémica y no isquémica, enfermedad cardiaca inflamatoria y miocarditis, dilatación cardiaca, miocardiopatía idiopática, miocardiopatía dilatada (DCM) (idiopática), miocardiopatía inmune, fallo cardiaco y cualquier arritmia cardiaca incluyendo latidos de captura prematuros ventriculares o supraventriculares así como arritmia auricular incluyendo fibrilación auricular y/o aleteo auricular.

24. El péptido cíclico o la composición farmacéutica de la reivindicación 22 o 23, en el que dicha enfermedad cardiaca es DCM (idiopática).

15 25. El péptido cíclico o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 24, en el que dicha enfermedad está inducida por anticuerpos frente a un β -AR.

26. El péptido cíclico o la composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 25, en el que dicho péptido cíclico o dicha composición farmacéutica se administra de tal manera que al menos se alcanzaron 0,05 mg de dicho péptido cíclico por kg de peso corporal.

20 27. Procedimiento para detectar anticuerpos frente a un β -AR (en una muestra) que comprenden la etapa de poner en contacto el péptido cíclico de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 con dichos anticuerpos a detectarse.

28. El péptido cíclico, la composición farmacéutica o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 21 a 27, en el que dicho β -AR es β_1 -AR.

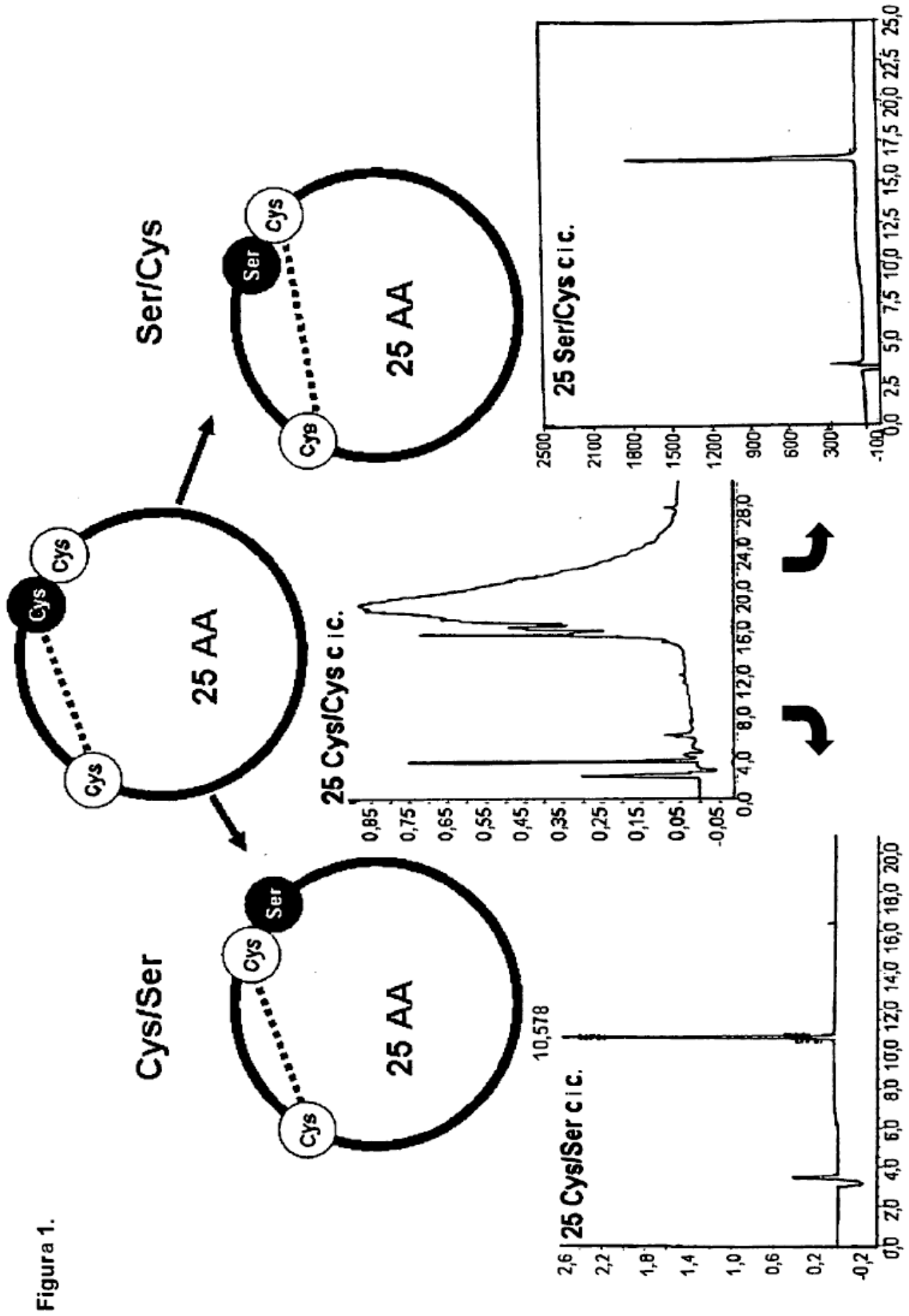


Figura 1.

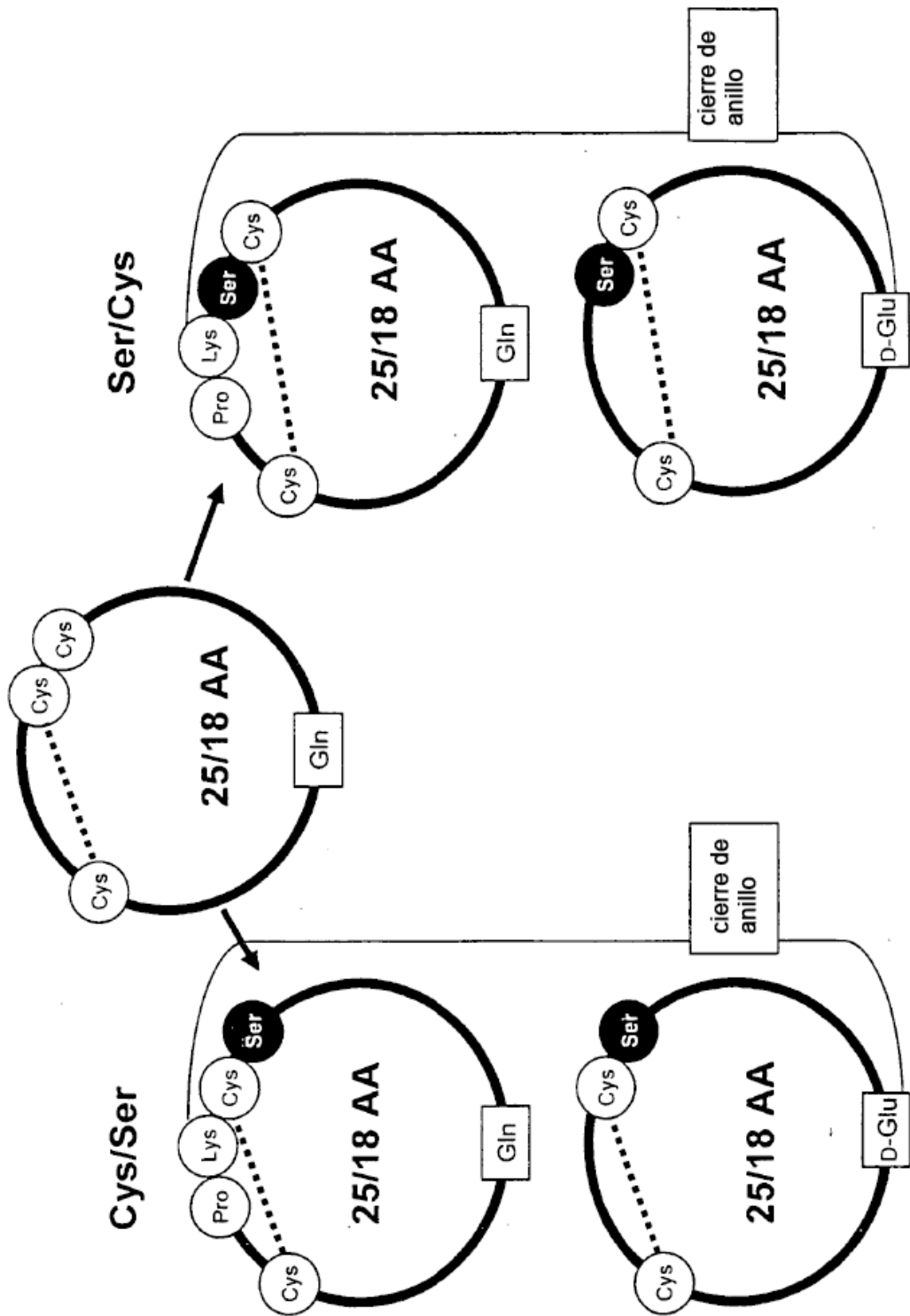
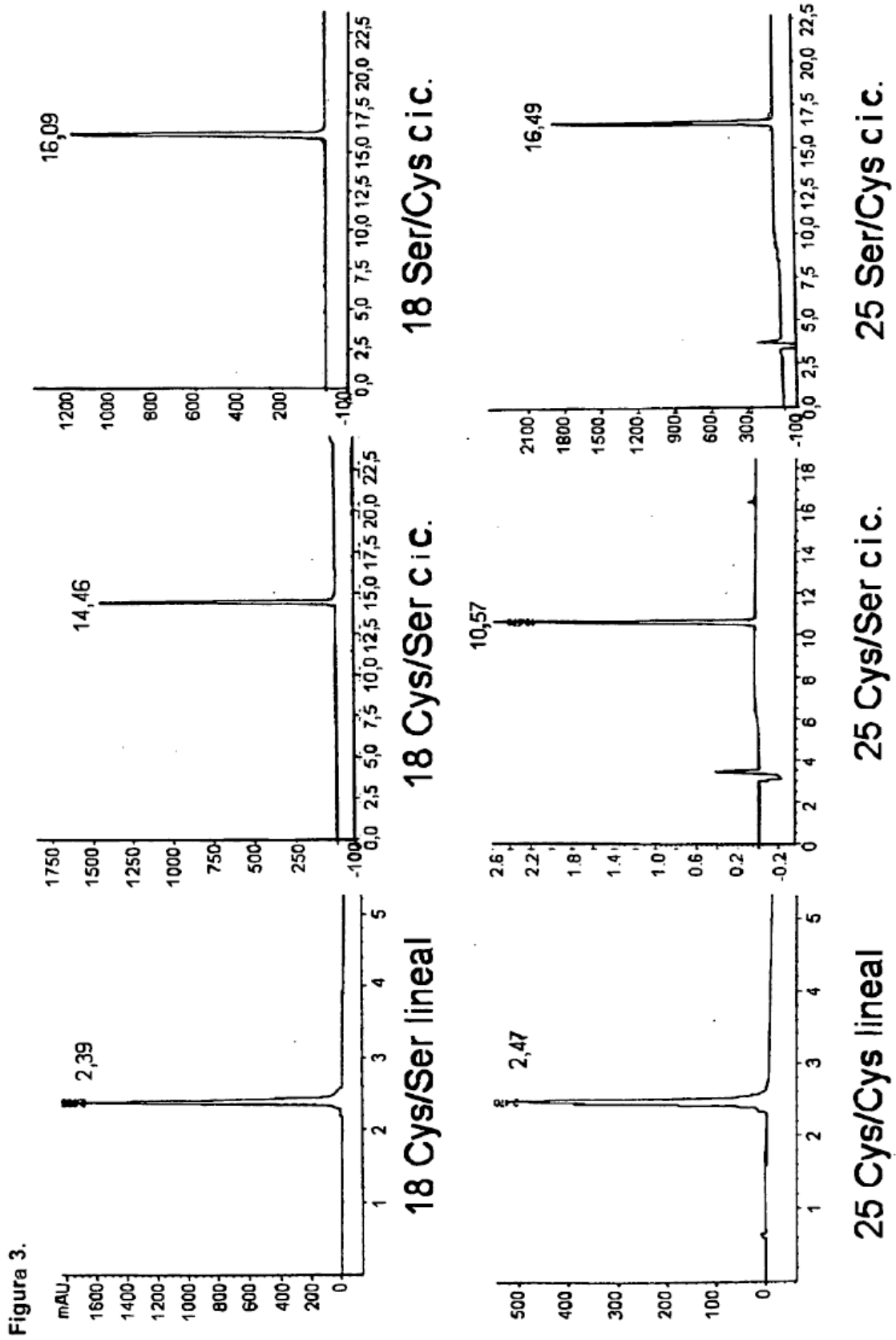


Figura 2.



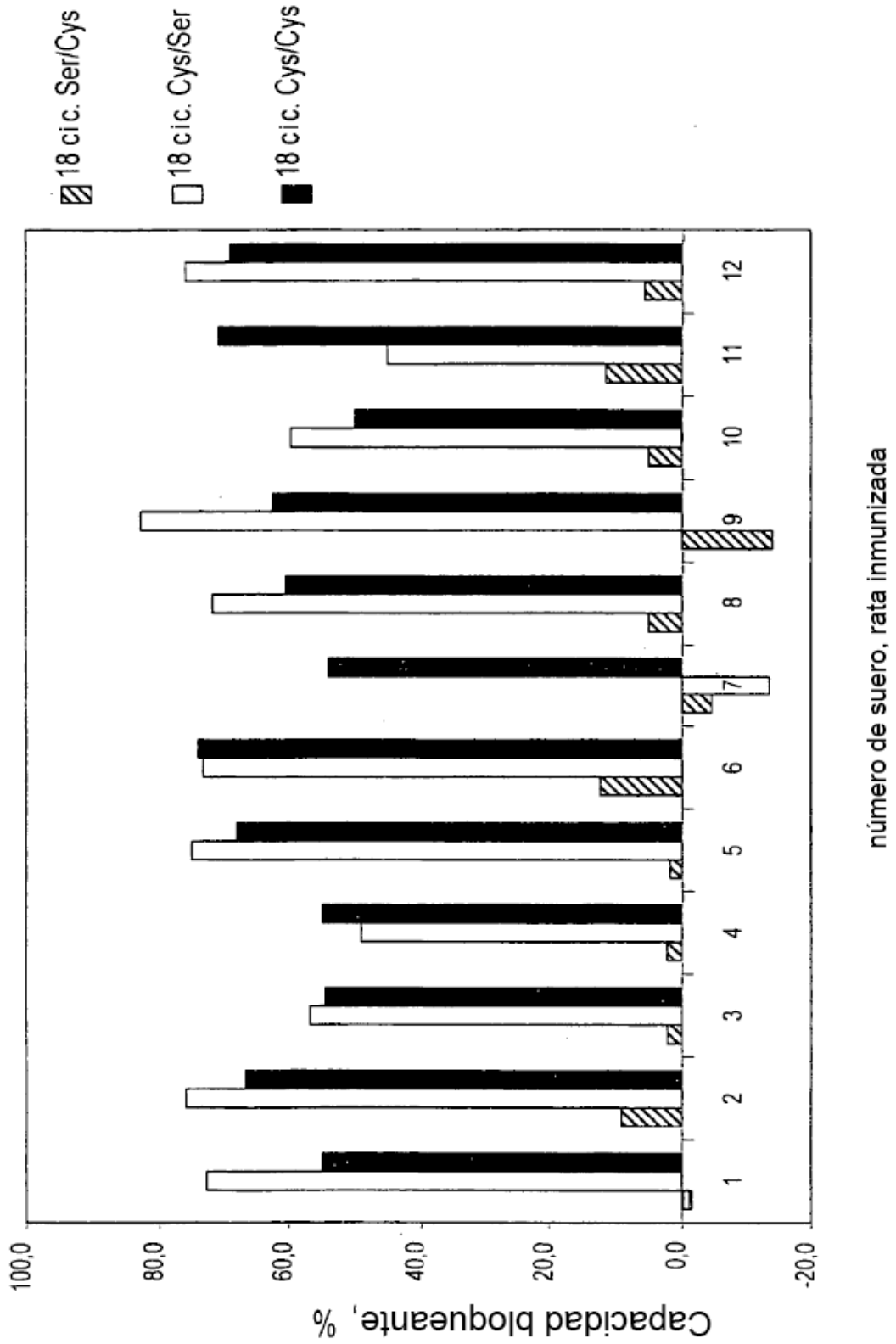
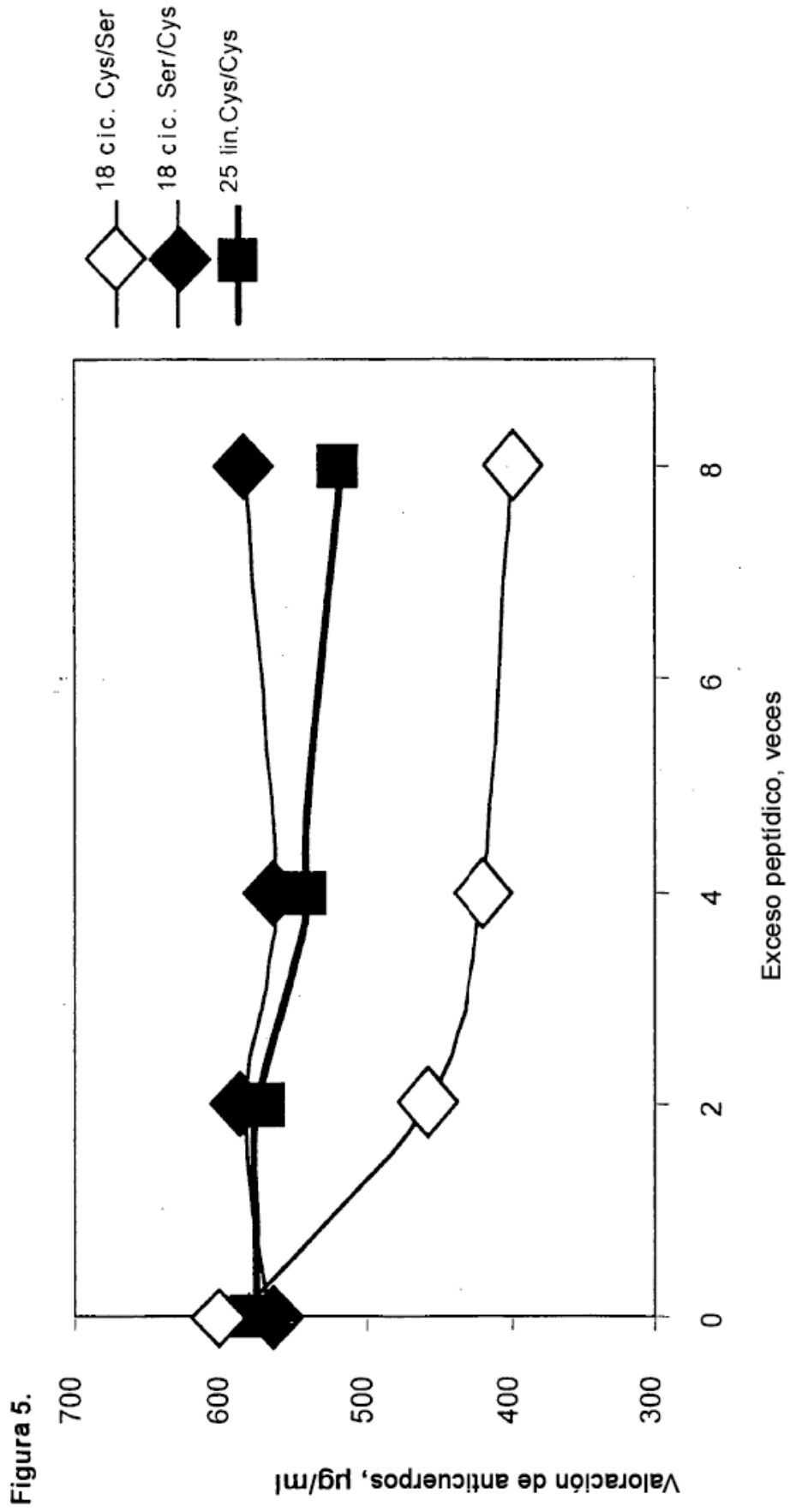


Figura 4.



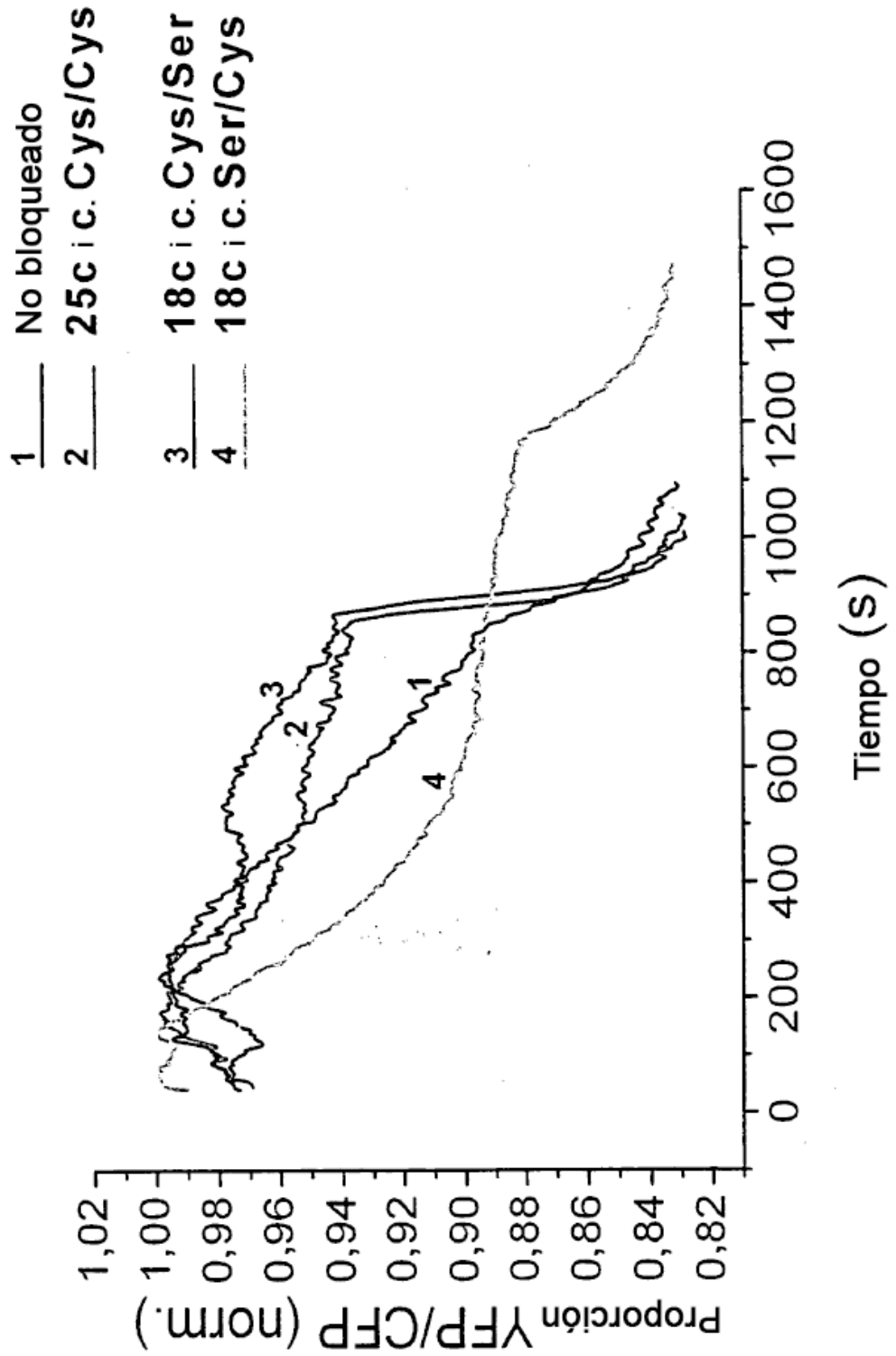


Figura 6.

Figura 7.

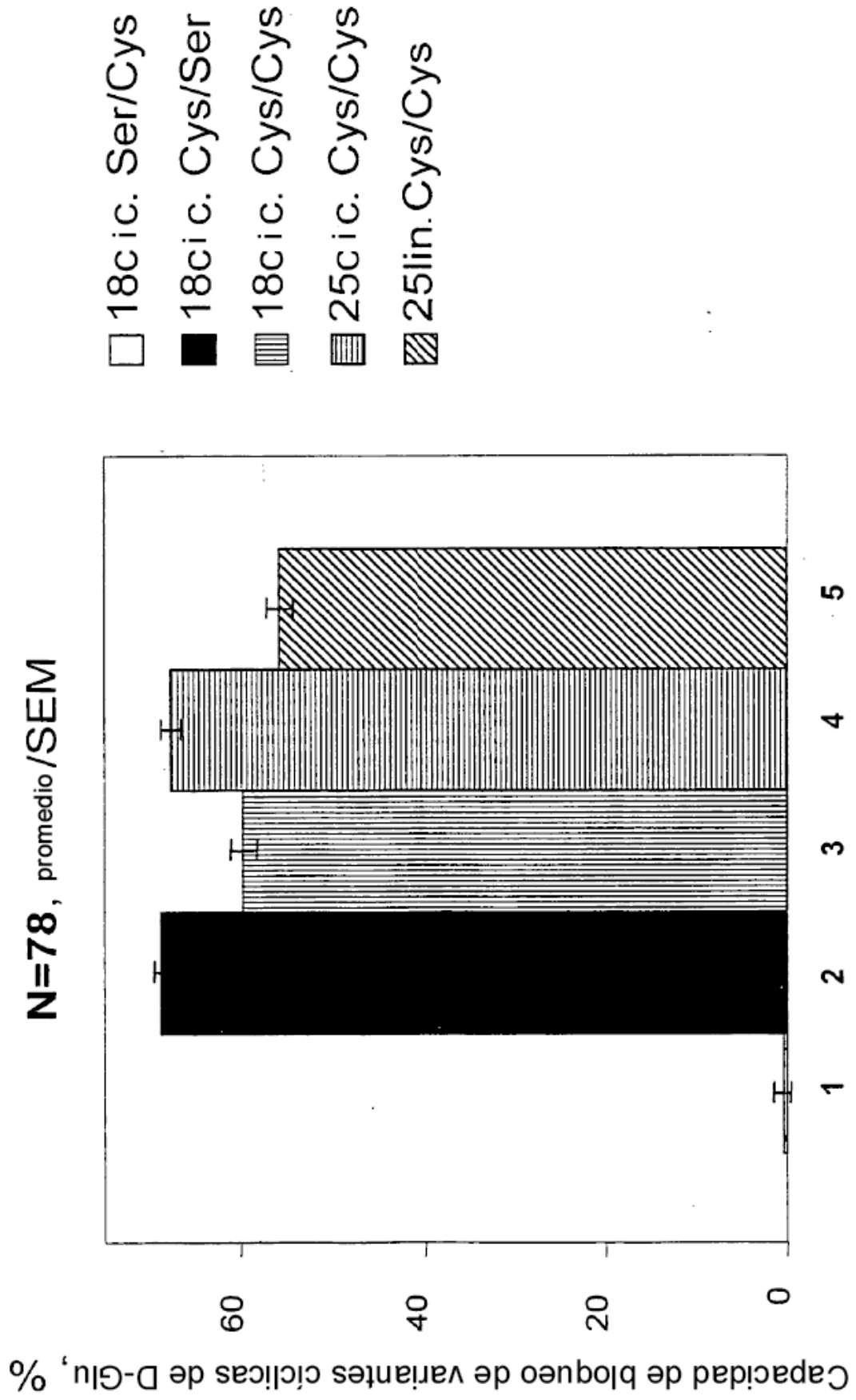
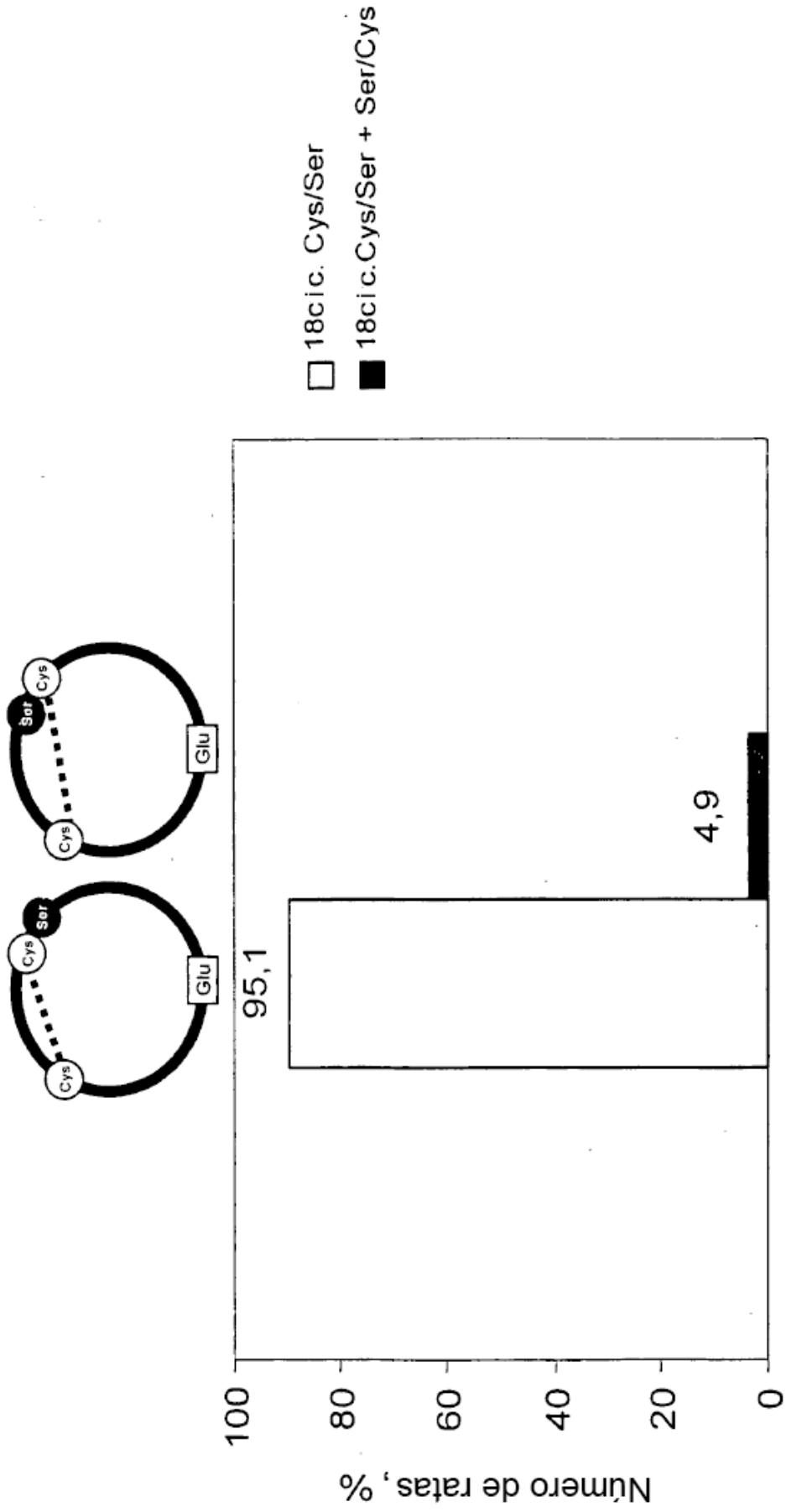


Figura 8.



Capacidad de bloqueo de variantes de 18AS EC_{II}-CP_{D-Glu}

Figura 9.

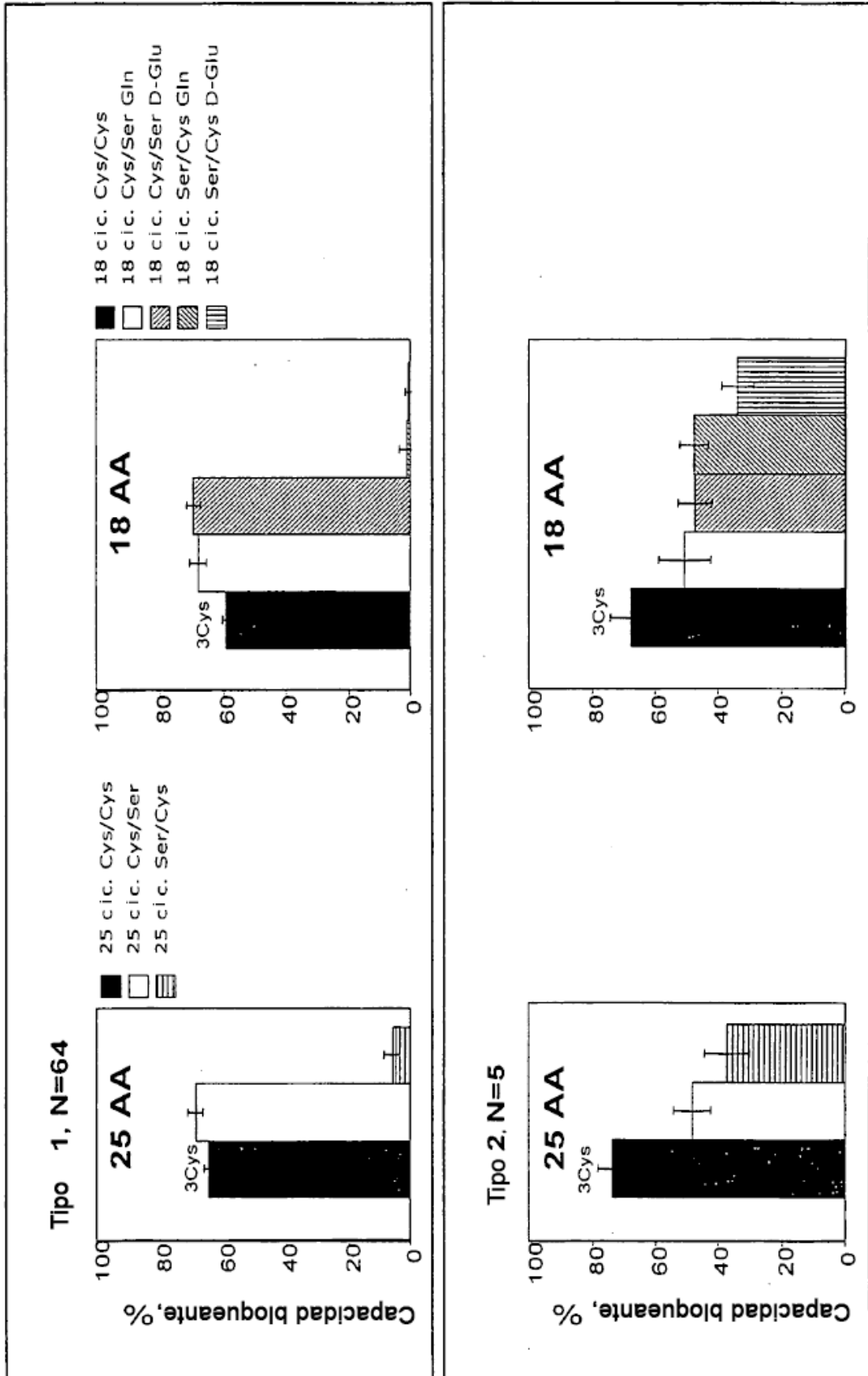
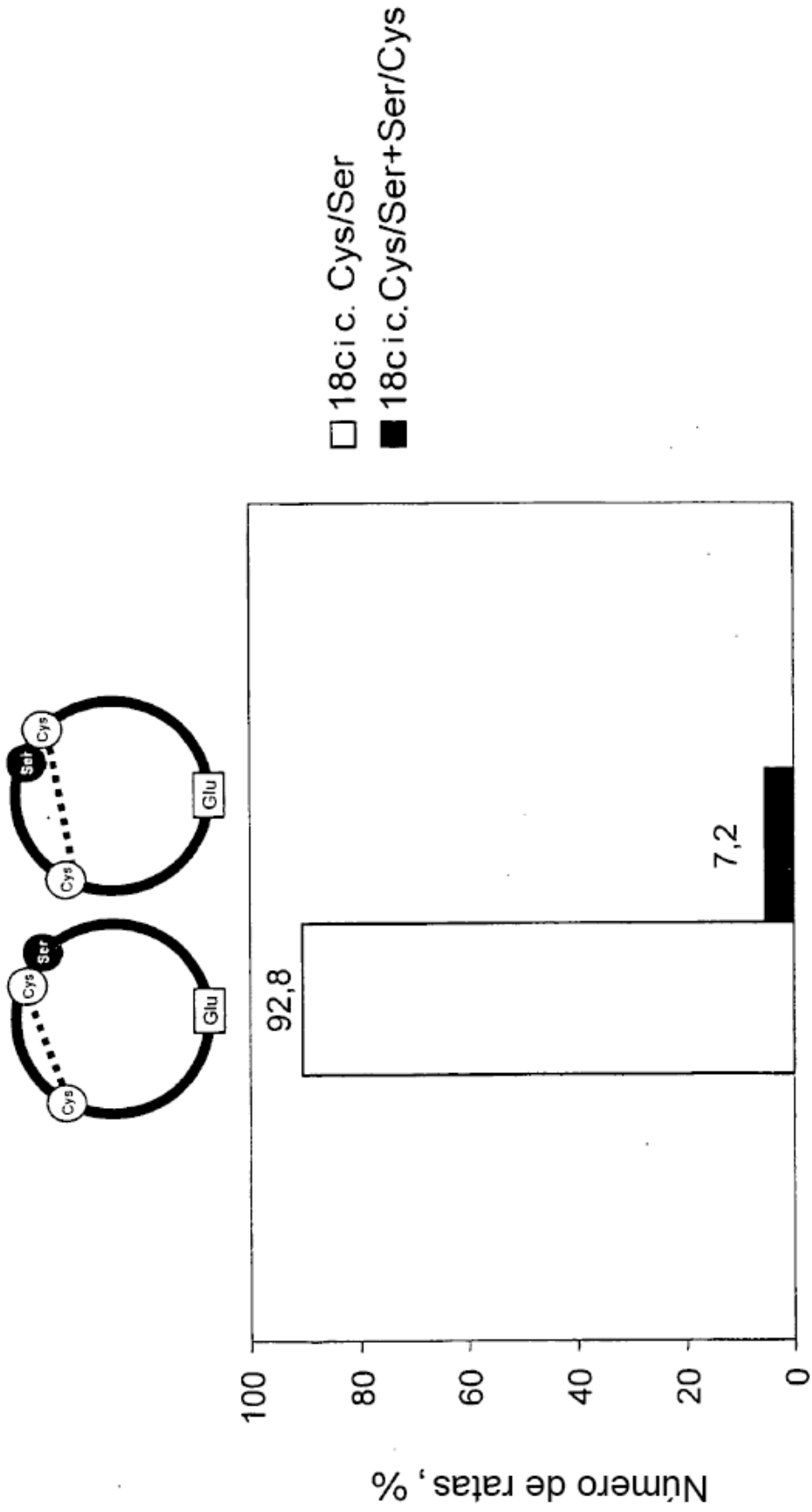


Figura 10.



Capacidad de bloqueo de variantes de 18AS EC_{II}-CP_{D-Glu}

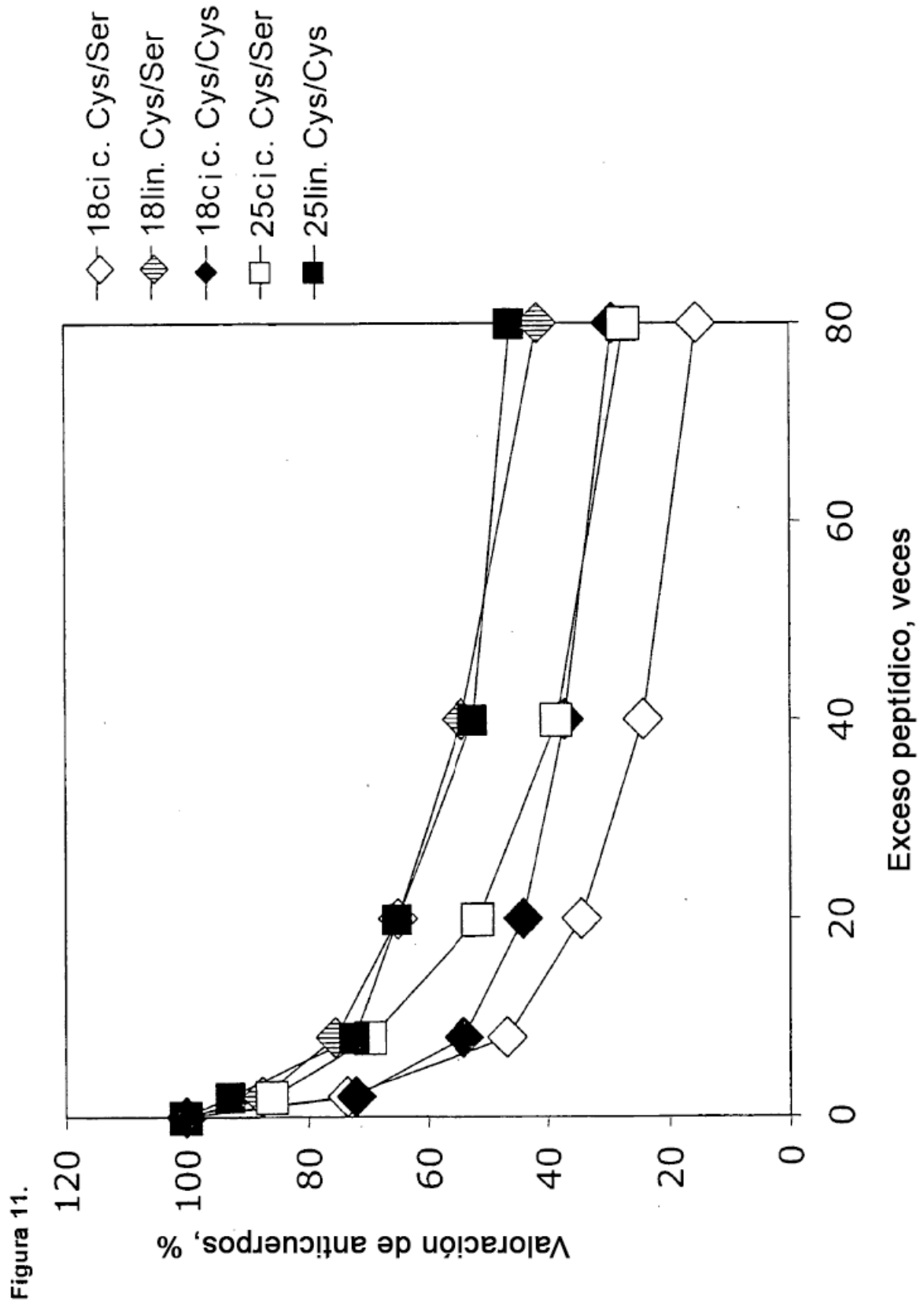
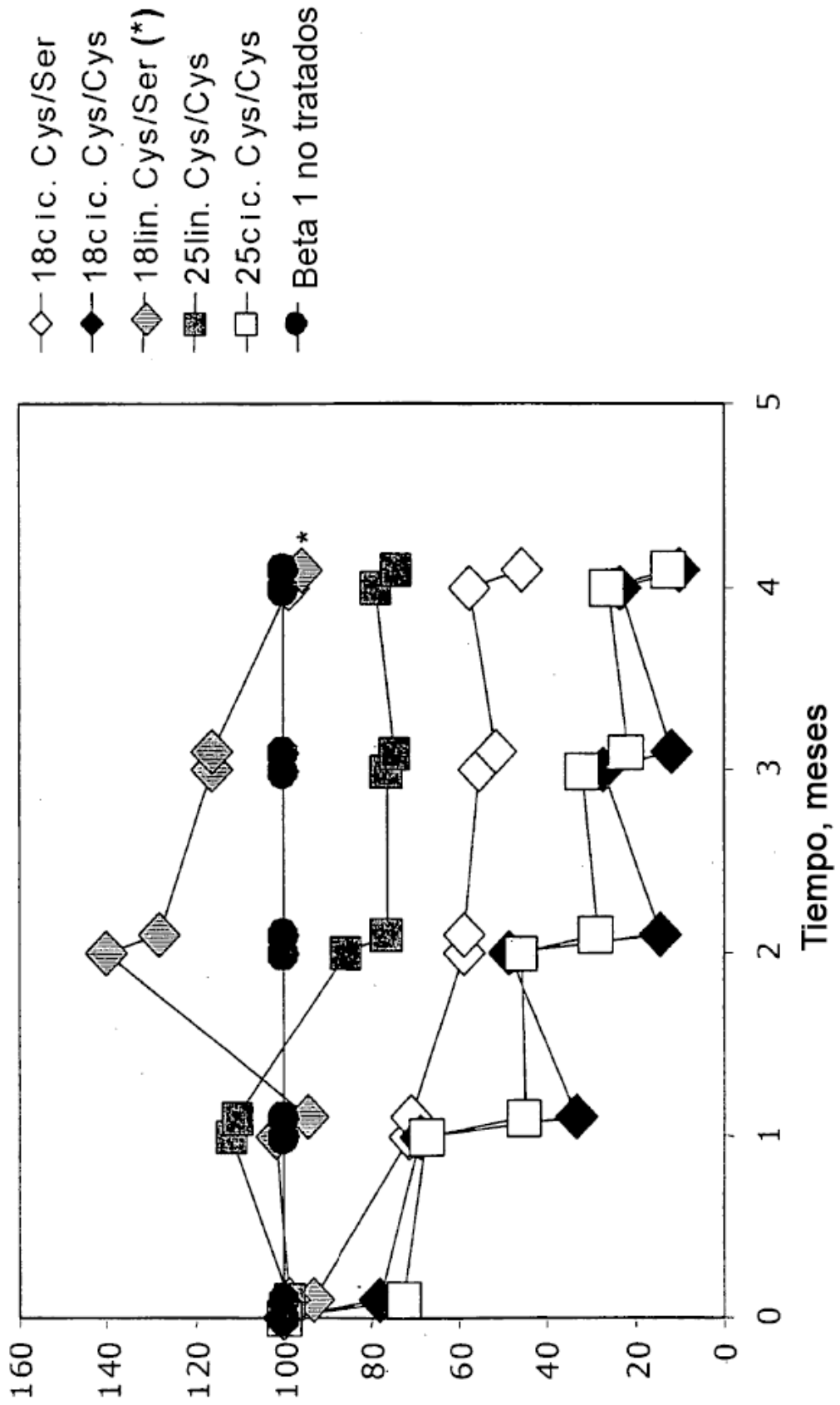


Figura 12.

Curso de inmunorreactividad de ELISA, % de ratas inmunizadas no tratadas



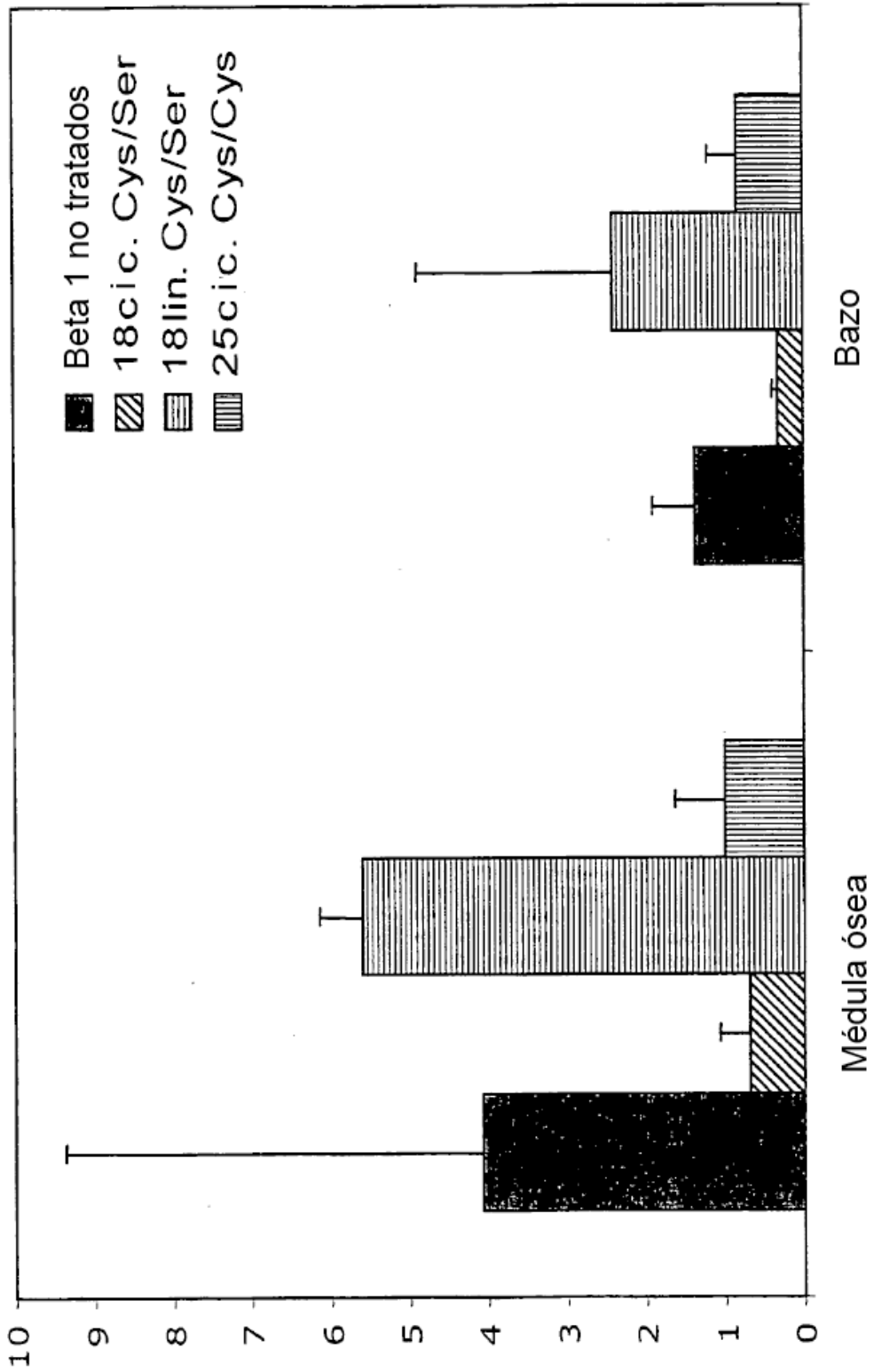


Figura 13. Células secretoras de anticuerpos (IgG) específicos de Beta1-FCII/10⁵ células

Figura 14.

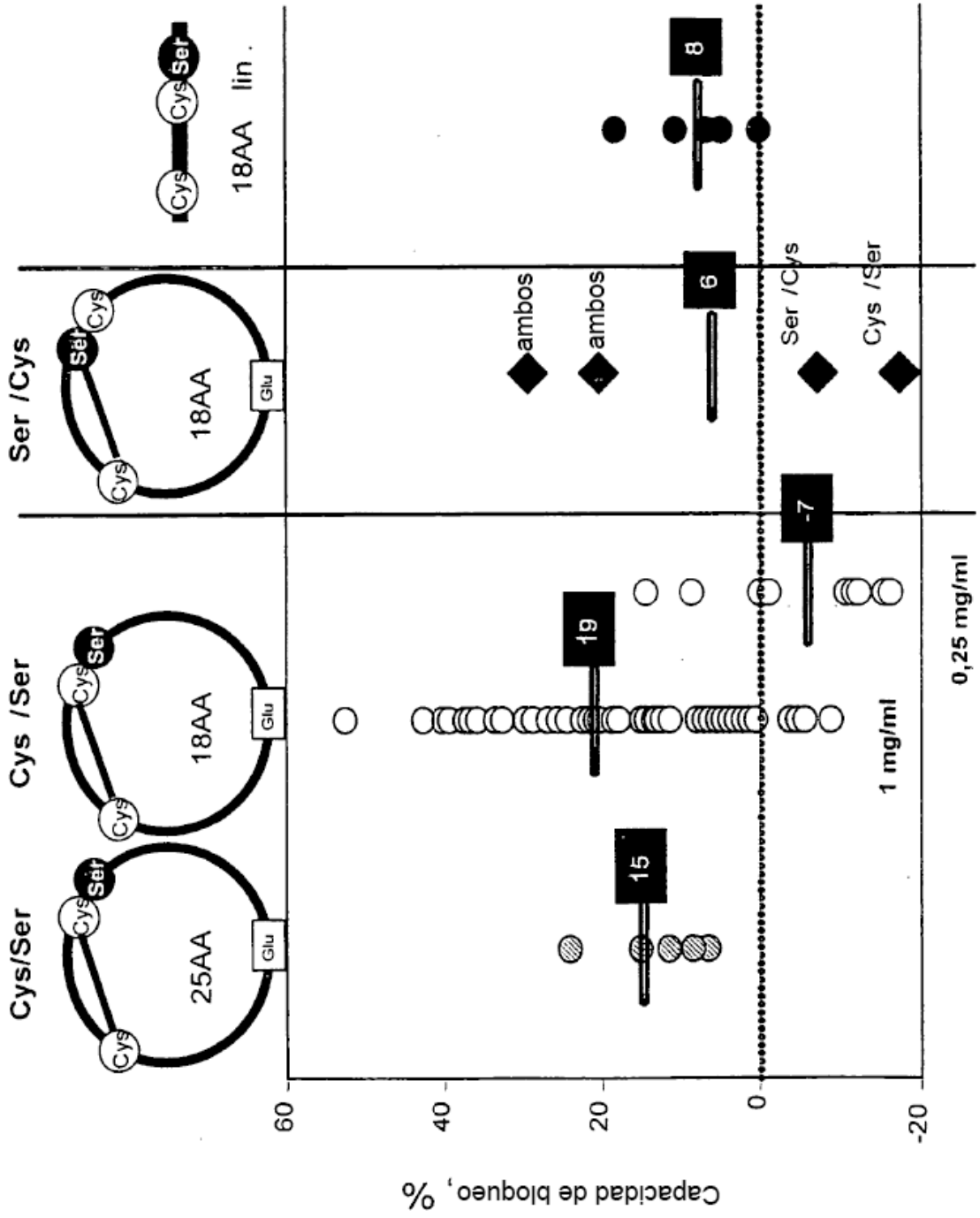
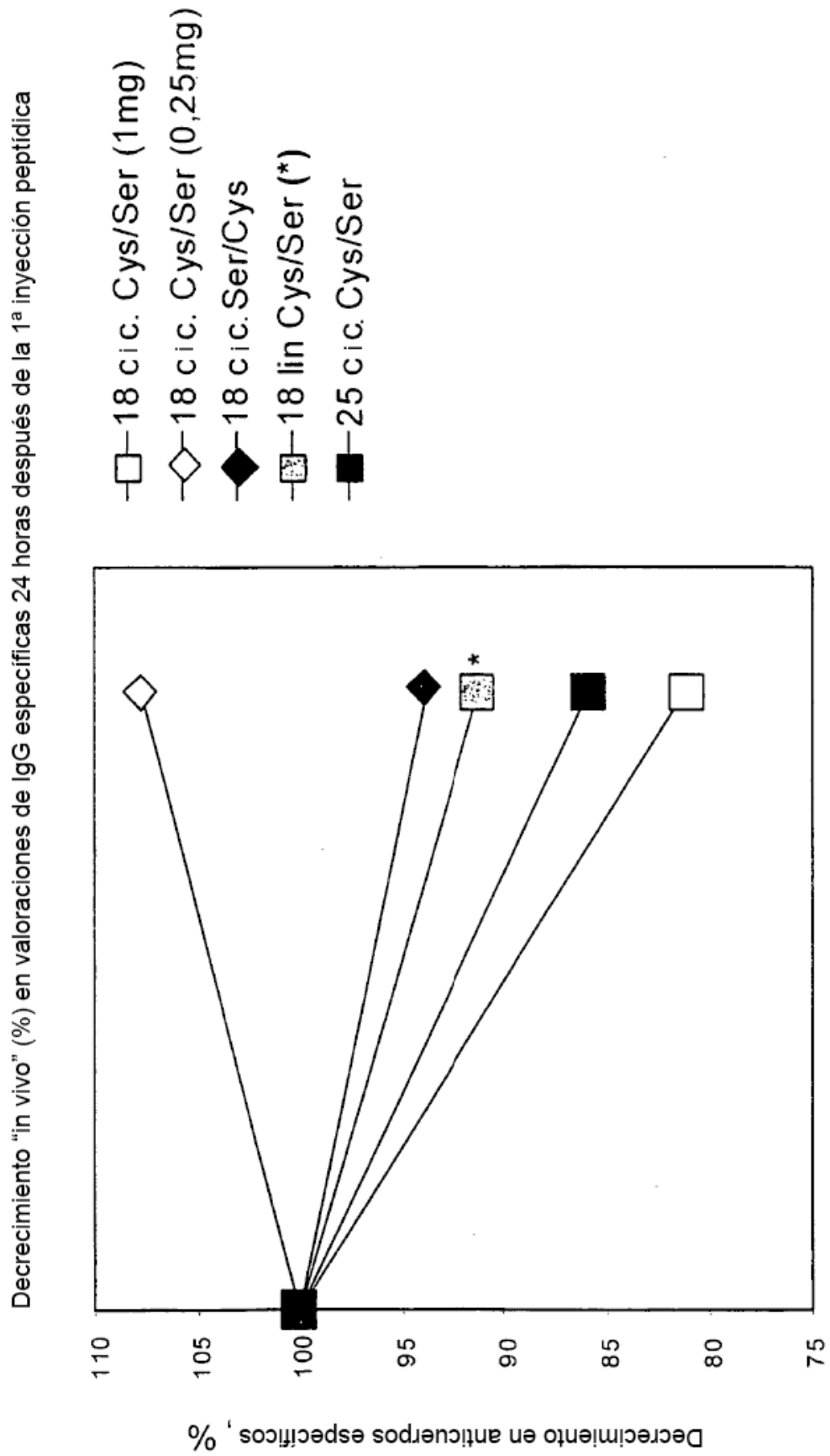


Figura 15.



Curso de inmunorreactividad de ELISA, % de valor de partida

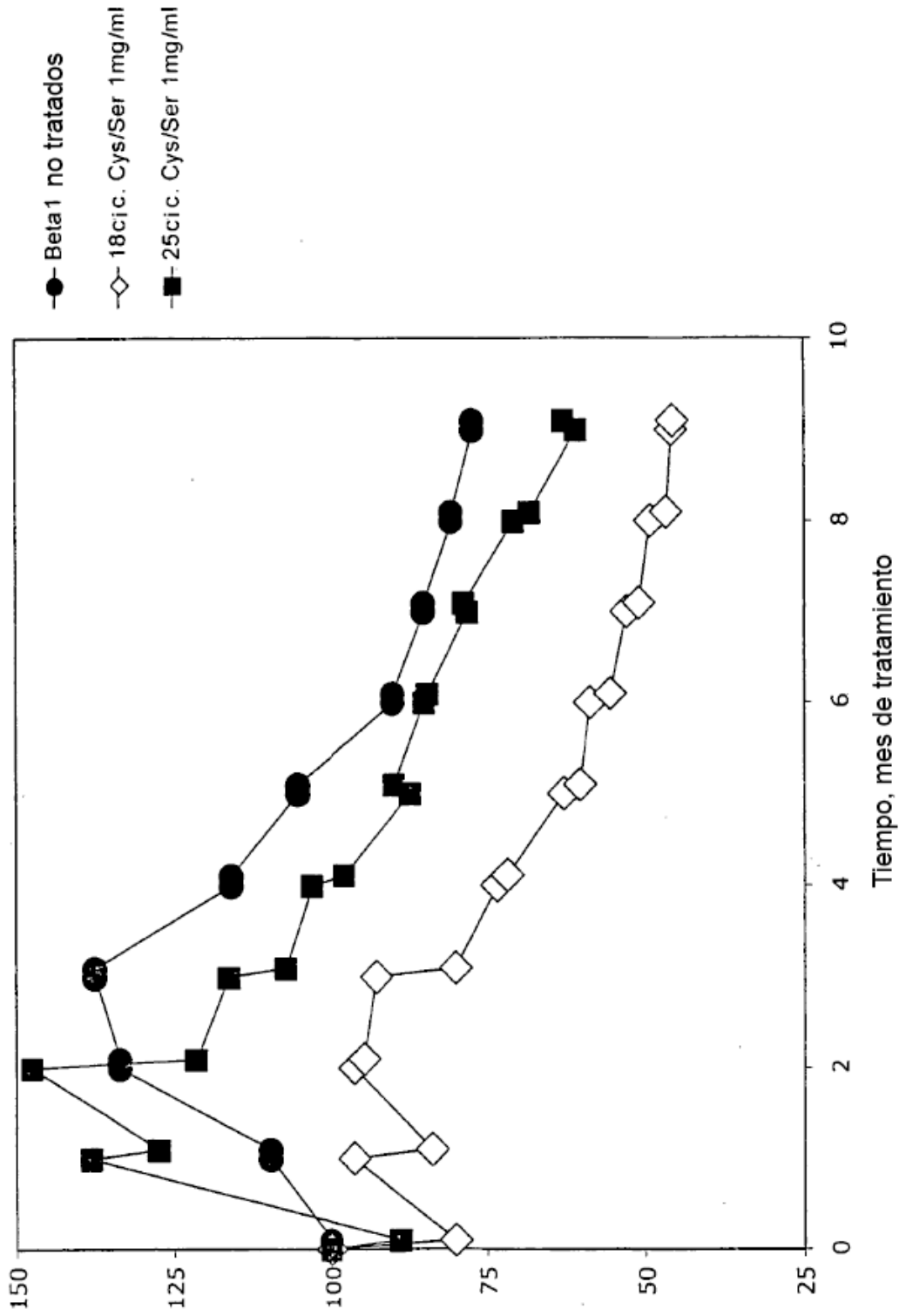


Figura 16.A

Figura 16.B

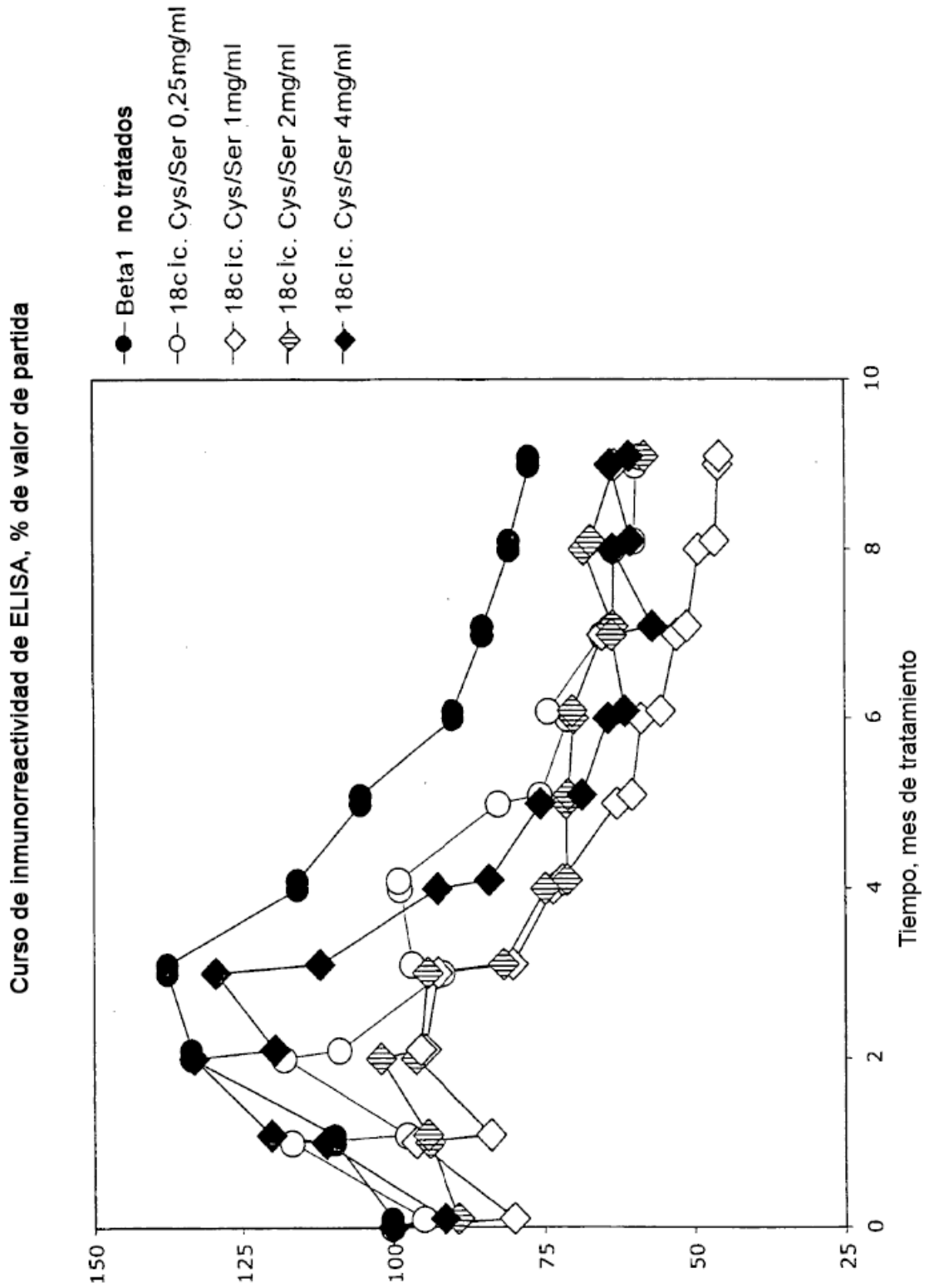


Figura 16.C

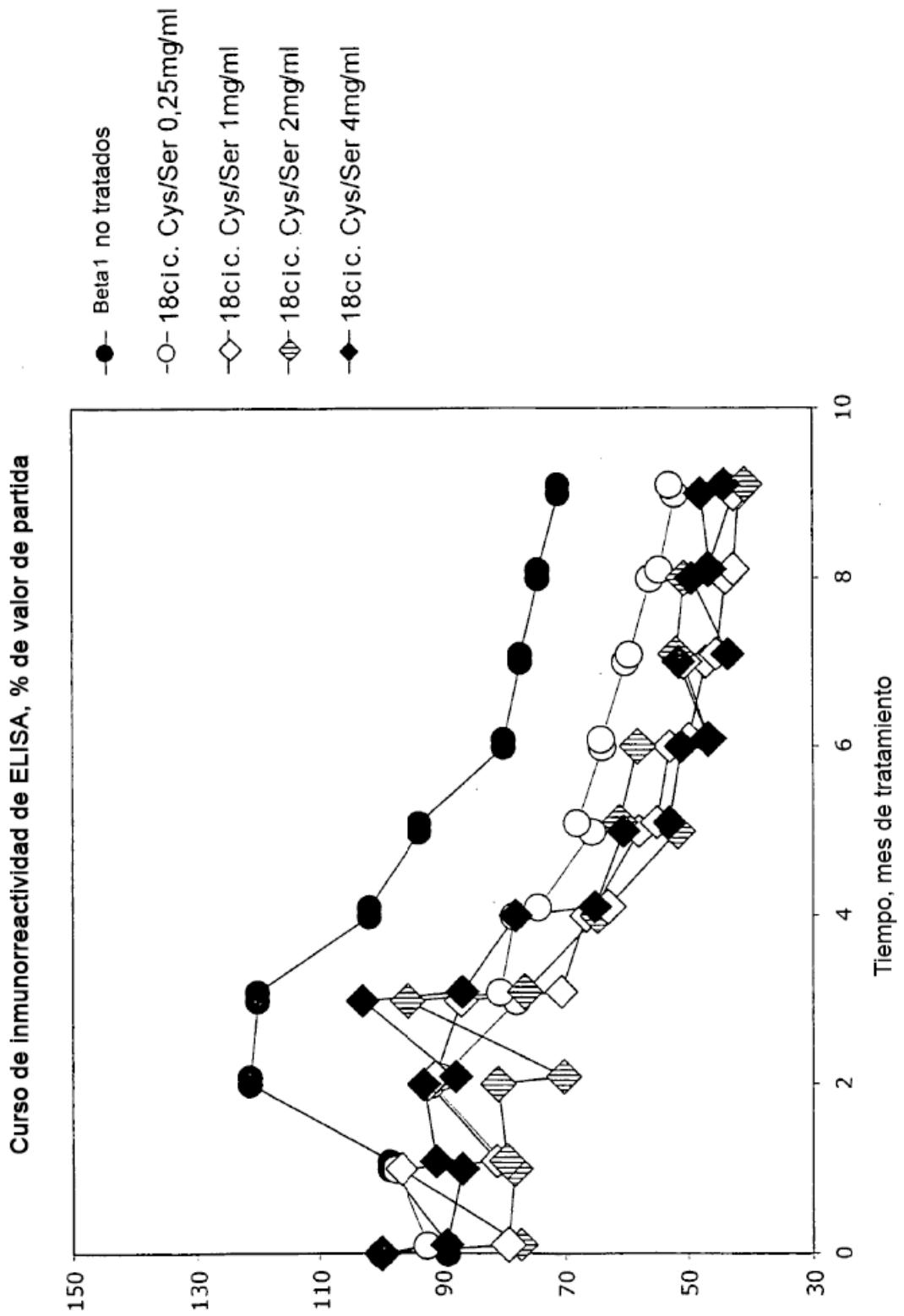


Figura 17. A

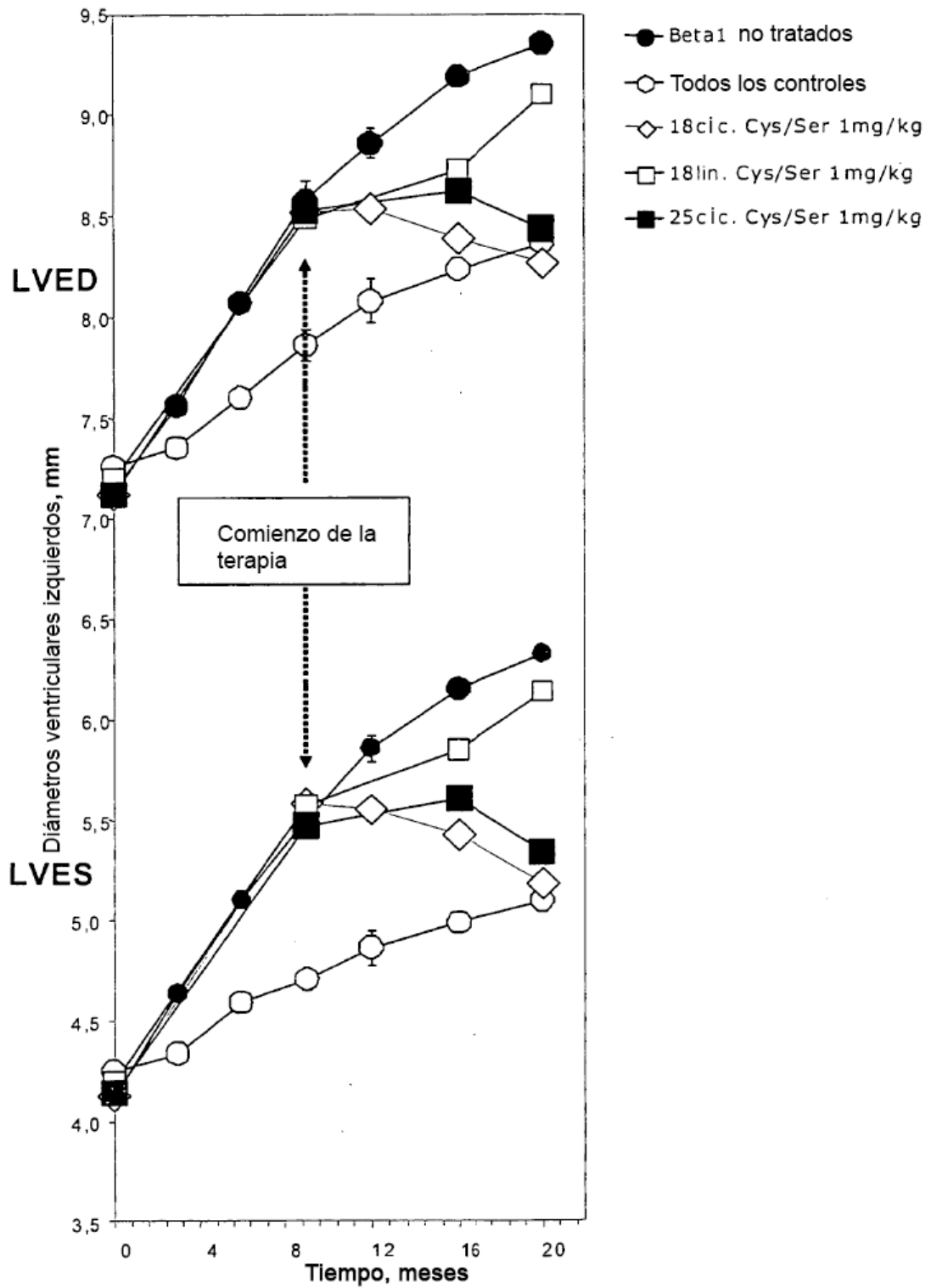
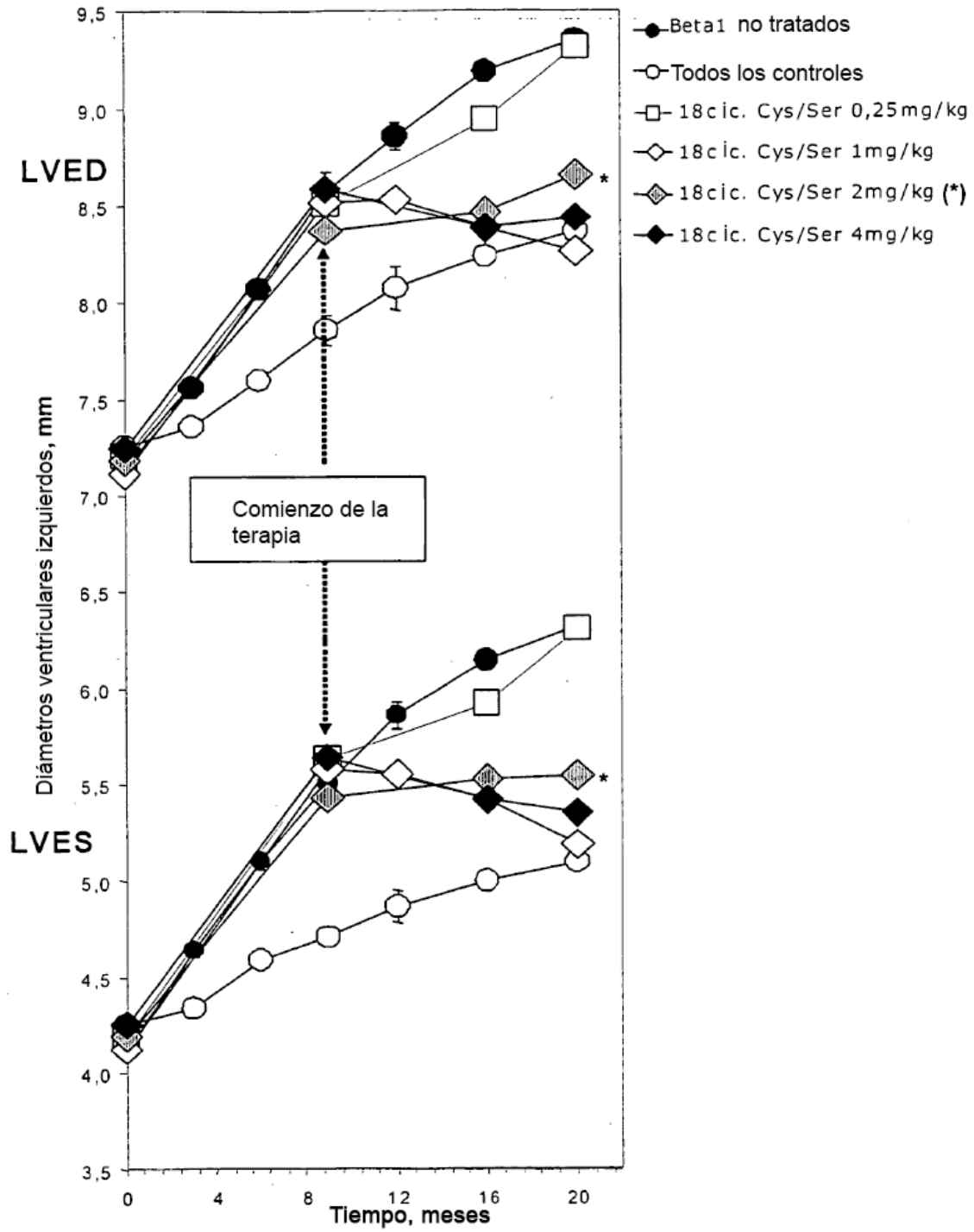


Figura 17. B



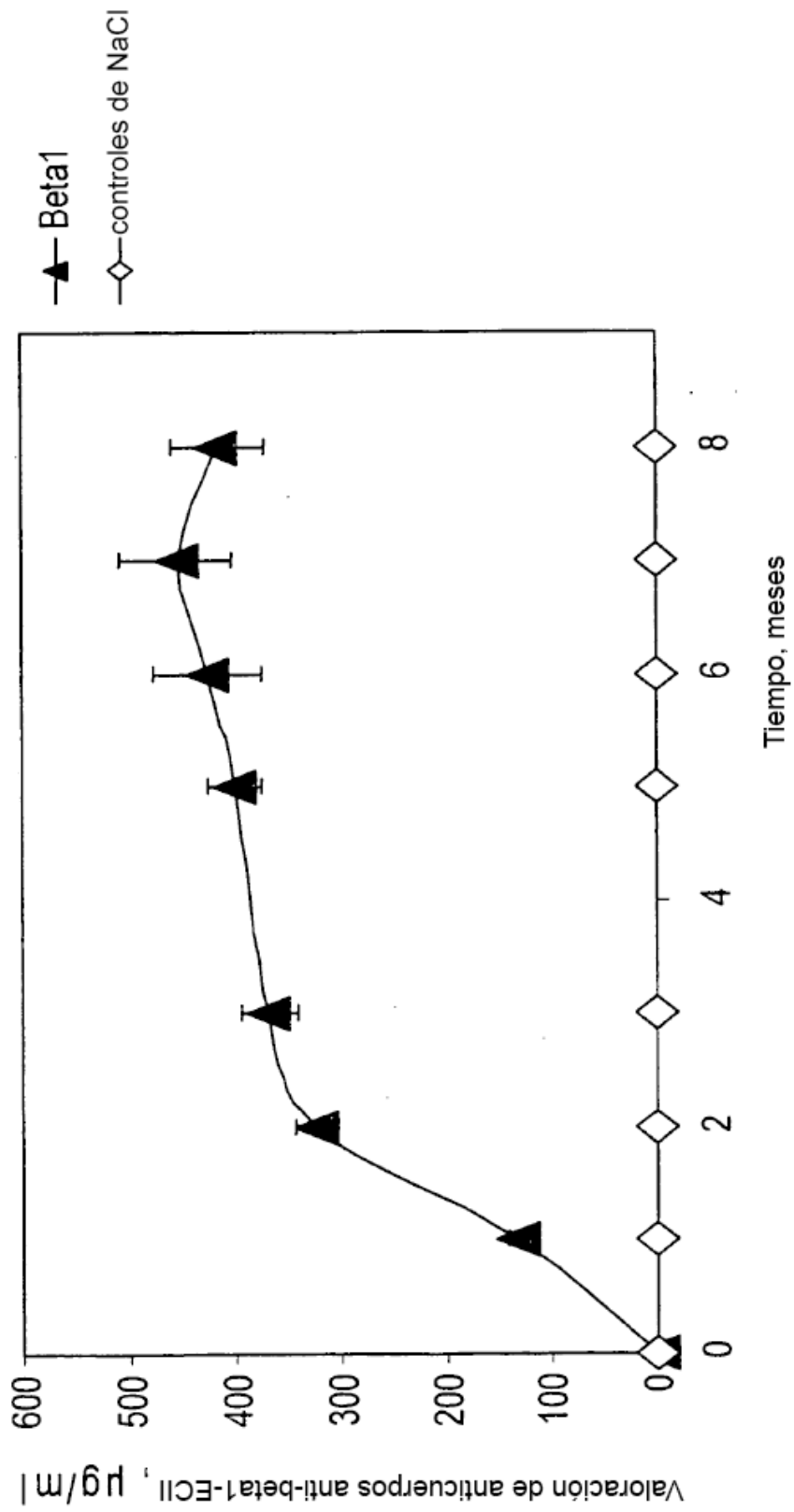


Figura 18.

Figura 19.

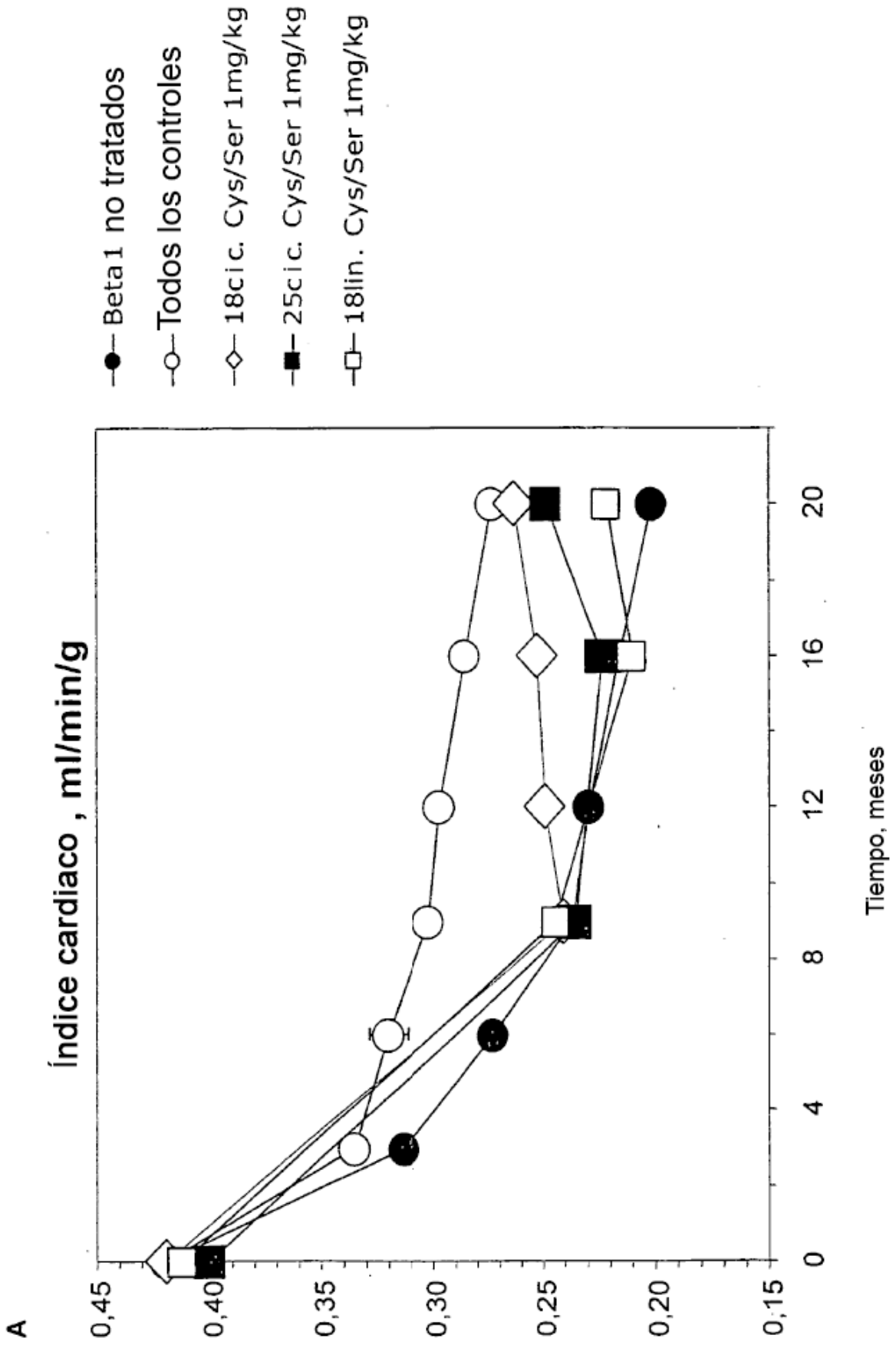


Figura 19

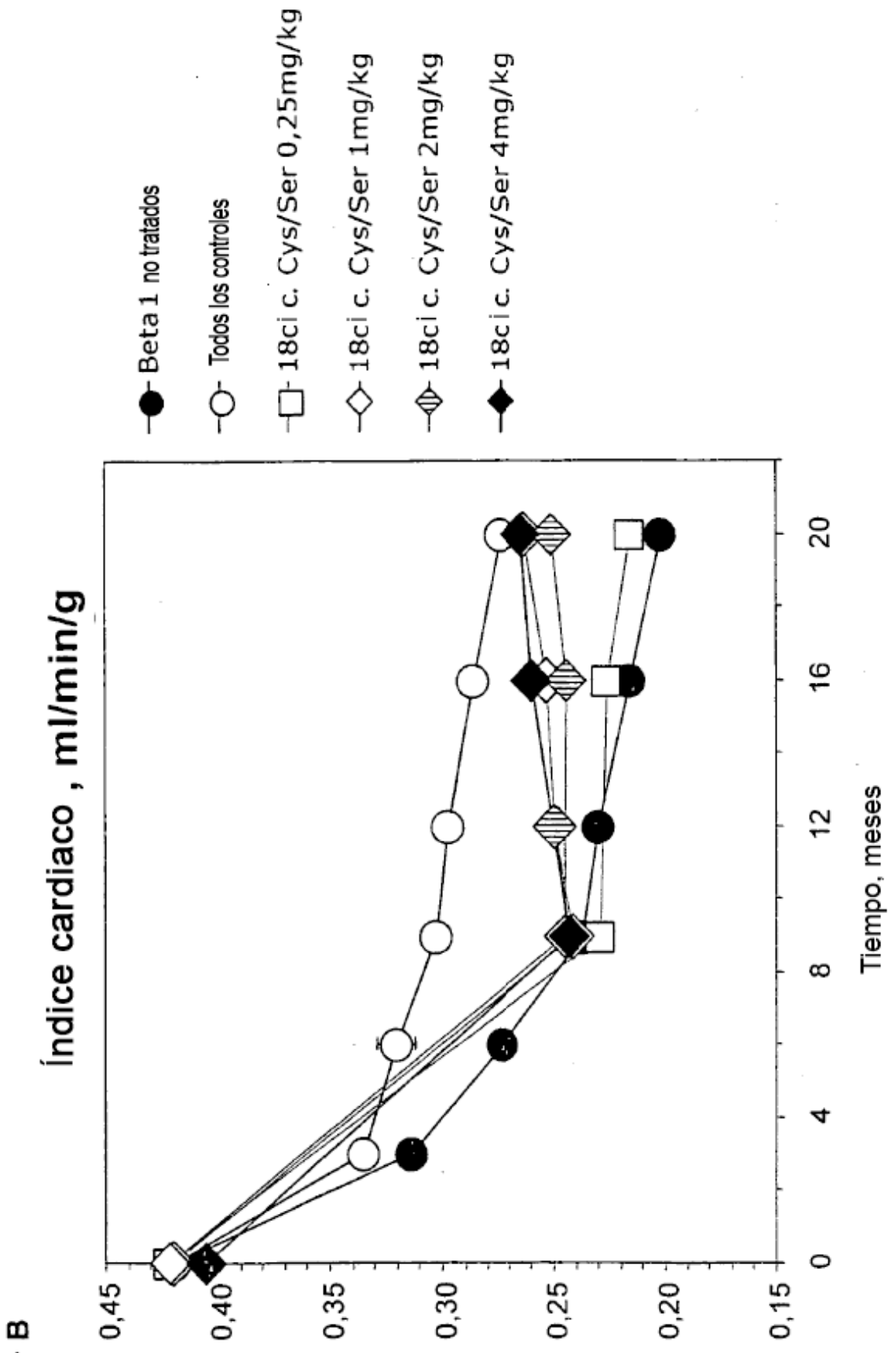


Figura 20 A

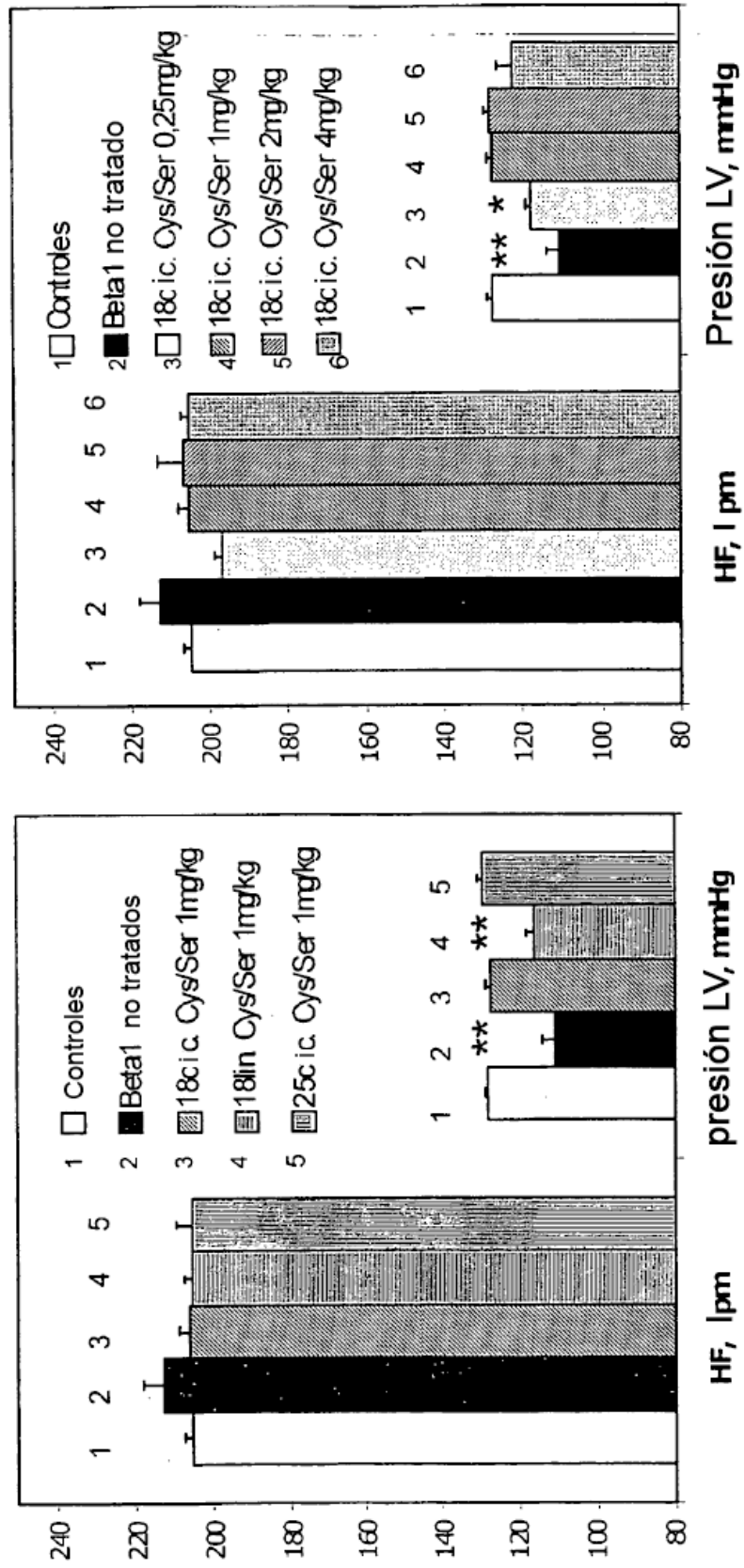


Figura 20B

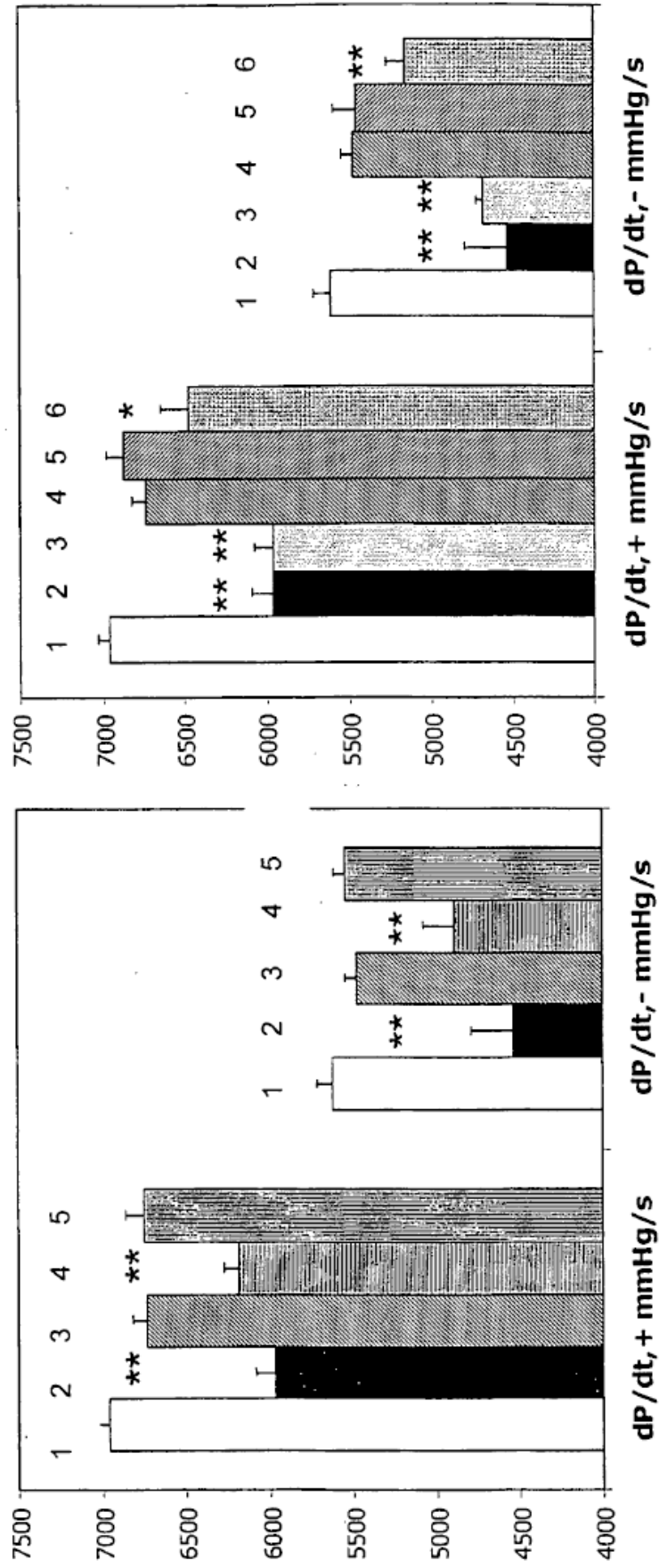


Figura 20C

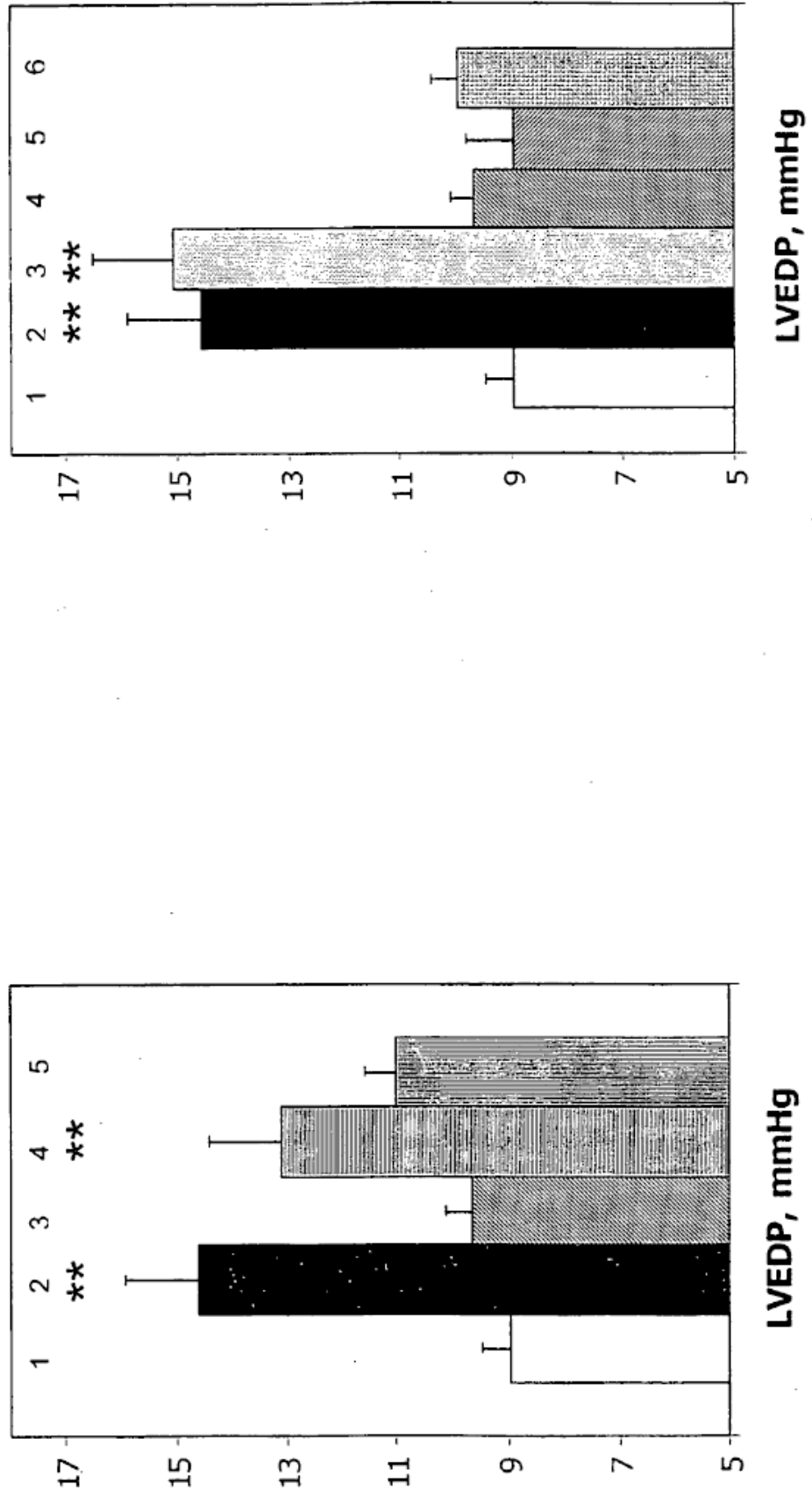


Figura 21A.

Peso relativo de órganos, g/kg de peso corporal

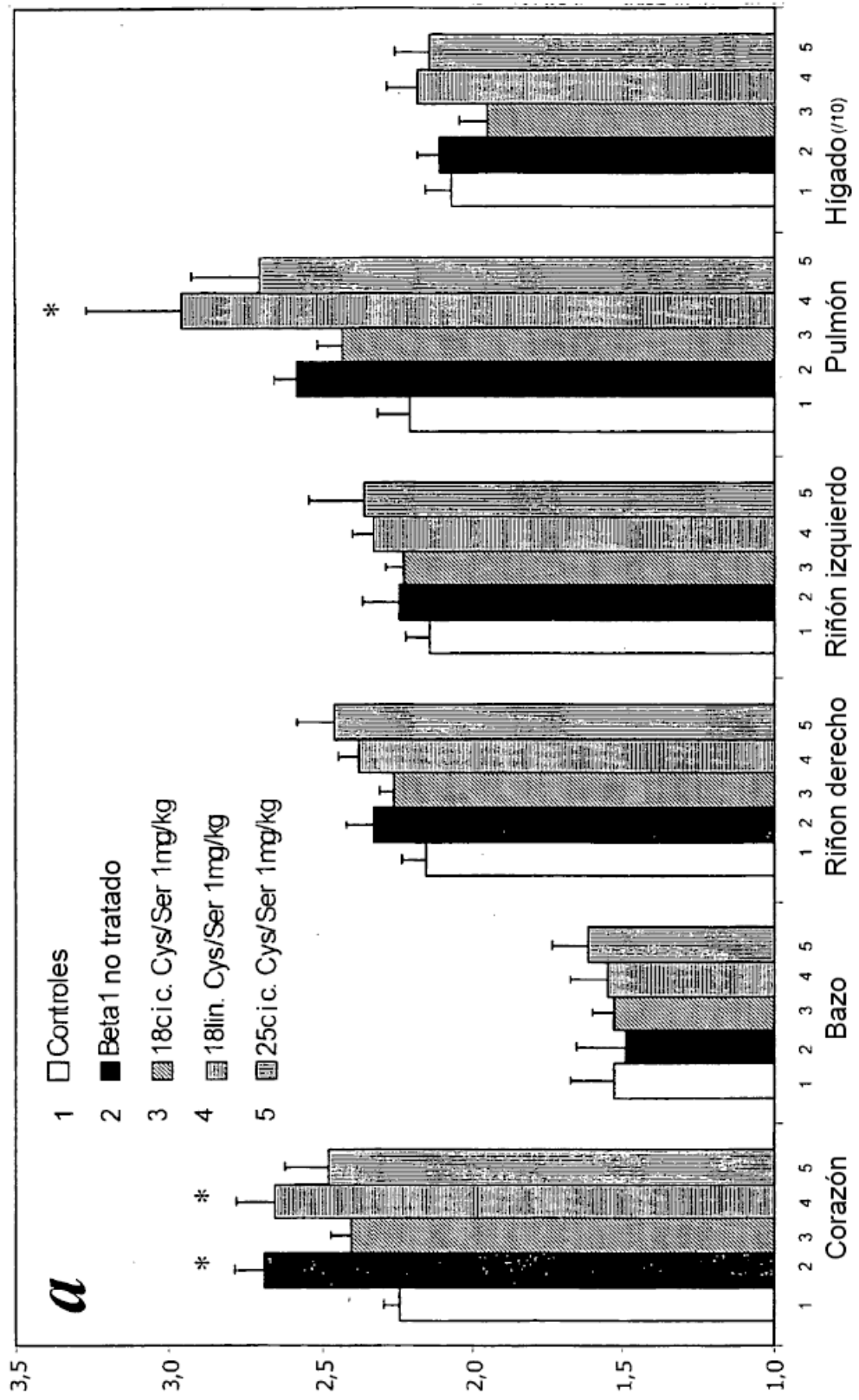
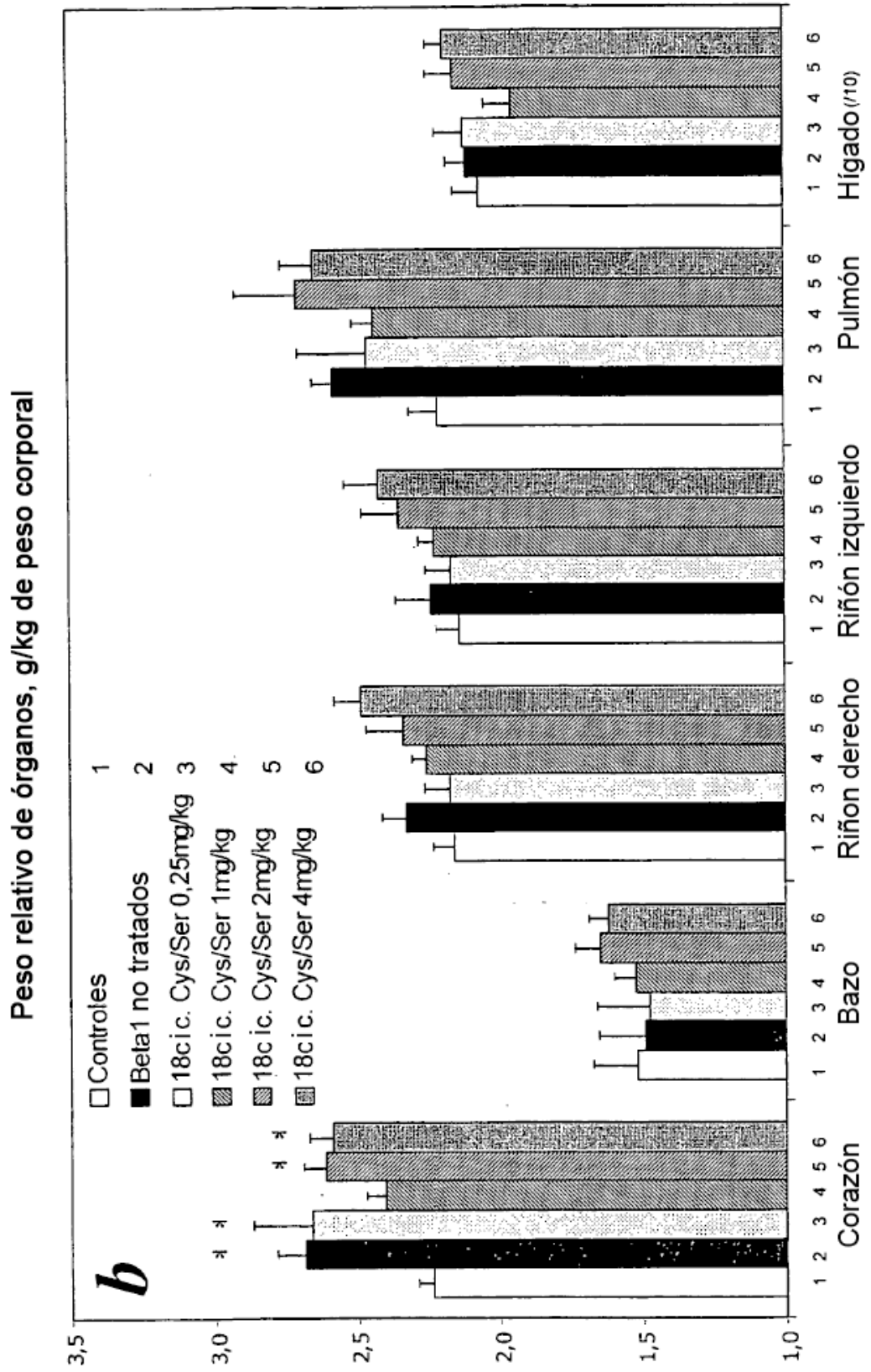


Figura 21B.



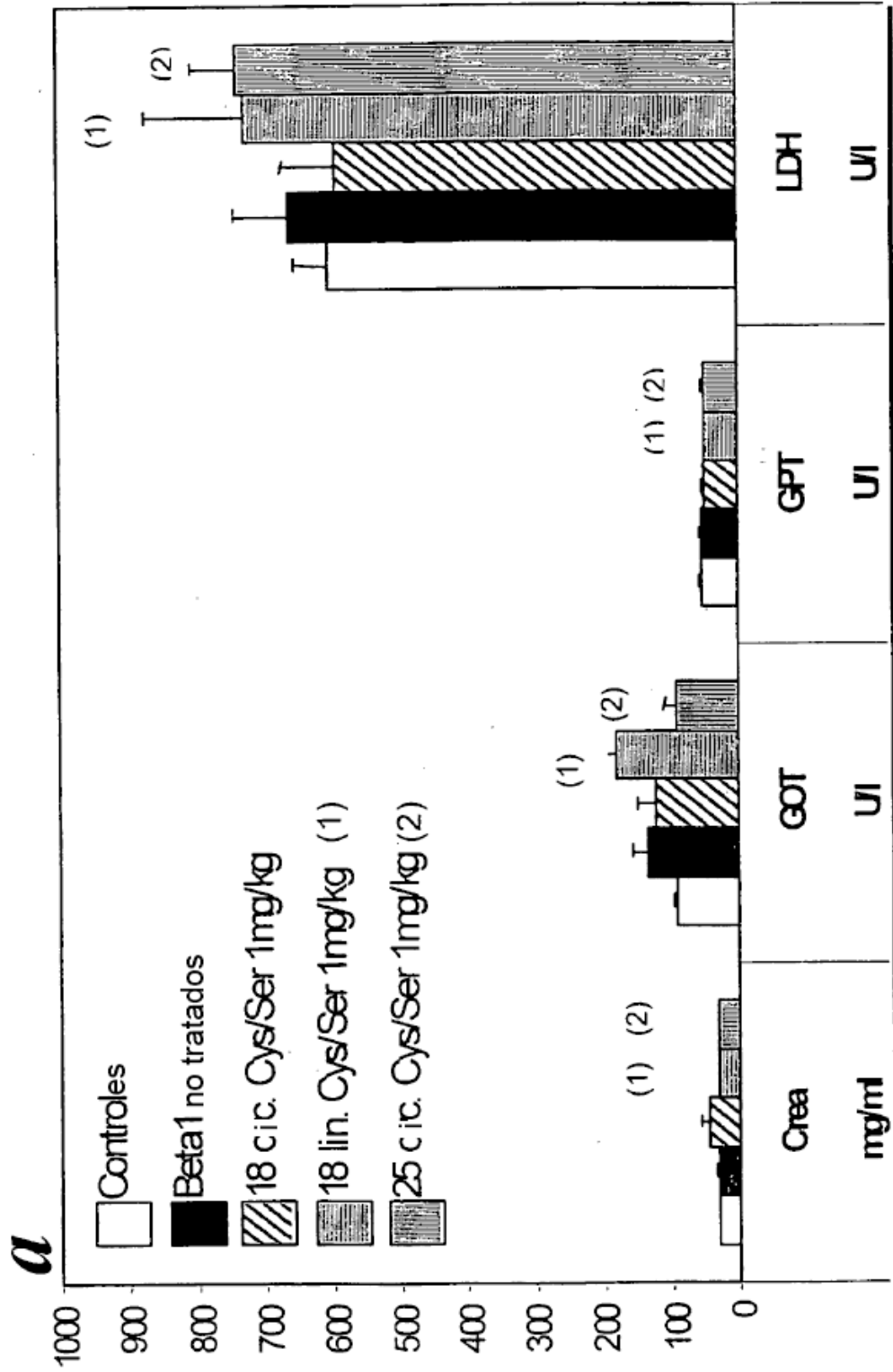
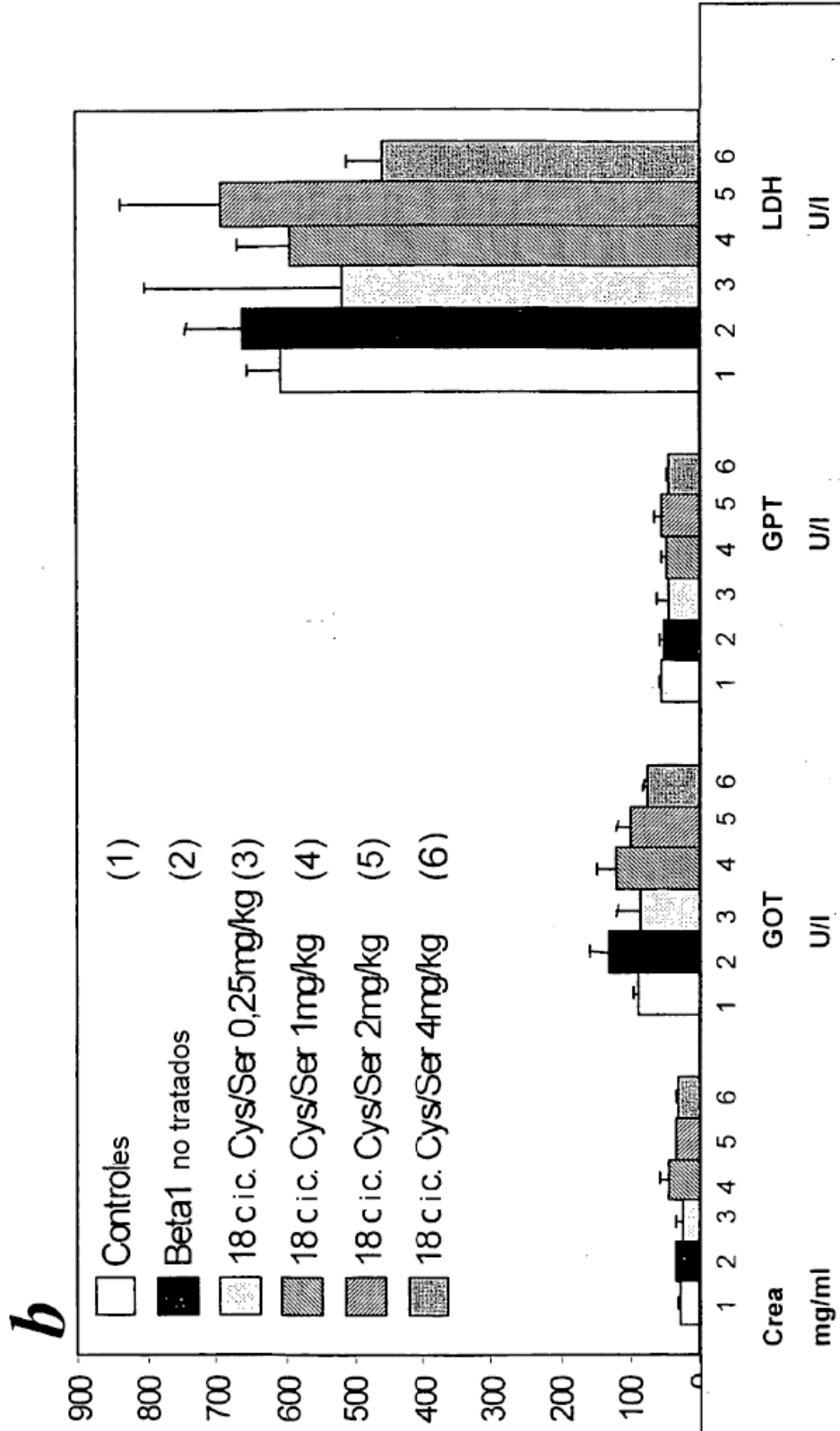


Figura 22A.

Figura 22B.



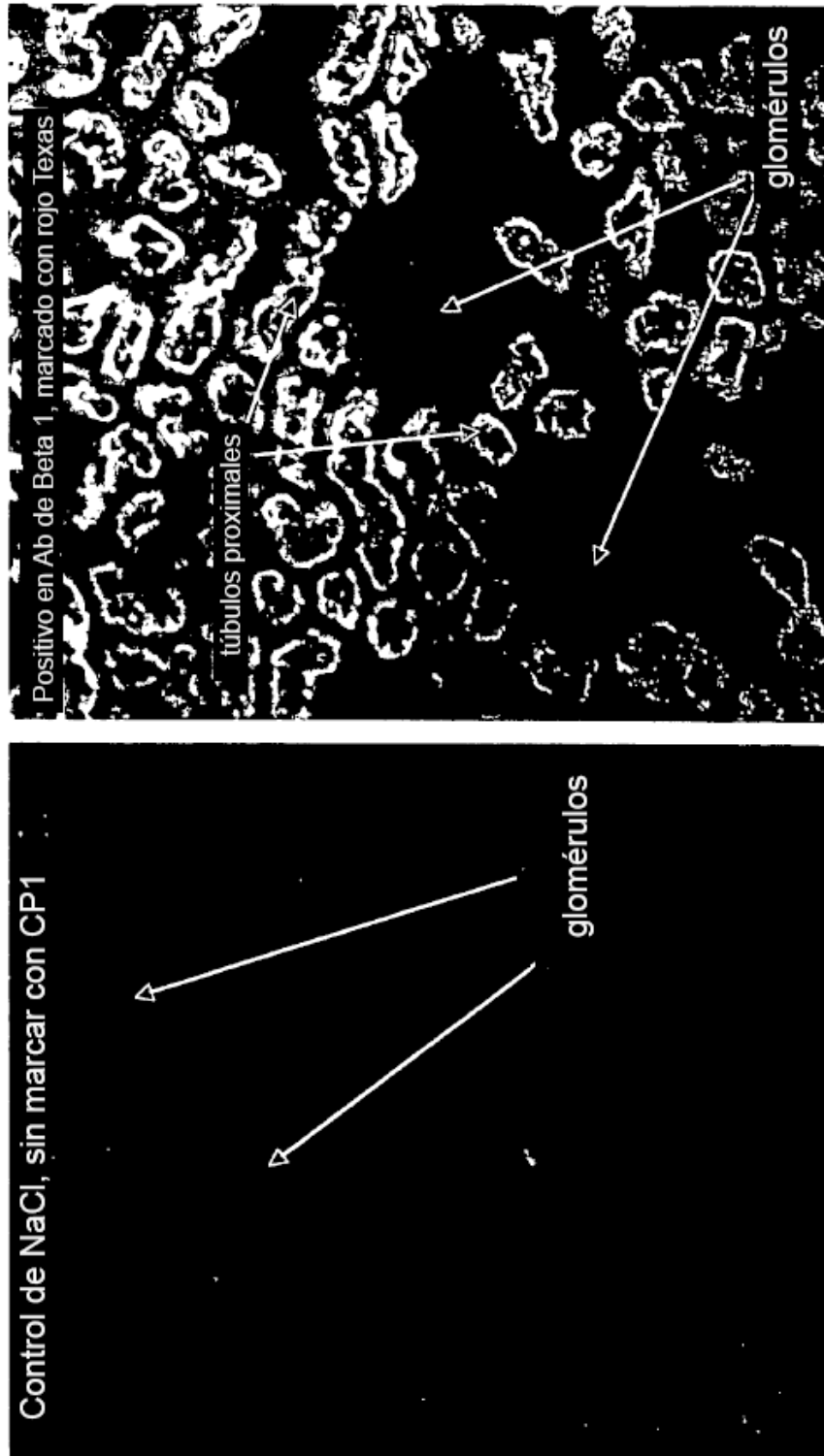
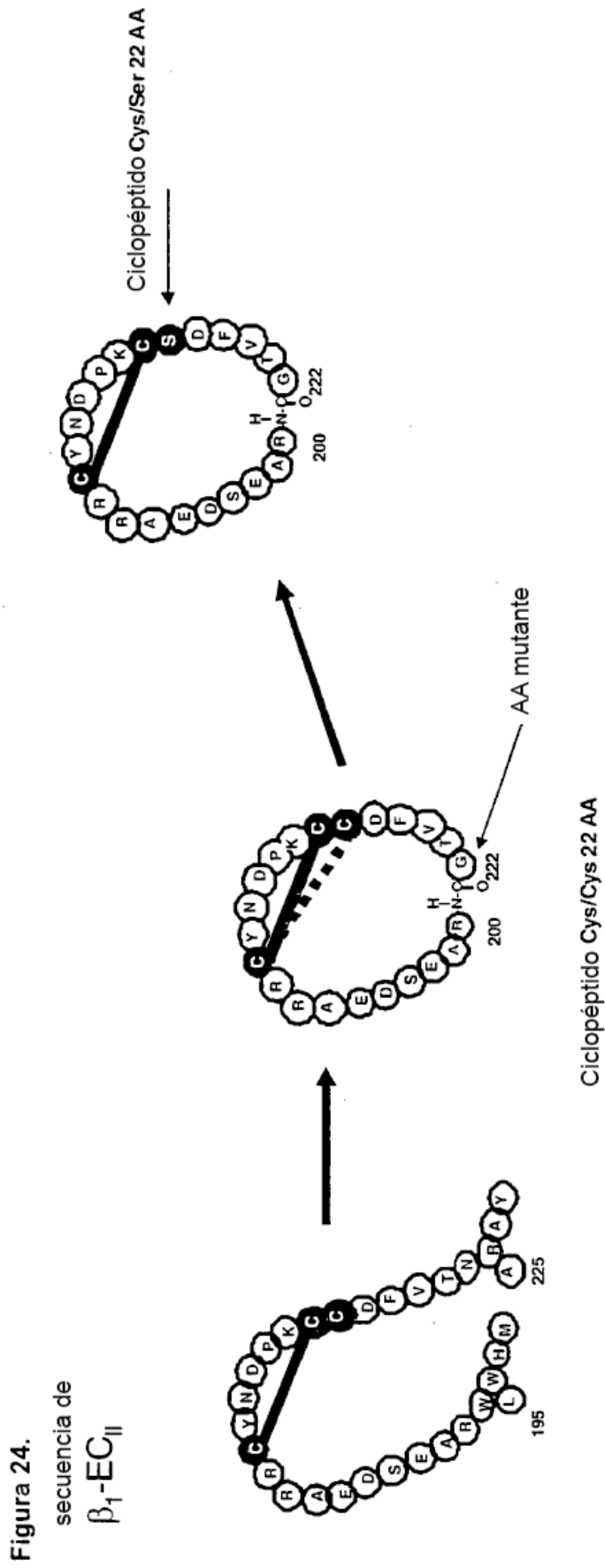


Figura 23.



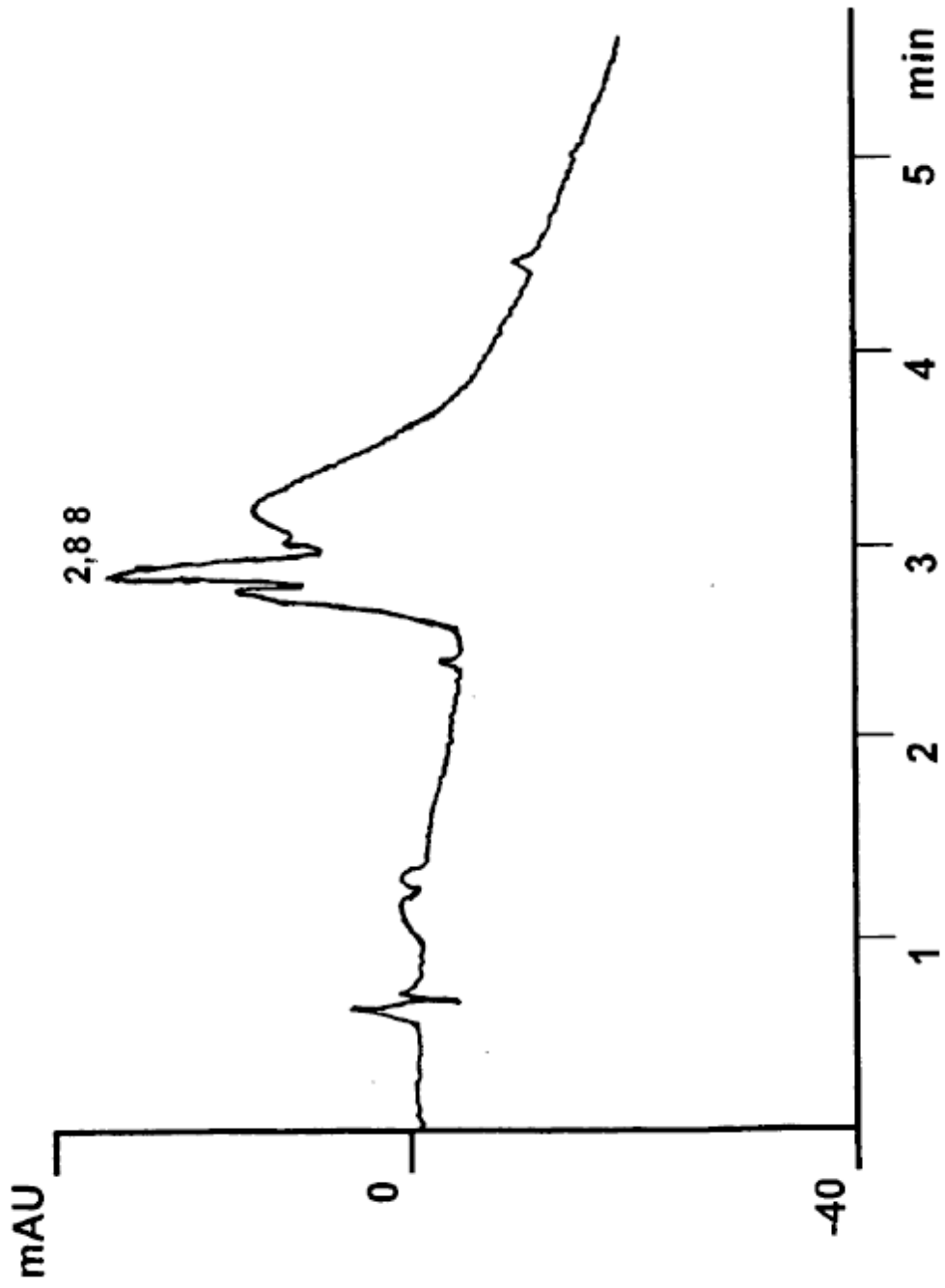


Figura 25A.

Figura 25B.

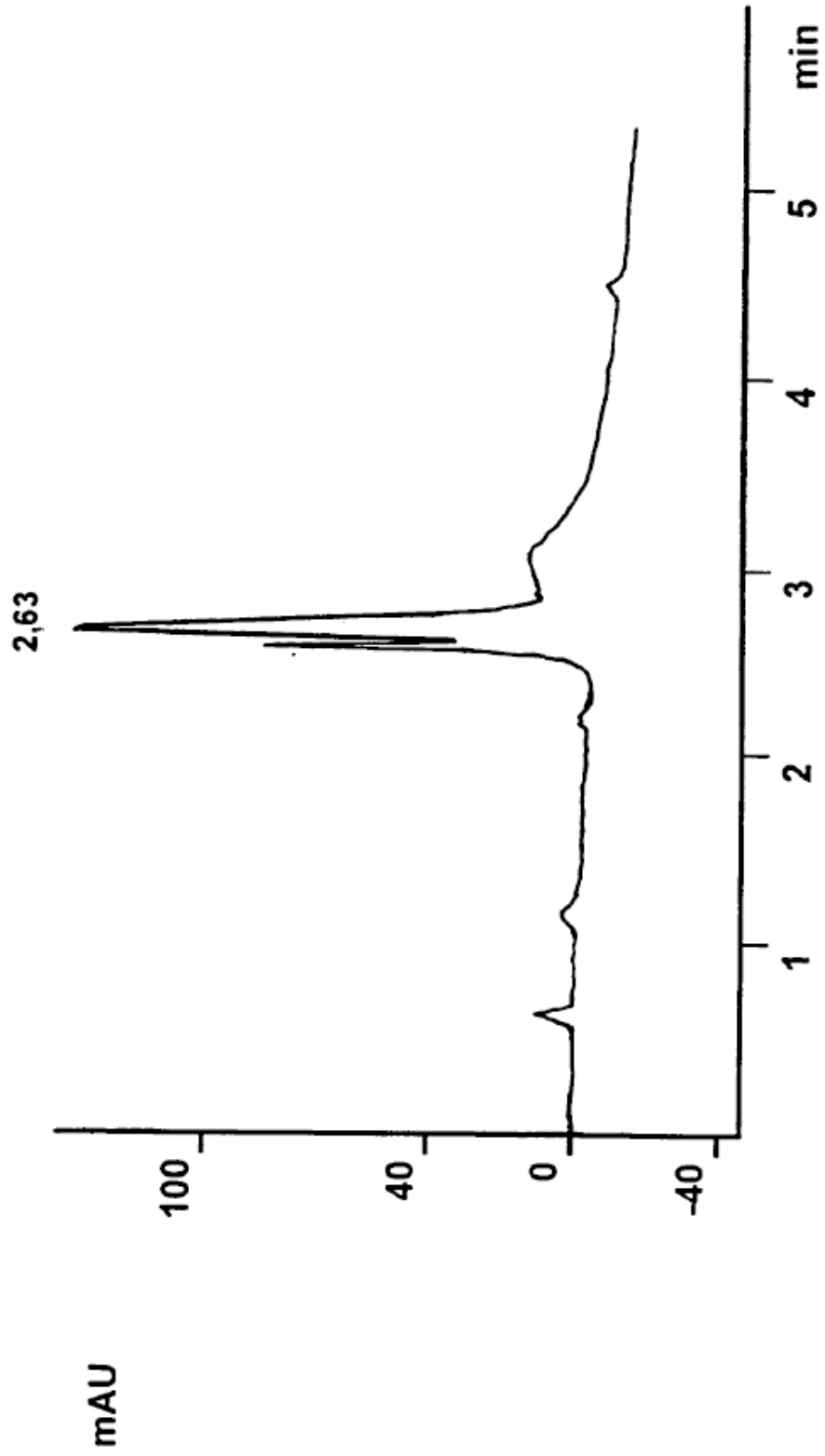


Figura 26A.

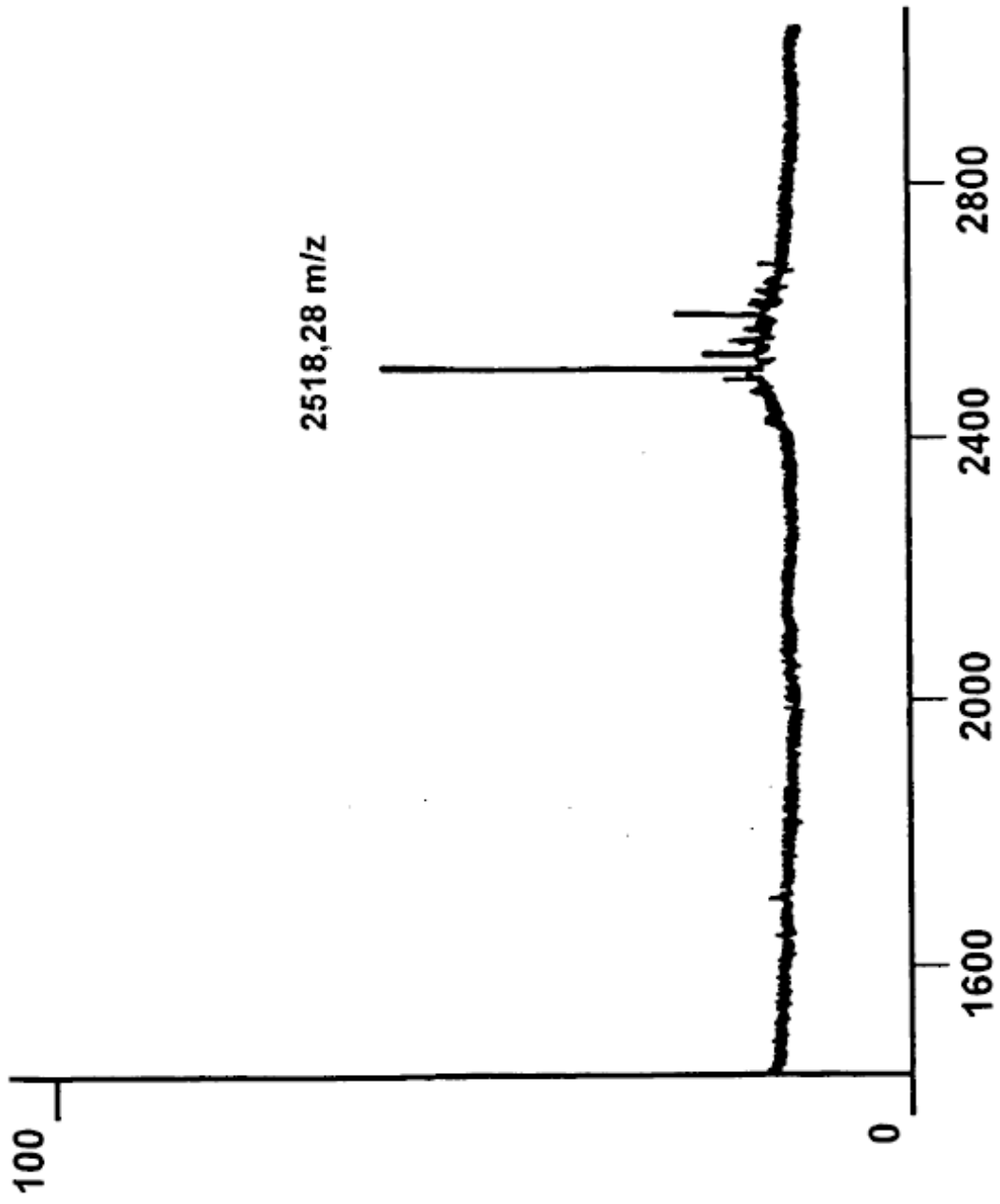


Figura 26B.

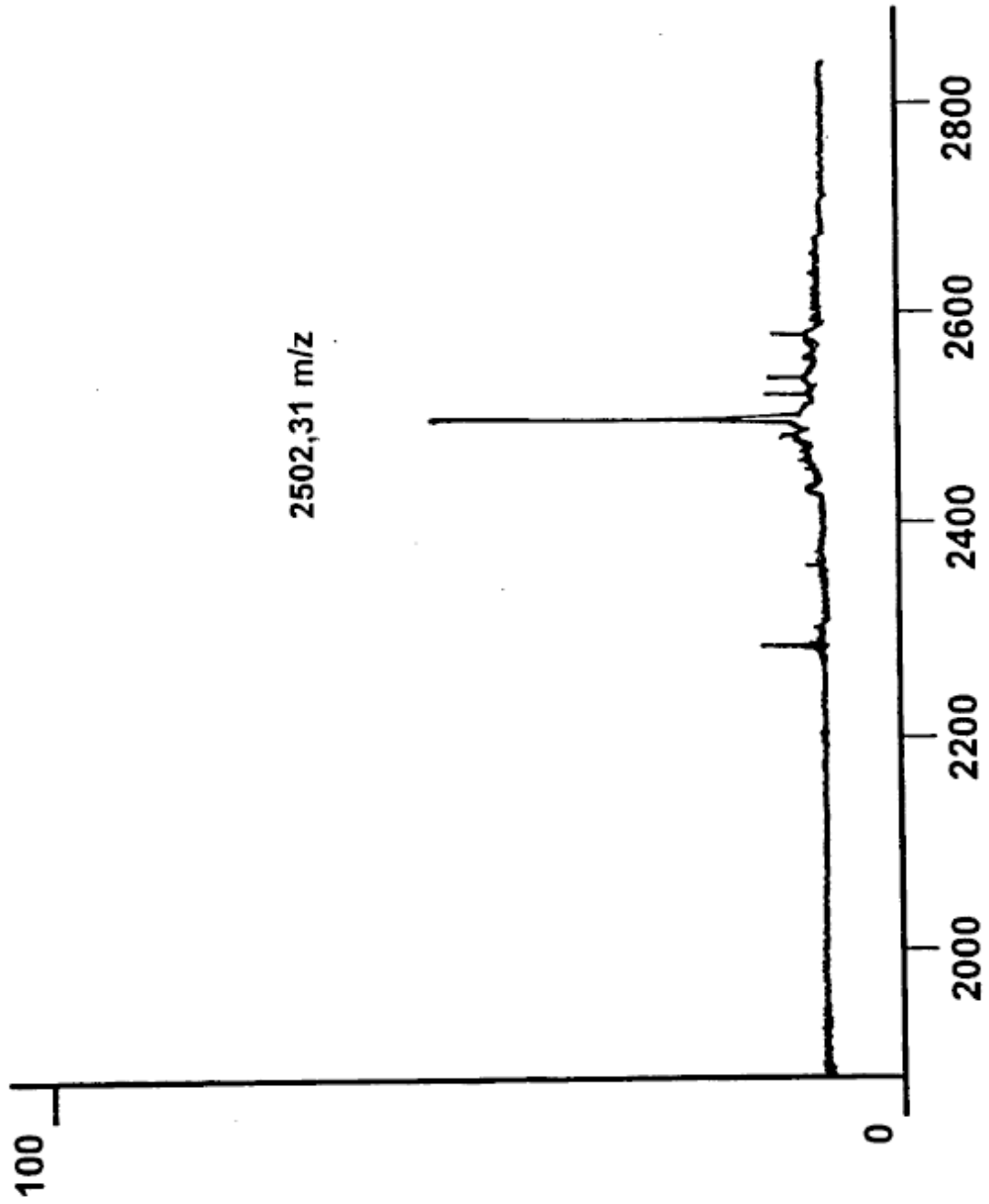
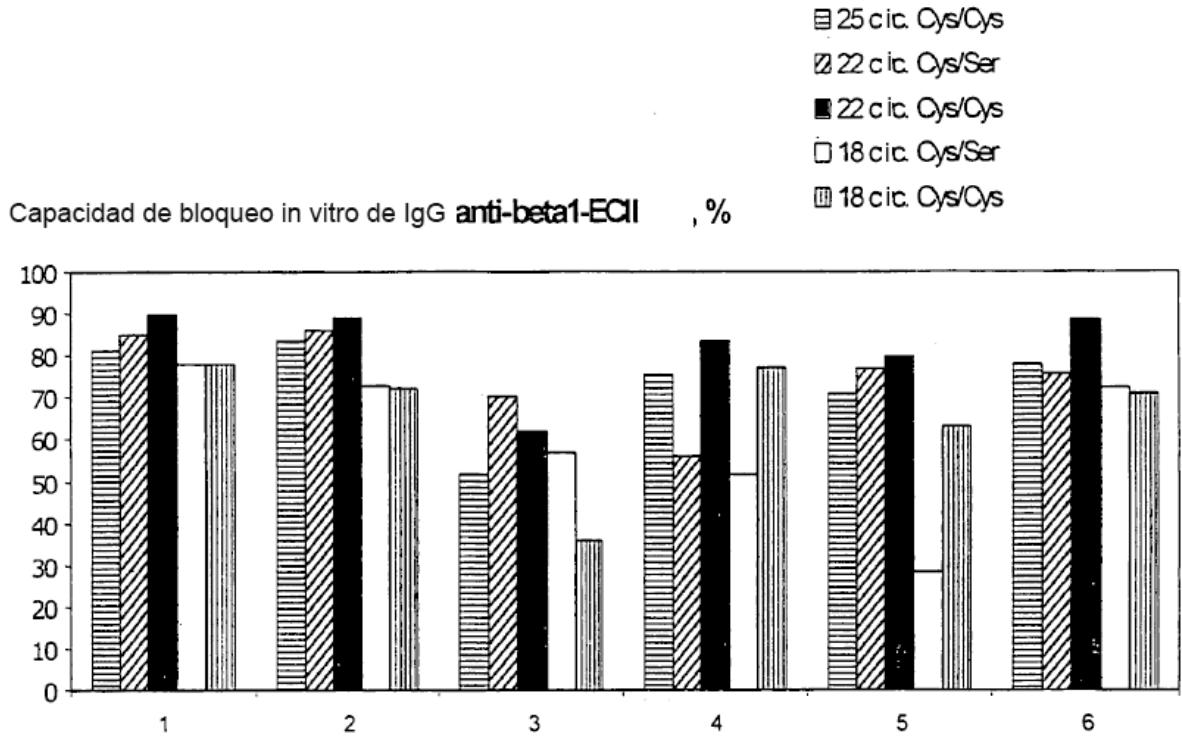


Figura 27.

A



B

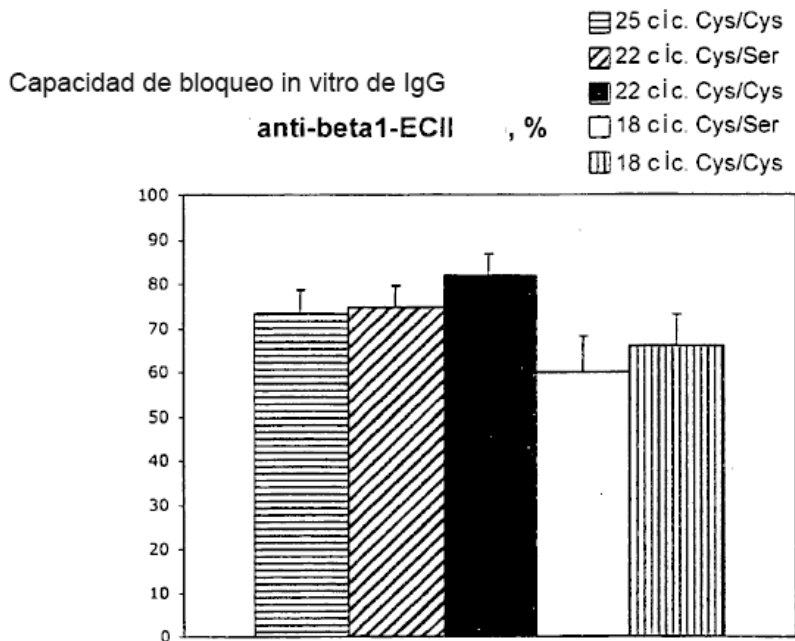
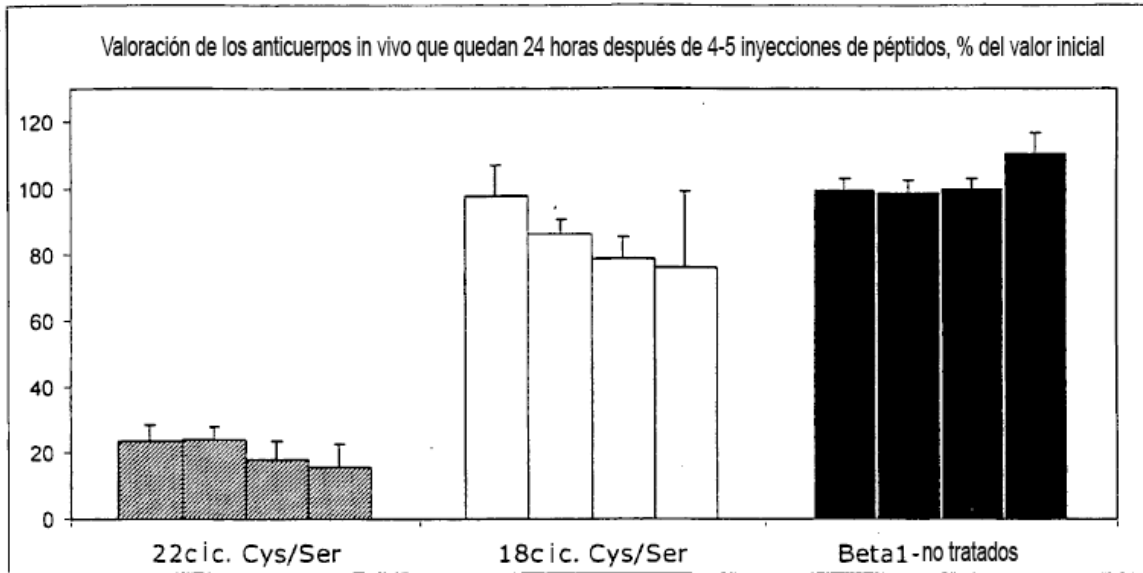


Figura 28.

A



B

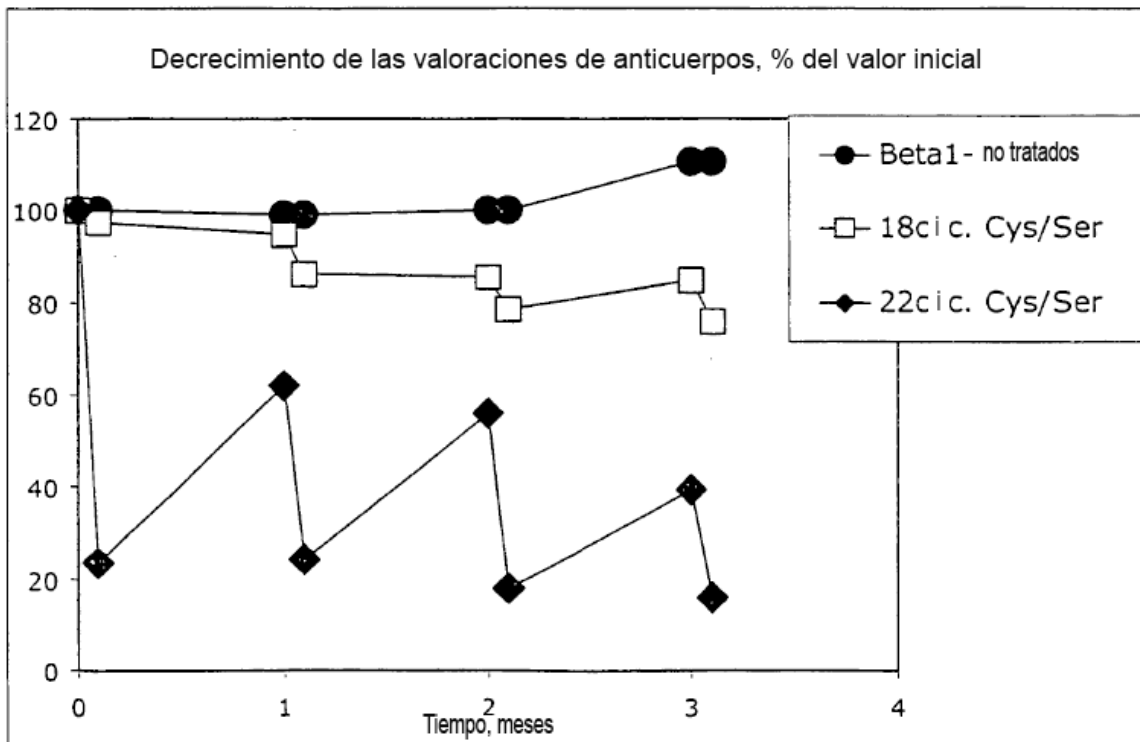


Figura 29A

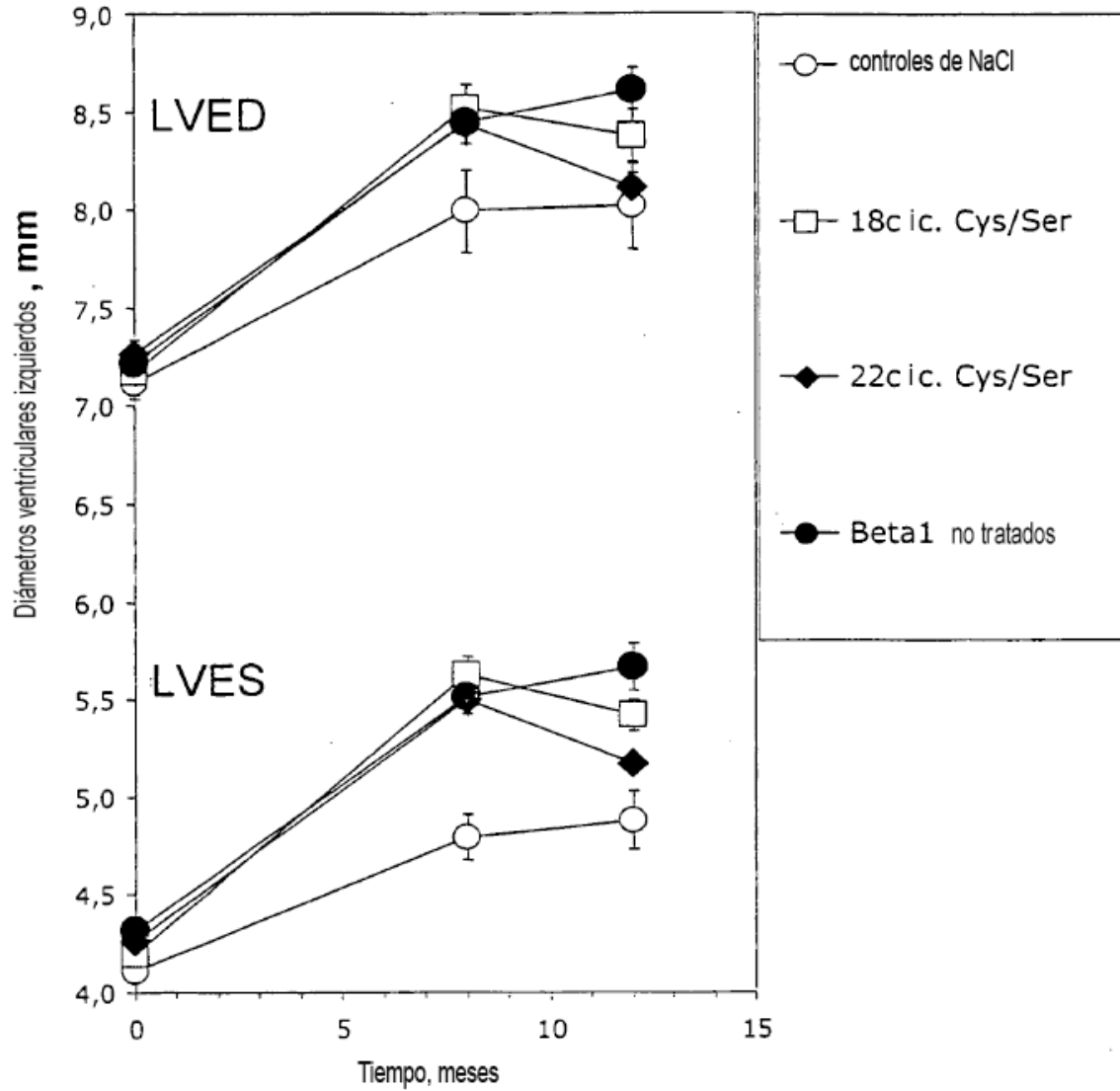
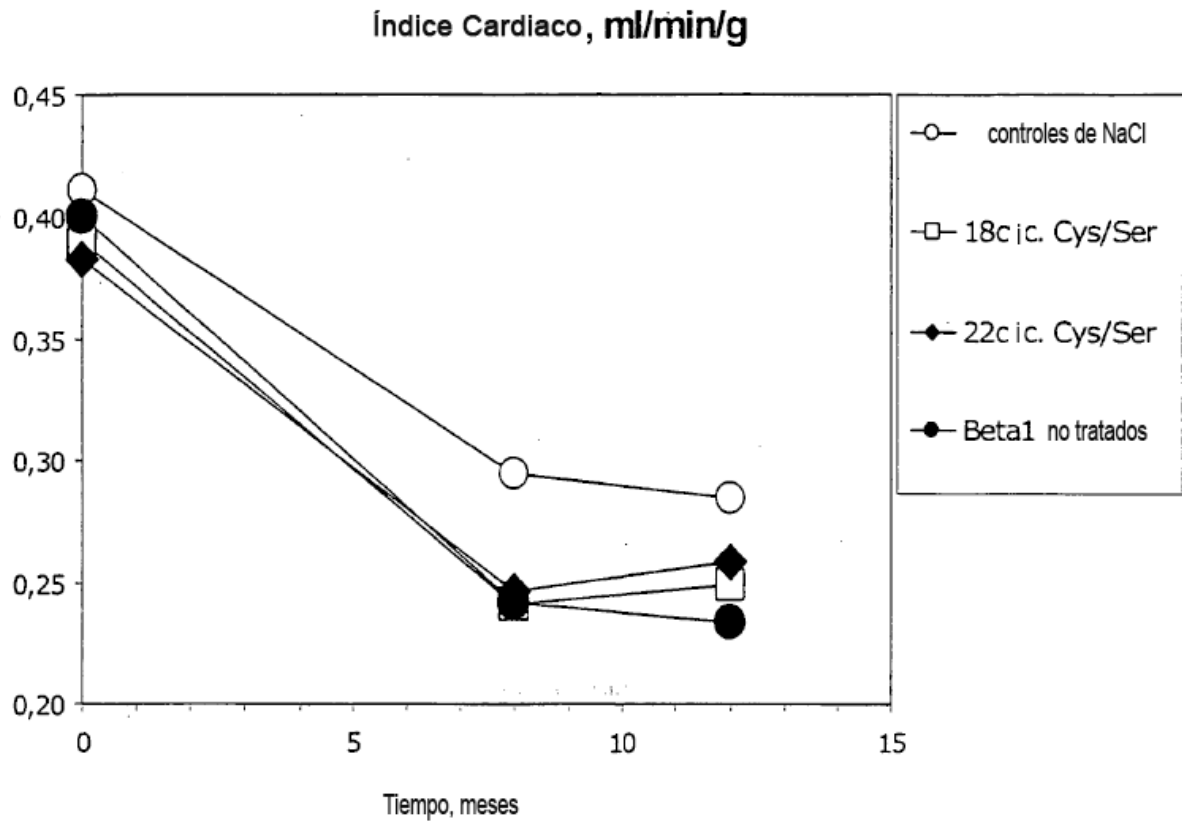


Figura 29B



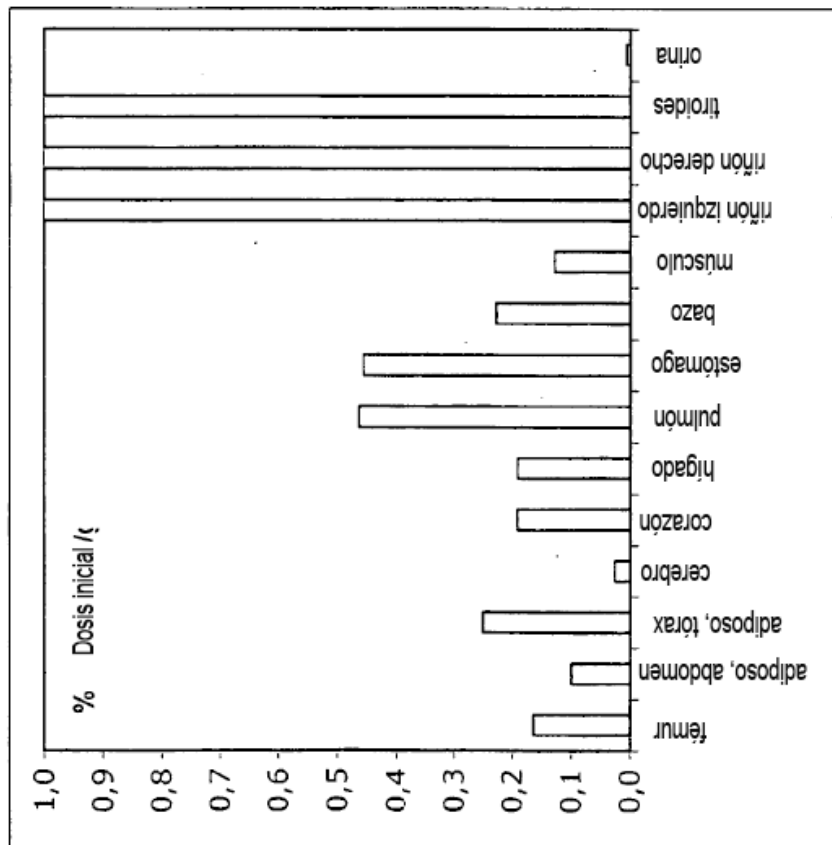
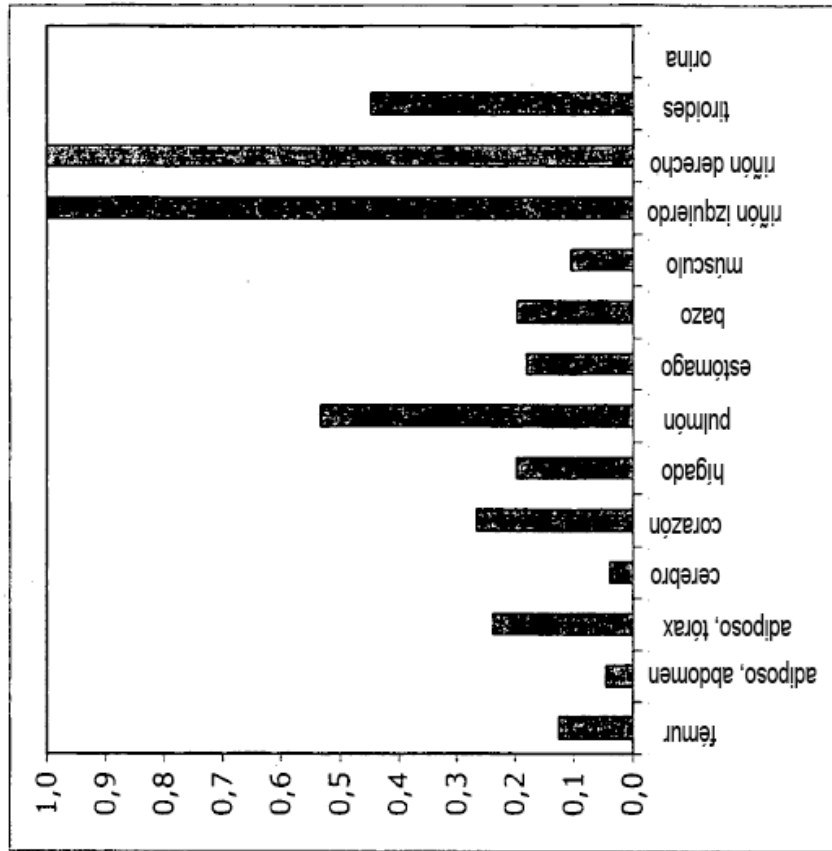


Figura 30